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	H. BOUVIER	**Managing Director**
Rédacteur en Chef	G. CHAVANCY	**Chief Editor**
Rédacteur Adjoint	A. FOURNIER	**Deputy Editor**

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (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*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
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*)

VOLUME 33 1993 NUMERO 3

SOMMAIRE - CONTENTS

Revues / Reviews :

Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori* : chemical identification and gene expression **411**
Hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori* : identification chimique et expression du gène 421
O. YAMASHITA

Silkworm breeding in India **427**
La sélection du ver à soie en Inde 449
S.N. CHATTERJEE

Effect of hormones on the mulberry - A review **461**
Effet des hormones sur le mûrier - revue 479
S. BISWAS & K. SENGUPTA

Articles originaux / Original papers :

Kinetic parameters of leucine transport across the brush border membrane of midgut columnar cells in different strains of *Bombyx mori* larvae **493**
Paramètres cinétiques du transport de la leucine à travers la membrane microvilleuse des cellules en colonne de l'intestin moyen chez des larves de différentes souches de *Bombyx mori* 503
M. TASCA, P. IANNE, S. CAPPELLOZZA, L. CAPPELLOZZA, R. ZANCHI, P. PARENTI & B. GIORDANA

Effect of minerals on the bioenergetics of the silkworm, *Bombyx mori* L. **509**
Effet des minéraux sur la bioénergétique du ver à soie *Bombyx mori* L. 515
K.M. SUBBU RATHINAM, M. KRISHNAN & J. SULOCHANA CHETTY

Effect of multistar markings on the metric traits of the silkworm, *Bombyx mori* L. . . . **519**
Effet du nombre de stars sur les caractères quantitatifs du ver à soie *Bombyx mori* L. . . . 525
K.P. JAYASWAL, SUDIP KR. SEN & G. SUBBA RAO

A microsporidian (*Nosema* sp.) infecting *Theophila religiosae* Helf. is infectious for the silkworm, *Bombyx mori* L. **527**
Un microsporidien (*Nosema* sp.) parasite de *Theophila religiosae* Helf. infeste le ver à soie *Bombyx mori* L. 531
P. KUMAR & M.M. AHSAN

1-triacontanol - a valuable byproduct of eri silk industry **535**
Le 1-triacontanol, un sous-produit rentable de l'industrie de la soie eri 539
P.G. DEO, S.B. HASAN & B. RAJANIKANTH

Effect of source and levels of nitrogen on mulberry, an economic evaluation **541**
Effet de la source et de la quantité d'azote sur le mûrier - étude de rentabilité 545
L. RAJANNA & S.B. DANDIN

Studies of flowering behaviour in *Terminalia* species 547
Etudes sur la floraison chez différentes espèces de *Terminalia* 555
P.K. SRIVASTAV

Notes brèves / Brief notes :

Performance of bivoltine breeds of silkworm (*Bombyx mori* L.) under high altitude conditions 559
Performance de races bivoltines de vers à soie (*Bombyx mori* L.) à haute altitude 567
V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ

Preliminary studies on the yield potential of new mulberry strains 571
Etudes préliminaires sur le potentiel de rendement de nouvelles souches de mûriers 575
S. B. DANDIN, L. RAJANNA, MALA V. RAJAN & SARAT CHANDRA

Review

DIAPAUSE HORMONE OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* : CHEMICAL IDENTIFICATION AND GENE EXPRESSION

O. YAMASHITA*

Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

*The diapause nature of the silkworm, **Bombyx mori**, is determined by DH secreted from neurosecretory cells of SG. The hormone was extracted with hot water from the 55,000 SGs and purified to a homologous state using a HPLC. The DH of the silkworm was determined as a 24 amino acid peptide amide by chemical sequencing of the isolated hormone and sequencing of the isolated cDNA clone. The C-terminal pentapeptide amide (FGPRL-NH_2) was recognized as the significant core-structure for expression of the biological activity of DH. The chemical synthesis of the peptide is not so complicated that the synthetic intact hormone and its analogs facilitate further studies on the chemical control of diapause in sericulture and insect pest control.*

The cloning and sequencing of cDNA, and structural analysis of DH gene revealed that the DH is synthesized from the precursor protein common to PBAN and FXPRLamide neuropeptides. DH gene is expressed in SG of both sexes, but the physiological function in males is not known.

Keywords : Diapause hormone, isolation, chemical structure, cDNA, gene expression, suboesophageal ganglion, silkworms.

INTRODUCTION

The effective production and safety preservation of eggs, and the timely provision of new larvae from eggs are the fundamental elements composing the active sericultural industry. The embryogenesis and larval hatching are absolutely affected by the diapause nature of eggs. At the natural condition, diapause eggs take as long as one year for larval hatching, while non-diapause eggs hatch to larvae within two weeks after oviposition. Thus, the control of the diapause nature of eggs is primarily required to obtain the new larvae for rearing at any time of the year when mulberry leaves are available.

Much attention has long been paid to embryonic diapause of the silkworm, *Bombyx mori*, from both sides of sciences and technologies. As early as 1910, the diapause nature (voltinism) of the silkworm was shown to be primarily controlled by the genetical characters, and categorized into three genetic types; univoltine, bivoltine and polyvoltine (cf. Doira, 1978). Univoltine strains spend one generation a year with a long term of diapause period, and polyvoltine strains repeat generations a year without entering into diapause. Bivoltine strains have the genetic plasticity to become diapause or non-diapause, and the phenotype is finally decided by the environmental conditions.

* Correspondence to O. Yamashita, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan. Fax # : +81-52-7814447.

A series of physiological studies has been done to determine the environmental factors controlling diapause nature. These experiments clearly demonstrated that the embryonic stage of the maternal generation is the sensitive stage to temperature and photoperiod. A temperature as high as 25 °C is a diapause-inducing stimulus, and a low temperature of 15 °C induces non-diapause eggs (Watanabe, 1924). In addition to temperature effects, the photoperiodic stimulus is also responsible for determination of diapause nature of bivoltine strains (Kogure, 1933). A long day condition exposure at maternal embryonic stage induces diapause, and a short day length results in non-diapause egg production. These results provide a new scientific and technical idea to control the diapause property of silkworm eggs (Yamashita and Yaginuma, 1991).

The environmental signal becomes functional *in vivo* through the mediation of humoral factors. The neuroendocrine system for diapause induction of silkworms consists of the brain and the suboesophageal ganglion (SG). The SG is the endocrine organ secreting the neurohormone, diapause hormone (DH), and the secretory activity of SG is under control of the brain (Yamashita and Hasegawa, 1985). This endocrine system is unique and quite different from that for induction of diapause entering at larval, pupal and adult stages of other insects. The diapause in these insects is primarily regulated by ecdysteroids or juvenile hormone, which is responsible for growth and development of post-embryonic stages (Denlinger, 1985; Yamashita and Hasegawa, 1985 ; Yamashita and Suzuki, 1991).

These endocrinological studies of the silkworm diapause have led us to initiate the chemical studies of DH. Hasegawa (1957) first succeeded in extracting the active fraction from the brain-SG complexes of pupae which were destined to lay diapause eggs. Based on this result, many efforts have been made to isolate DH in our laboratory with the collaboration of organic chemists for nearly 40 years (Isobe and Goto, 1980 ; Yamashita and Hasegawa, 1985). In 1991, DH was isolated into a pure form, and its primary structure was determined to be a 24 amino acid peptide amide (Imai *et al.*, 1991). Using a synthetic DH, we have confirmed the proposal that DH acts at the same dose-response fashion to stimulate trehalase activity of developing ovaries and to induce diapause in laid eggs (Yamashita and Hasegawa, 1985 ; Ikeda *et al.*, 1993).

In this review, I will briefly summarize the results of our recent work on the isolation, primary structure, DH cDNA cloning, and DH gene expression. The current knowledge on DH promisingly provides a new technique on the chemical control of silkworm egg diapause, by which sericultural activity should be improved.

ISOLATION OF DIAPAUSE HORMONE

Bioassay of diapause hormone :

A polyvoltine strain, N_4, of the silkworm was used as an assay animal. The sample to be assayed was injected into 4-day old female pharate adults. The activity was tentatively estimated by diapause-specific coloration of eggs owing to the homochrome formation in serosal cells (Isobe and Goto, 1980 ; Yamashita and Hasegawa, 1985), and the final estimation was made by counting the number of colored unhatched eggs until 14 days after oviposition, during which time the non-affected eggs hatched to larvae as non-treated (non diapause) eggs.

Purification of the diapause hormone from male adult heads :

As early as 1960, the extraction and purification of hormones needed huge amounts of starting materials due to the limitation of chemical methodologies. Although SGs or brain-SG complexes from pupae are potent biological sources for DH extraction, it is impractical to collect enough of them for large-scale preparation of DH. Several attempts were made to look for suitable biological materials, through which efforts the adult heads of both sexes were found to contain a relatively high DH activity. Since a vast number of live males is discarded just after copulation in the process of mass production of silkworm eggs, it is not difficult to collect several million male moths every year. Usually 4 million male heads (ca 4 kg) were used as our starting materials for the extraction of DH (Isobe *et al.*, 1973 ; Kubota *et al.*, 1979 ; Isobe and Goto, 1980 ; Yamashita and Hasegawa, 1985).

The dried male heads were pulverized and extracted with organic solvents. The crude extract was separated sequentially by organic media-gel permeation chromatographies with columns such as

Sephadex LH-20, -60 and Merkogel OR-6000. By monitoring weights and activities, the last Merkogel column gave a single peak with a molecular mass of 3300 Da, which was referred as DH-A (Isobe *et al.*, 1973). The remaining residue after the first extraction was repulverized and reextracted with the same solvent, and purified using the same chromatographies. The second Merkogel chromatography gave a single peak (DH-B), the mocular mass of which was 2000 Da (Kubota *et al.*, 1979).

DH-A and DH-B were further purified by ion-exchange chromatography, isoelectric focusing and high performance liquid chromatography (HPLC) which became available at that time. These chromatographies were effective for the further purification of DH (Imai *et al.*, 1982). At this stage, the active material was so small in quantity that no further purification was carried out.

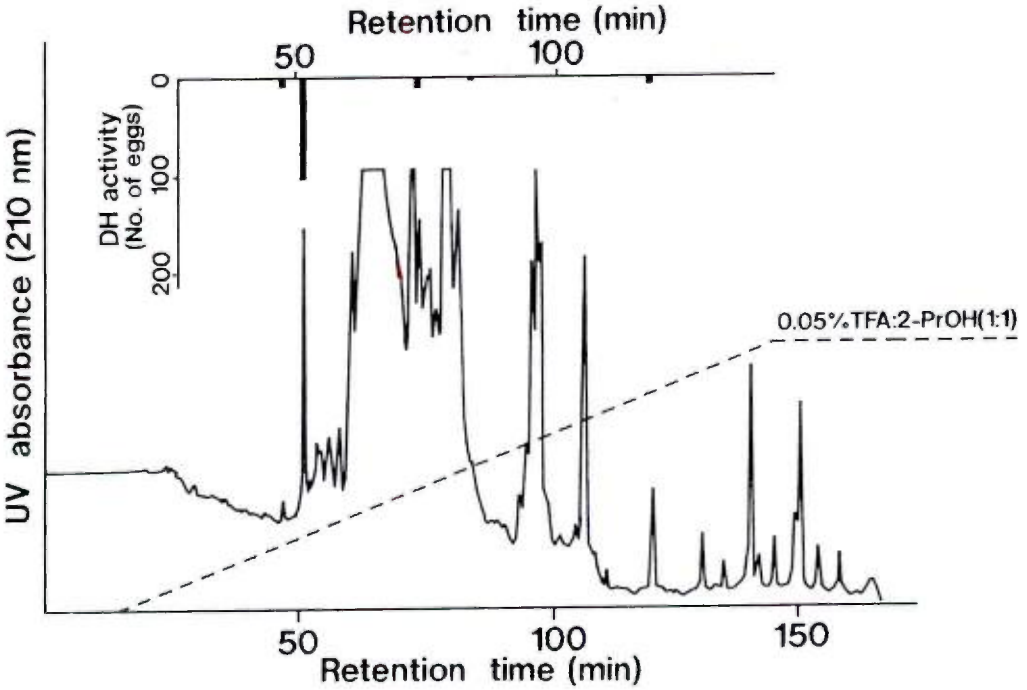


Fig. 1: Isolation of diapause hormone from complexes of the suboesophageal region and the first thoracic ganglion of pupae by a HPLC.

DH activity was recovered mainly in the peak eluted at about 50 min. by a linear gradient of 2-propanol under acidic condition.
(From Imai *et al.*, 1991).

Fig. 1 : Isolement de l'hormone de diapause par chromatographie liquide à haute performance à partir de complexes de la région suboesophagienne et du premier ganglion thoracique de chrysalides.

L'activité de l'hormone de diapause (DH) a été récupérée principalement au pic élué à environ 50 minutes sur un gradient linéaire de 2-propanol en milieu acide.
(D'après Imai et coll., 1991).

We again collected 8 million male heads (about 8 kg), and started the extraction and purification of DH according to the procedure established previously. It took over two years to prepare the partially purified DH-A and DH-B fractions. By developing new systems for HPLC, the further purification was continued for further 10 years, but failed in isolating any species of DH molecules in spite of our hard work.

Isolation of diapause hormone from dissected suboesophageal ganglia :

At the end of 1986 we decided to get back to work with a new strategy by considering the progress of peptide chemistry and of neuropeptide biology. The purification was initiated from dissecting a complex of SG and the first thoracic ganglion from day 0 pupae using forceps and a microscope. A complex was about 50 µg in fresh weight, so that the dissection of the organ is to accomplish more than 500-fold purification compared to the extraction from a whole head. We collected about 100,000 SGs a year, and used them as starting materials for DH isolation (Imai *et al.*, 1991 ; Sato *et al.*, 1992).

The dissected organs were homogenized with ethanol, and DH was extracted with hot water. The aqueous fraction was purified by a reversed-phase HPLC equipped with a TSK gel column, and DH was isolated as a single peak after the second HPLC (Fig. 1). This peak material was never separated by different column chromatographies, demonstrating that DH is isolated. Starting with 55,000 SGs, the procedure yielded about 800 ng DH and achieved nearly a 600,000-fold purification. The injection of the isolated DH (30 ng/pupa) induced diapause eggs in about 25 % eggs (Imai *et al.*, 1991 ; Sato *et al.*, 1992).

PRIMARY STRUCTURE OF DIAPAUSE HORMONE

The chemical sequencing of the isolated DH by Edman degradation suggested that the peptide was composed of 24 amino acid residues. The sequence was confirmed by sequencing of fragments released after V8 protease digestion. However, no positive sign for amino acid at position 19 was obtained, so that this amino acid is presumed to be Cys, because Cys is known to be often broken down by Edman degradation reaction.

To confirm this structure of DH, we chemically synthesized two 24 amino acid peptides ; one peptide was free at C-terminus, and the other was amidated. No biological activity was found in the non-amidated peptide, whereas the amidated peptide showed an activity compared to that of isolated DH (Fig. 3). Consequently, we concluded that DH of silkworms is a 24 amino acid peptide amide as follows :

Thr-Asp-Met-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp-Arg-Gly-Ala-His-Ser-
Glu-Arg-Gly-Ala-Leu-Trp(Cys)-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH_2

cDNA CLONING AND DEDUCED PRIMARY STRUCTURE OF DIAPAUSE HORMONE

The information on the primary structure of DH enables us to isolate cDNA clones coding for DH, which should facilitate the confirmation of DH structure and the study on the expression of DH gene in the neurosecretory cells of SG. Referring the amino acid sequence we synthesized the oligonucleotide and used it as a probe for screening of cDNA library constructed with poly(A^+)RNA from SGs. Four positive clones were isolated and the longest insert cDNA (0.8 kb) was sequenced (Fig. 2). The sequence revealed that the cDNA encoded a peptide consisting of 192 amino acid residues with a molecular mass of 22 kDa. In this sequence, DH peptide was localised from the 24th to 47th amino acid, and followed by a triplet of amino acid residues, Gly^{48}-Lys^{49}-Arg^{50}. This deduced DH sequence clearly showed that the amino acid at position 19 is Trp (Bom DH-I[19-Trp], instead of Cys (Bom DH-I[19-Cys]). Further the triplet sequence seemed to provide a processing site for molecular maturation of DH through a tryptic cleavage at Lys^{49} and amidation of C-terminal Leu by Gly^{48} (Sato *et al.*, 1992).

```
+1 CAACAACAAAA ATG TAT AAA ACC AAC ATT GTT TTC AAC GTT TTA GCT TTG GCA TTG  56
+1             M   Y   K   T   N   I   V   F   N   V   L   A   L   A   L  15

TTC AGT ATT TTC TTC GCG AGT TGC ACG GAT ATG AAG GAT GAA AGC GAC AGA GGA 110
 F   S   I   F   F   A   S   C   T   D   M   K   D   E   S   D   R   G  33
                                 DH

GCT CAC AGT GAG CGG GGC GCT CTC TGG TTC GGC CCC AGA CTC GGG AAG CGA TCA 164
 A   H   S   E   R   G   A   L   W   F   G   P   R   L   G   K   R   S  51

ATG AAG CCA TCC ACT GAA GAT AAC AGG CAA ACC TTC CTG AGG CTG CTC GAG GCG 218
 M   K   P   S   T   E   D   N   R   Q   T   F   L   R   L   L   E   A  69

GCT GAT GCC CTC AAA TTT TAC TAC GAC CAG CTA CCT TAC GAG AGG CAA GCC GAT 272
 A   D   A   L   K   F   Y   Y   D   Q   L   P   Y   E   R   Q   A   D  87

GAA CCG GAA ACC AAA GTA ACA AAG AAG ATC ATC TTC ACC CCC AAA CTC GGG AGG 326
 E   P   E   T   K   V   T   K   K   I   I   F   T   P   K   L   G   R  105
                                     α

AGC GTC GCC AAA CCC CAG ACG CAT GAA AGC CTC GAA TTC ATC CCC CGG CTC GGA 380
 S   V   A   K   P   Q   T   H   E   S   L   E   F   I   P   R   L   G  123
 β

AGG CGG CTC TCT GAG GAC ATG CCT GCT ACG CCA GCT GAC CAG GAA ATG TAC CAA 434
 R   R   L   S   E   D   M   P   A   T   P   A   D   Q   E   M   Y   Q  141
     PBAN

CCT GAC CCC GAA GAA ATG GAG TCA AGA ACA AGA TAC TTC TCG CCC AGG CTG GGG 488
 P   D   P   E   E   M   E   S   R   T   R   Y   F   S   P   R   L   G  159

CGC ACC ATG AGC TTT TCG CCC AGA CTG GGA AGC GAG CTT TCG TAC GAT TAC CCT 542
 R   T   M   S   F   S   P   R   L   G   R   E   L   S   Y   D   Y   P  177
     γ

ACA AAA TAT AGG GTT GCC AGA AGC GTT AAC AAG ACA ATG GAC AAC TAA ACG AAT 596
 T   K   Y   R   V   A   R   S   V   N   K   T   M   D   N               192

TAT GGT CCG CTT GAG GTA CCT CAT TTG AGG TCT CGA TCG ACT CCG ACG AAC GGT 650
TAC GGG TAA ACG GCG ACA ATG TTA ATG TTT TGG ACG AAA CAA TTG TTA ATT AAT 704
AAA TTC ACG TGA TTT TGG AAT TGT AAT TTA TAA GTG AAT AAA AAA ATA AAC TAT 758
TTA AAA TAA ATG AGT CAT TAT TAT TAT TAA AAA AAA AAA AAA               800
```

Fig. 2 : Nucleotide and deduced amino acid sequence of cDNA encoding diapause hormone.

The sequence of diapause hormone (DH), pheromone synthesis activating neuropeptide (PBAN), α-, β- and γ-suboesophageal neuropeptides (α, β, γ) are underlined.
(Modified from Sato *et al.*, 1993).

Fig. 2 : Séquence des nucléotides de l'ADNc codant pour l'hormone de diapause et séquence déduite des acides aminés de l'hormone de diapause.

Les séquences de l'hormone de diapause (DH), des neuropeptides activant la biosynthèse de la phéromone (PBAN), les α-, β- et γ-neuropeptides suboesophagiens (α, β, γ) sont soulignées.

Again we chemically synthesized the amidated peptide with Trp^{19} (Bom DH-I[19-Trp]) and determined its biological activity (Fig. 3). The activity was comparable with that found in the natural DH and Bom DH-I[19-Cys], although Bom DH-I[19-Cys] showed a slightly higher activity at higher doses. Furthermore, the Bom DH-I[19-Trp] has been isolated from the extracts of SG-brain complexes prepared from day 2 to 3 pupae (Sato *et al.*, 1992). Thus, Bom DH-I[19-Trp] is concluded to be a DH molecule, although it remains unknown whether Bom DH-I[19-Cys] is also natural DH.

We chemically synthesized various fragments of DH molecule to know the relationship between structure and activity. A significant but low activity was found on C-terminal pentapeptide amide, being about 1/1000 of the intact DH activity. The activity increased according to the prolongation of chain length of the fragment (unpublished data).

THE PRECURSOR PROTEIN OF DIAPAUSE HORMONE

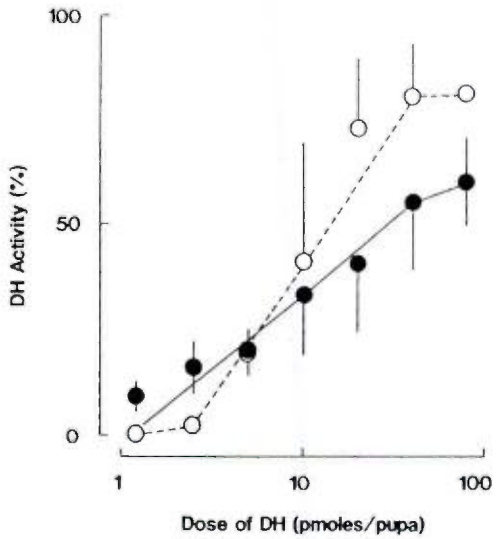
A computer-assisted homology search revealed that the precursor protein of DH was a common polyprotein, from which the multiple neuropeptides were released. The SG of silkworms secretes the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (Bom PBAN) which stimulates production of the sex pheromone, bombycol, in the pheromone glands of female moths. Two PBANs (Bom PBAN-I and Bom PBAN-II) were isolated from female adult heads, and determined to be 33 and 34 amino acid peptide amides, respectively (Kitamura *et al.*, 1989, 1990). In the deduced sequence, the Bom-PBAN-I peptide was extended from Leu^{126} to Leu^{158}, and Bom-PBAN-II from Arg^{125} to Leu^{158}. These two peptide sequences were followed by Gly and flanked by a basic amino acid, which means the molecular maturation of PBAN through tryptic cleavage and C-terminal amidation, as occurs in DH maturation (Sato *et al.*, 1993).

Fig. 3 : Diapause-inducing activity of Bom DH-I[19-Trp] (•) and Bom DH-I [19-Cys] (O).

The synthetic peptide was injected into day-4 pharate adults of N_4 strain, and number of diapause eggs were counted after non-diapause eggs had hatched. (Modified from Ikeda *et al.*, 1993).

Fig. 3 : Activité induisant la diapause de Bom DH-I[19-Trp] (•) et Bom DH-I [19-Cys] (O).

Le peptide synthétique a été injecté dans des pré-imagos de la souche N_4 et le nombre d'oeufs diapausants a été compté après éclosion des oeufs non diapausants.
(Adapté de Ikeda et coll., 1993).



Recently, in locusts (Schoofs *et al.*, 1991, 1992) and cockroaches (Holman *et al.*, 1991 ; Nachman *et al.*, 1991), several neuropeptides with a tropic activity of visceral muscles were isolated from neurosecretory cells of SG and brains, and called myotropin or pyrokinin. All these peptides share a common peptapeptide (Phe-Xxx-Pro-Arg-Leu-NH_2, FXPRL-NH_2) at their C-terminus, so that these

neuropeptides belong to the family of FXPRL amide peptides. This pentapeptide region is shown to be the core-structure for expression of their biological activity (Nachman *et al.*, 1991). Since Bom-DH and Bom-PBANs also share the FXPRL-NH_2 at their C-terminus, these two peptides are also members of the FXPRL-NH_2 peptide family. The FXPRL sequence was found at three regions of the precursor protein of DH (α-,β- and γ-SGNP in Fig. 2), and these three peptides were followed by Gly and bounded by a basic amino acid. Consequently, these peptides are also released from the DH precursor peptide to the respective mature polypeptide (Sato *et al.*, 1993). These putative peptides have no sequence homology to the known peptides.

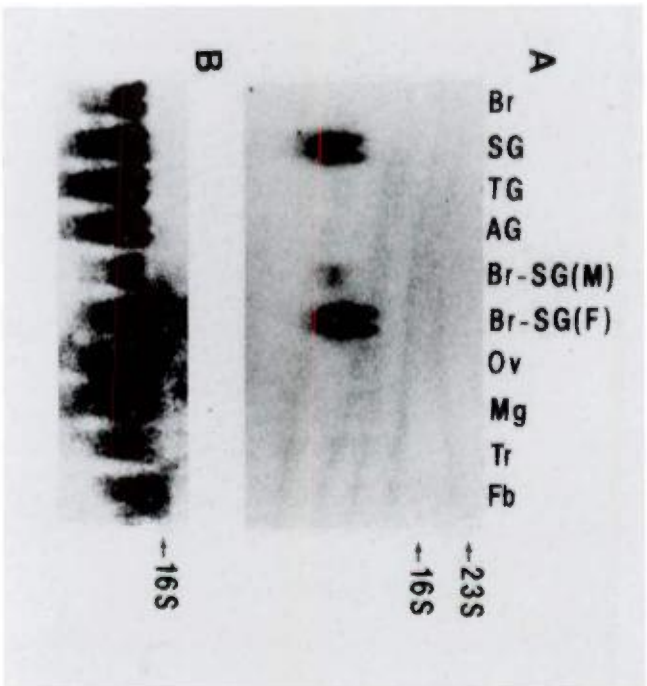


Fig. 4 : Expression of diapause hormone gene encoding the DH precursor analyzed by a northern blot.

A, Neural tissues [brain (Br), SG, a mixture of thoracic ganglia (TG) and a mixture of abdominal ganglia (AG)], and non-neural tissues [midgut (Mg), ovaries (Ov), trachea (Tr) and fat body (Fb)] were collected from day-0 pupae of both sexes for RNA extraction. Brain-SG complexes (Br-SG) and ovaries were prepared from male (M) and female (F) day-4 pharate adults. 23S and 16S rRNAs of *Escherichia coli* are indicated on the right as size markers.
B, The membrane was reprobed with an actin cDNA probe to estimate RNA applied.
(Modified from Sato *et al.*, 1993).

Fig. 4 : Analyse par "northern blot" de l'expression du gène de l'hormone de diapause codant pour son précurseur.

*A : Les tissus neuraux [cerveau (Br), ganglion suboesophagien (SG), mélange de ganglions thoraciques (TG) et mélange de ganglions abdominaux (AG)] et les tissus non neuraux [intestin moyen (Mg), ovaires (Ov), trachée (Tr) et corps adipeux (Fb)] ont été prélevés sur des chrysalides des deux sexes âgées de 0 jour pour l'extraction de l'ARN. Les complexes cerveau-ganglion suboesophagien (Br-SG) et les ovaires ont été préparés à partir de pré-imagos mâles (M) et femelles (F) âgés de 4 jours. Les ARN 23S et 16S d'*Escherichia coli *à droite servent de marqueurs de taille.*
B : La membrane a été resondée avec une sonde ADNc actine afin d'estimer l'ARN appliqué.
(Adapté de Sato et coll., 1993).

To confirm the production of these proposed peptides in SG, we have attempted to isolate them from extracts of SGs using the chemically synthesized peptide as the reference substance for HPLC isolation. To date, α- and γ-SGNP have been demonstrated to exist in SG as the mature form (Sato *et al.*, 1993). We chemically synthesized these peptides and tested their biological activity. The pheromonotropic activity and myotropic activity were found in α-, β and γ-SGNP (unpublished results), but no marked DH activity was recognized in them (Sato *et al.*, 1993). These results indicate that these neuropeptides are involved in the regulation system of the unkown function of SG.

STRUCTURE AND EXPRESSION OF DIAPAUSE HORMONE GENE

Using the cDNA for DH precursor protein as a probe, we isolated three positive DNA inserts from a genomic library of the silkworm (λ-EMBL3). The three clones were shown to carry different portions in addition to the overlapped region by physical mapping with some restriction enzyme digestion. Sequencing revealed that the isolated gene measures about 8 kb in total length, and consists of 6 exons interrupted by 5 introns. By comparing with cDNA sequence, the DH molecule is encoded in the first and second exons, and PBAN in the fourth and fifth exons (unpublished data).

The tissue-specific expression of the gene was examined by the northern blot analysis using a radiolabelled DH cDNA (Sato *et al.*, 1993). The positive signal was localized at 0.9 kb position, corresponding to the full length of cDNA, and found in only SG of pupae and pharate adults irrespective of sexes (Fig. 4). Thus, DH gene is concluded to be expressed in neurosecretory cells of SG, which confirms the endocrinological fact that SG is the sole organ secreting DH in silkworms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work cited from the author's laboratory was partly supported by a Grant-In-Aid for Scientific Research (# 03404008 ; # 05556008) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and by a Grant-In-Aid (Bio Media Program) from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (BMP93-1-2-1) of Japan.

REFERENCES

DENLINGER D.L. (1985) Hormonal control of diapause. *In* The Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (eds. Kerkut G.A. and Gilbert L.I.). Pergamon Press, Oxford, Vol. 8, pp. 353-418.

DOIRA H. (1978) Genetic stocks of the silkworm. *In* The Silkworm : An Important Laboratory Tool (ed. Tazima Y.). Kodansha, Tokyo, pp. 53-81.

HASEGAWA K. (1957) The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Nature, 179, 1300-1301.

HOLMAN G.M., NACHMAN R.J., SCHOOFS L., HAYES T.K., WRIGHT M.S., DE LOOF A. (1991) The *Leucophaea maderae* hindgut preparation ; A rapid and sensitive bioassay tool for the isolation of insect myotropins of other insect species. Insect Biochem., 21, 108-112.

IKEDA M., SU Z.-H., SAITO H., IMAI K., SATO Y., ISOBE M., YAMASHITA O. (1993) Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity of the silkworm, *Bombyx mori*, by the synthetic diapause hormone. J. Insect Physiol., 889-895.

IMAI K., KONDO N., ISOBE M., GOTO T., YAMASHITA O, HASEGAWA K. (1982) The neurohormones from the suboesophageal ganglion of *Bombyx mori* ; Separation of melanization and reddish coloration hormone from diapause hormone. J. Sericult. Sci. Japan, 51, 111-125.

IMAI K., KONNO T., NAKAZAWA Y., KOMIYA T., ISOBE M., KOGA K., GOTO T., YAGINUMA T., SAKAKIBARA K., HASEGAWA K., YAMASHITA O. (1991) Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad., 67 ser. B, 98-101.

ISOBE M., GOTO T. (1980) Diapause hormone. *In* The Neurohormonal Techniques in Insects (ed. Miller T.A.). Springler-Verlag, Berlin and New York, pp. 216-243.

ISOBE M., HASEGAWA K., GOTO T. (1973) Isolation of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 19, 1221-1239.
KITAMURA A., NAGASAWA H., KATAOKA H., ANDO T., SUZUKI A. (1990) Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropetpide-II (PBAN-II) of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem., 54, 2495-2497.
KITAMURA A., NAGASAWA H., KATAOKA H., INOUE T., MATSUMOTO S., ANDO T., SUZUKI A. (1989) Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 520-526.
KOGURE M. (1933) The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Fac. Agric. Kyushu Imp. Univ., 4, 1-93.
KUBOTA I., ISOBE M., IMAI K., GOTO T., YAMASHITA O., HASEGAWA K. (1979) Characterization of the silkworm diapause hormone B. Agric. Biol. Chem., 43, 1075-1078.
NACHMAN R.J., ROBERT V.A., DYSON H.J., HOLMAN G.M., TAINER J.A. (1991) Active conformation of an insect neuropeptide family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4518-4522.
SATO Y., NAKAZAWA Y., IMAI K., KOMIYA T., SAITO H., SHIN M., IKEDA M., SAKAKIBARA K., ISOBE M., YAMASHITA O. (1992) A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad., 68 ser. B, 75-79.
SATO Y., OGUCHI M., MENJO N., IMAI K., SAITO H., IKEDA M., ISOBE M., YAMASHITA O. (1993) Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori* : Characterization of cDNA for diapause hormone precursor and identification of new peptides. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 3251-3255.
SCHOOFS L., HOLMAN G.M., HAYES T.K., NACHMAN R.J., DE LOOF A. (1991) Isolation, primary structure and synthesis of locustapyrokinin ; A myotropic peptide of *Locusta migratoria*. Gen. Comp. Endocrinol., 81, 97-104.
SCHOOFS L., HOLMAN G.M., HAYES T.K., NACHMAN R.J., KOCHANSKY J.P., DE LOOF A. (1992) Isolation, identification and synthesis of locust myotropin III and IV, two additional neuropeptides of *Locusta migratoria* : Members of the locustamyotropin peptide family. Insect Biochem. Mol. Biol., 22, 447-452.
WATANABE K. (1924) Studies on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Sericult. Exp. Sta., 6, 411-455.
YAMASHITA O., HASEGAWA K. (1985) Embryonic diapause. *In* The Comprehensive Insect Physiology, Biochemistryand Pharmaçology (eds. Kerkut G.A., Gilbert L.I.). Pergamon Press, Oxford and New York, Vol. I, pp. 407-434.
YAMASHITA O., SUZUKI K. (1991) Roles of morphogenetic hormones in embryonic diapause. *In* The Morphogenetic Hormones of Arthropods (ed. A.P. Gupta), Rutgers Univ. Press, New Brunswick, pp. 81-128.
YAMASHITA O., YAGINUMA T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures : Implication for sericulture. *In* The Insects at Low Temperature (eds. Lee R.E. Jr., Denlinger D.L.) Chapman and Hall, New York and London, pp. 424-445.

Revue

HORMONE DE DIAPAUSE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* : IDENTIFICATION CHIMIQUE ET EXPRESSION DU GENE

O. YAMASHITA*

Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japon.

La diapause chez le ver à soie ***Bombyx mori*** *est déterminée par la DH sécrétée à partir des cellules neurosécrétrices du SG. L'hormone a été extraite à l'eau chaude à partir de 55 000 SG et purifiée à un état homogène par HPLC. Le séquençage chimique de l'hormone isolée et le séquençage du clone d'ADNc isolé ont montré que la DH du ver à soie était un peptide amidé de 24 acides aminés. Le pentapeptide amidé à l'extrémité C (FGPRL-NH2) a été identifié comme étant la structure noyau responsable de l'expression de l'activité biologique de la DH. La synthèse chimique du peptide n'est pas très complexe et l'hormone entière synthétique et son analogue faciliteront l'étude ultérieure du contrôle chimique de la diapause en sériciculture et dans la lutte contre les parasites d'insectes.*

Le clonage et le séquençage de l'ADNc ainsi que l'analyse structurale du gène de la DH ont révélé que la DH était synthétisée à partir de la protéine précurseur commune aux neuropeptides amidés PBAN et FXPRL. Le gène de la DH s'exprime dans le SG des deux sexes mais on ne connaît pas sa fonction physiologique chez les mâles.

INTRODUCTION

La production et la bonne conservation des oeufs, ainsi que la fourniture programmée de jeunes larves à partir de ces oeufs sont les éléments fondamentaux de l'industrie séricicole. L'embryogenèse et l'éclosion larvaire sont fortement affectées par la diapause des oeufs. Dans des conditions naturelles, les oeufs diapausants mettent un an à éclore, tandis que les oeufs non diapausants éclosent dans les deux semaines après l'oviposition. La maîtrise de la diapause des oeufs est donc une condition préalable à l'obtention de jeunes larves destinées à l'élevage en fonction de l'époque de l'année où l'on peut obtenir des feuilles de mûriers.

On s'est longtemps intéressé à la diapause embryonnaire du ver à soie *Bombyx mori*, tant du point de vue des sciences que de celui des technologies. Dès 1910, on a démontré que la diapause (voltinisme) du ver à soie était principalement gouvernée par les caractères génétiques et caractérisée par trois types génétiques : le type monovoltin, le type bivoltin et le type polyvoltin (cf. Doira, 1978). Les souches monovoltines ont une génération par an avec une diapause de longue durée tandis que les souches polyvoltines ont plusieurs générations par an et n'entrent pas en diapause. Les souches bivoltines ont la flexibilité génétique d'être diapausantes ou non diapausantes, le phénotype étant déterminé par les conditions du milieu.

Une série d'études physiologiques a été réalisée afin de connaître les facteurs environnementaux qui conditionnent la diapause. Ces expériences ont clairement démontré que le stade embryonnaire de la génération maternelle est le stade sensible à la température et à la photopériode. Une température

* Correspondance à : O. Yamashita, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japon. Télécopie : +81-52-781-4447.

s'élevant à 25 °C est un facteur de diapause tandis qu'une température de 15 °C induit des oeufs non diapausants (Watanabe, 1924). Outre la température, le stimulus photopériodique est également responsable de la détermination de la diapause des souches bivoltines (Kogure, 1933). Une exposition longue à la lumière du jour au stade embryonnaire chez la mère induit la diapause et une exposition de courte durée entraîne la production d'oeufs non diapausants. Ces résultats permettent d'aborder le facteur de la diapause des oeufs de vers à soie sous un nouvel angle scientifique et technique (Yamashita et Yaginuma, 1991).

Le signal environnemental fonctionne *in vivo* par l'intermédiaire des facteurs humoraux. Le système endocrine pour l'induction de la diapause des vers à soie comprend le cerveau et le ganglion suboesophagien (SG). Le SG est l'organe endocrine qui sécrète la neurohormone, l'hormone de diapause (DH), l'activité sécrétoire étant gouvernée par le cerveau (Yamashita et Hasegawa, 1985). Ce système endocrinien est unique et très différent de celui lié à l'entrée en diapause aux stades larvaire, pupal et adulte des autres insectes. La diapause chez ces insectes est principalement régulée par des ecdystéroïdes ou l'hormone juvénile, qui sont responsables de la croissance et du développement des stades post-embryonnaires (Denlinger, 1985 ; Yamashita et Hasegawa, 1985 ; Yamashita et Suzuki, 1991).

Ces études endocrinologiques sur la diapause du ver à soie nous ont conduits à initier une étude chimique de la DH. Hasegawa (1957) a, le premier, réussi à extraire la fraction active des complexes cerveau-SG des chrysalides destinées à pondre des oeufs diapausants. Sur la base de ce résultat, notre laboratoire a cherché pendant 40 ans à isoler la DH avec la collaboration de chimistes organiciens (Isobe et Goto, 1980 ; Yamashita et Hasegawa, 1985). En 1991, la DH a été isolée sous une forme pure et on a pu déterminer que sa structure primaire était un peptide-amide de 24 acides aminés (Imai et coll., 1991). A l'aide d'une DH synthétique, nous avons confirmé l'hypothèse selon laquelle la DH agit selon la même dose-réponse pour stimuler l'activité tréhalase permettant de développer les ovaires et d'induire la diapause chez les oeufs pondus (Yamashita et Hasegawa, 1985 ; Ikeda et coll., 1993).

Dans cette revue, je présente brièvement les résultats de nos travaux récents sur l'isolement, la structure primaire et le clonage de l'ADNc de la DH et l'expression du gène de la DH. Les connaissances actuelles sur la DH sont prometteuses car elles fournissent une nouvelle technique pour le contrôle chimique de la diapause des oeufs de vers à soie, technique qui pourrait permettre d'améliorer l'industrie séricicole.

ISOLEMENT DE L'HORMONE DE DIAPAUSE

Dosage biologique de l'hormone de diapause :

La souche polyvoltine N_4 du ver à soie a été utilisée comme matériel expérimental. L'échantillon à doser a été injecté dans des pré-imagos femelles âgés de 4 jours. L'activité a été détectée par la coloration spécificique des oeufs entrant en diapause, provoquée par la formation des homochromes dans les cellules de la séreuse (Isobe et Goto, 1980 ; Yamashita et Hasegawa, 1985), et l'estimation finale a été faite en comptant le nombre d'oeufs colorés non éclos jusqu'à 14 jours après l'oviposition, période après laquelle les oeufs non affectés, considérés comme oeufs non traités (non diapausants) éclosent.

Purification de l'hormone de diapause à partir de têtes d'adultes mâles :

Dès 1960, l'extraction et la purification des hormones nécessitait une énorme quantité de matériels initiaux du fait des limitations imposées par les méthodologies chimiques. Bien que les SG ou les complexes cerveau-SG issus des chrysalides constituent une source biologique active pour l'extraction de la DH, il est difficile d'en prélever suffisamment pour une préparation à grande échelle. Plusieurs tentatives ont été faites afin de trouver un matériel biologique adapté et ont permis d'observer que les têtes des adultes des deux sexes contenaient une activité DH relativement élevée. Etant donné qu'un grand nombre de mâles vivants est éliminé juste après l'accouplement au cours de la production en masse d'oeufs de vers à soie, il n'est pas difficile d'obtenir plusieurs millions de papillons mâles par an. Quatre millions de têtes de mâles (environ 4 kg) ont été utilisés comme matériel initial pour l'extraction de la DH (Isobe et coll., 1973 ; Kubota et coll., 1979 ; Isobe et Goto, 1980 ; Yamashita et Hasegawa, 1985).

Les têtes de mâles séchées ont été pulvérisées et extraites avec des solvants organiques. L'extrait brut a été séparé de manière séquentielle par chromatographies de filtration sur gel en milieu organique avec des colonnes telles que Sephadex LH-20, -60 et Merkogel OR-6000. Après étalonnage des poids et des activités, la dernière colonne Merkogel a donné un seul pic d'une masse moléculaire de 3300 Da, dénommée DH-A (Isobe et coll., 1973). Le résidu restant après la première extraction a été repulvérisé et extrait une deuxième fois avec le même solvant et purifié à l'aide des mêmes chromatographies. La deuxième chromatographie sur Merkogel a donné un seul pic (DH-B) d'une masse moléculaire de 2000 Da (Kubota et coll., 1979).

Les pics DH-A et DH-B ont été à nouveau purifiés par chromatographie d'échange d'ions, par focalisation isoélectrique et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), technique qui venait d'être mise au point. Ces chromatographies ont permis de purifier davantage la DH (Imai et coll., 1982). A ce stade, le matériel actif était en quantité si infime qu'aucune autre purification n'a été réalisée.

Nous avons à nouveau récolté 8 millions de têtes de mâles (environ 8 kg) et commencé l'extraction et la purification de la DH selon le protocole établi précédemment. Il fallut plus de deux ans pour préparer les fractions partiellement purifiées DH-A et DH-B. Avec le développement de nouveaux systèmes HPLC, la purification a été poursuivie pendant 10 ans mais n'a permis d'isoler aucune espèce de molécules de DH malgré nos efforts continus.

Isolement de l'hormone de diapause à partir de ganglions suboesophagiens disséqués :

A la fin de 1986, nous avons décidé de reprendre ce travail à l'aide d'une nouvelle stratégie tenant compte des progrès de la chimie des peptides et de la biologie des neuropeptides. La purification a commencé par la dissection d'un complexe composé de SG et du premier ganglion suboesophagien issus de chrysalides âgées de 0 jours à l'aide d'une pince et d'un microscope. Un complexe pèse environ 50 µg en poids frais, aussi la dissection de l'organe donne-t-elle une purification 500 fois supérieure à celle obtenue avec l'extraction à partir d'une tête entière. Nous avons récolté environ 100 000 SG par an et les avons utilisés comme matériel de départ pour l'isolement de la DH (Imai et coll., 1991 ; Sato et coll., 1992).

Les organes disséqués ont été homogénéisés dans de l'éthanol et la DH extraite avec de l'eau bouillante. La fraction aqueuse a été purifiée par une chromatographie liquide à haute performance en phase inversée sur une colonne de gel TSK et la DH a été isolée sous la forme d'un seul pic après la deuxième HPLC (Fig. 1). Le pic n'a jamais été divisé par aucune des différentes chromatographies en colonne, ce qui démontre que la DH a bien été isolée. Avec 55 000 SG comme matériel initial, ce protocole a donné environ 800 ng de DH et permis une purification de l'ordre de 600 000 fois. L'injection de la DH isolée (30 ng/chrysalide) a induit des oeufs diapausants chez environ 25 % des oeufs (Imai et coll., 1991 ; Sato et coll., 1992).

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HORMONE DE DIAPAUSE

Le séquençage chimique par dégradation Edman de la DH purifiée suggère que ce peptide est composé de 24 résidus d'acides aminés. Cette séquence a été confirmée par séquençage des fragments libérés après digestion par la protéase V8. Cependant, aucune identification pour l'acide aminé en position n° 19 n'a été obtenue et on a donc émis l'hypothèse que cet acide aminé était la Cys car on sait que la Cys est souvent cassée par la dégradation Edman.

Pour confirmer cette structure de la DH, nous avons synthétisé chimiquement deux peptides de 24 acides aminés ; l'un des peptides était ouvert à l'extrémité C et l'autre était amidé. Aucune activité biologique n'a été observée avec le peptide non amidé, alors que le peptide amidé a fait apparaître une activité comparable à celle de la DH isolée (Fig. 3). Nous en avons donc conclu que la DH des vers à soie est un peptide amidé de 24 acides aminés composé comme suit :

Thr-Asp-Met-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp-Arg-Gly-Ala-His-Ser-
Glu-Arg-Gly-Ala-Leu-Trp(Cys)-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH_2

CLONAGE DE L'ADNc ET DEDUCTION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HORMONE DE DIAPAUSE

Les informations obtenues sur la structure primaire de la DH nous permettent d'isoler des clones d'ADNc codant pour la DH, ce qui devrait faciliter la confirmation de la structure de la DH et l'étude de l'expression du gène de la DH dans les cellules neurosécrétrices du SG.

Sur la base de cette séquence d'acides aminés, nous avons synthétisé l'oligonucléotide que nous avons utilisé comme sonde afin de trier la bibliothèque d'ADNc construite avec les ARN poly(A^+) issus des SG. Quatre clones positifs ont été isolés et l'ADNc le plus long (0,8 kb) a été séquencé (Fig. 2). La séquence a révélé que l'ADNc code pour un peptide composé de 192 acides aminés d'une masse moléculaire de 22 kDa. Dans cette séquence, le peptide de la DH est situé entre le 24e et le 47e acide aminé et est suivi d'un triplet d'acides aminés : Gly^{48}-Lys^{49}-Arg^{50}. Cette séquence de la DH déduite montre clairement que l'acide aminé en position 19 est le Trp (Bom DH-I[19-Trp]) et non Cys (Bom DH-I[19-Cys]). De plus, la séquence triplet semble fournir un site pour la maturation moléculaire de la DH par clivage tryptique à Lys^{49} et par amidation de l'extrémité C Leu par Gly^{48} (Sato et coll., 1992).

Nous avons à nouveau synthétisé chimiquement le peptide amidé avec le Trp^{19} (Bom DH-I[19-Trp]) et déterminé son activité biologique (Fig. 3). Son activité est comparable à celle observée avec la DH naturelle et avec la Bom DH-I[19-Cys], bien que la Bom DH-I[19-Cys]) présente une activité légèrement supérieure à forte dose. En outre, la Bom DH-I[19-Trp] a été isolée à partir des extraits de complexes SG-cerveau préparés avec des chrysalides de 2 à 3 jours (Sato et coll., 1992). On en a donc conclu que Bom DH-I[19-Trp] était une molécule de DH bien que l'on ignore si Bom DH-I[19-Cys] est également une DH naturelle.

Nous avons synthétisé chimiquement divers fragments de molécule de DH afin de déterminer la relation entre structure et activité. Une activité significative mais faible, représentant environ 1/1000 de l'activité de la DH intacte, a été observée avec pentapeptide amidé à l'extrémité C. L'activité augmente en fonction de l'allongement de la longueur de la chaîne (données non publiées).

LA PROTEINE PRECURSEUR DE L'HORMONE DE DIAPAUSE

Une recherche d'homologie assistée par ordinateur a révélé que la protéine précurseur de la DH était une polyprotéine commune, à partir de laquelle de multiples neuropeptides sont libérés. Le SG du ver à soie sécrète le neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone (Bom PBAN) qui stimule la production de la phéromone sexuelle, le bombycol, dans les glandes à phéromone des papillons femelles. On a isolé deux PBAN (Bom PBAN-I et Bom PBAN-II) à partir de têtes d'adultes femelles et déterminé qu'il s'agissait respectivement de peptides amidés de 33 et 34 acides aminés (Kitamura et coll., 1989, 1990). Dans la séquence déduite, le peptide Bom PBAN-I a été prolongé de Leu^{126} à Leu^{158} et Bom PBAN-II de Arg^{125} à Leu^{158}. Ces deux séquences peptidiques sont suivies par Gly et flanquées par un acide aminé basique, ce qui implique la maturation moléculaire de PBAN par clivage tryptique et amidation de l'extrémité C, comme cela se produit au cours de la maturation de la DH (Sato et coll., 1993).

Récemment, chez les criquets (Schoofs et coll., 1991, 1992) et les blattes (Holman et coll., 1991 ; Nachman et coll., 1991), plusieurs neuropeptides présentant une activité tropique des muscles viscéraux ont été isolés à partir de cellules neurosécrétrices de SG et de cerveaux et ont été dénommés myotropine et pyrokinine. Tous ces peptides ont un peptide commun (Phe-Xxx-Pro-Arg-Leu-NH_2, FXPRL-NH_2) à leur extrémité C et appartiennent ainsi à la famille des peptides amidés FXPRL. Cette région pentapeptidique constitue la structure noyau pour l'expression de leur activité biologique (Nachman et coll., 1991). Etant donné que la Bom-DH et les Bom-PBAN possèdent également le FXPRL-NH_2 à leur extrémité C, ces deux peptides sont aussi membres de la famille des peptides FXPRL-NH_2. La séquence FXPRL a été observée dans trois régions de la protéine précurseur de la DH (α-, β- et γ-SGNP dans la figure 2). et ces trois peptides sont suivis par Gly et liés par l'acide aminé basique. De ce fait, ces peptides sont également libérés du peptide précurseur de la DH pour

donner leur polypeptide mature respectif (Sato et coll., 1993). Ces peptides putatifs n'ont aucune homologie séquentielle avec des peptides connus.

Pour confirmer la production de ces peptides supposés dans le SG, nous avons tenté de les isoler à partir d'extraits de SG en utilisant le peptide synthétisé chimiquement comme substance de référence pour l'isolement HPLC. A ce jour, on a pu démontrer l'existence de α- et γ-SNGP dans le SG sous une forme mature (Sato et coll., 1993). Nous avons synthétisé ces peptides chimiquement et testé leur activité biologique. On a observé une activité phéromonotropique et une activité myotropique chez α-, β et γ-SGNP (résultats non publiés) mais aucune activité marquée de la DH n'a été identifiée chez ces peptides (Sato et coll., 1993). Ces résultats indiquent que ces neuropeptides jouent un rôle dans le système de régulation d'une fonction inconnue du SG.

STRUCTURE ET EXPRESSION DU GENE DE L'HORMONE DE DIAPAUSE

En utilisant l'ADNc de la protéine précurseur de la DH comme sonde, nous avons isolé trois insertions d'ADN positives à partir de la banque génomique du ver à soie (λ-EMBL3). On a démontré par cartographie physique à l'aide de digestion aux enzymes de restriction que ces trois clones portent des portions différentes en plus d'une région où ils se chevauchent mutuellement. Le séquençage a révélé que le gène isolé mesure environ 8 kb de longueur totale et comporte 6 exons interrompus par 5 introns. Par comparaison avec la séquence d'ADNc, la molécule de DH est codée dans le premier et le second exon et le PBAN dans le quatrième et le cinquième exon (données non publiées).

La spécificité tissulaire de l'expression de ce gène a été examinée par analyse en "northern blot" à l'aide de l'ADNc radiomarqué (Sato et coll., 1993). Le signal positif a été localisé à la position 0,9 kb, correspondant à la longueur totale de l'ADNc et observé seulement dans le SG des chrysalides et des imagos quel que soit le sexe (Fig. 4). On en a donc conclu que le gène de la DH s'exprimait dans les cellules neurosécrétrices du SG, ce qui confirme, du point de vue endocrinologique, que le SG est le seul organe sécrétant de la DH chez le ver à soie.

Review

SILKWORM BREEDING IN INDIA

S.N. CHATTERJEE

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

A. HISTORICAL BACKGROUND

1. The heritage of silk in India dates back to the chalcolithic age. A Pali text on Buddhist literature of the pre-Christian era (700-550 BC) describing the scene on *Nirvana*, in fact described the mastery of silk weaving and silk dyeing by craftsmen of the upper Gangetic plain (Rhys Davis, 1903). The importance of the upper Gangetic plain is evident from the facts that the Pali word for silk essentially means fabrics of *Benaras* (*Kaseyyaka*). However, it is most probable (Datta, 1988) that a major portion of the silk output in India at that time was from different wild/semiwild species of silkworms. Silk became more evident in Pali, Roman and Sanskrit literature during 500 to 100 BC (Warmington, 1928 ; Ghurye, 1951) and today also. Silk is an integral component of Indian culture and life style.

2. Till the eleventh century, sericulture or the art of making silk fabrics remained as an "ardently guarded secret" tradition of a few countries. But Japan was pioneer in giving scientific attention to the subject during the late Edo (1603-1868) and Meiji periods (1868-1912). This is particularly relevant to the science of silkworm breeding and breakthrough in the utilisation of hybrid vigour in the silkworm (Yokoyama, 1957).

3. In India, since the medieval period, different facets of sericulture used to get the patronage from all kings and emperors (as evidenced from Pali and Sanskrit texts) but breeding of silkworm primarily was in the hands of rearers and egg producers (Datta, 1984). However, as detailed by Mukherjee (1912), a rudimentary concept of different races of silkworm for different areas and different seasons was in vogue in the Gangetic plains of Bengal, for example in Midnapore, a southern district of Bengal and bearer of the heritage of the famous port of Tramalipti (Warmlington, 1928), *Boropalu* used to be reared in spring, while *Cheenapalu*, or *Bulupalu*, was reared in seasons other than winter. Likewise, in other parts of Murshidabad and Bhirbhum, farmers used to prefer *Desipalu*, *Nistari* or *Madrasipalu* (Mukherjee, 1912).

B. IMPORTANCE OF SERICULTURE IN INDIA

4. Sericulture turning into an industry became quite evident from records on export of silk yarn from India to various countries (Datta and Chatterjee, 1991). The British Raj particularly was much interested in sericulture due to the world situation concerning China and Japan, a situation arising out of the world war and also to collect raw materials for textile industry in his own home (Gopalachar, 1978).

5. In independent India, sericulture was given importance, initially to promote export, but this time exported material was not raw silk but finished fabrics. Today, in spite of the attainment of industrial development, the importance of sericulture in India has further increased primarily for rural development, generation of self-employment and export earning (Datta, 1988). Moreover, with our new look at environmental issues, the importance of sericulture gets further highlighted. This is further evident from plan allocation by the Government of India (Table I).

Table I. Progress of sericulture in India through five-year plans since Independence.

Tableau I. Evolution de la sériciculture en Inde en fonction des plans quinquennaux depuis l'Indépendance.

Allocations approved for sericulture development (in million rupees)				Production of raw silk (M. tonnes)
Plan	States	Central	Total	
Subventions allouées pour le développement de la sériciculture (en millions de roupies)				*Production de soie grège (tonnes)*
Plan	*Etats*	*Central*	*Total*	
1st plan / *1er plan*	4.60	1.42	6.02	1,486
2nd plan / *2e plan*	37.92	3.52	41.44	1,695
3rd plan / *3e plan*	55.20	15.00	70.20	2,065
4th plan / *4e plan*	83.90	13.03	96.93	2,894
5th plan / *5e plan*	169.32	86.12	255.54	3,711
6th plan / *6e plan*	1363.70	400.00	1763.70	7,672
7th plan / *7e plan*	2400.00	700.00	3100.00	8,787
8th plan / *8e plan*	5835.50	2772.10	8067.60	21,400*

* Suggested target / *Objectif proposé.*

C. SCIENCE OF SILKWORM BREEDING

6. The importance of silkworm breeding as a science was duly realised by Japan, and science contributed greatly to the development of sericulture. However, till some time back this development of technology was highly guarded and the language also acted as a great barrier in this affair. It must be indicated that the technology of breeding developed by Japan was primarily meant for temperate areas and economically developed countries.

7. But today, it is increasingly evident that sericulture can be an important tool for rural/tribal development programmes, programmes for wasteland development and afforestation. Incidentally, all these, to a major extent, are the concerns of poor countries of the third world and such countries are primarily in tropical/subtropical zones of the world.

8. The need for developing technology specific for tropical sericulture in developing countries is very urgent. This is because the transplantation of technology from temperate zones and transferring a technology suitable to the high economy status to poor developing countries of the tropics and subtropics may not be at all ideal. This may serve the interest of the technology-donor nation but may not serve the interest of the country receiving the technology transplantation. Today, while developing technology, not only do we have to take into account the agroclimates but also have to consider the economic status of the technology users.

D. ORGANISED R & D SUPPORT FOR IMPROVING SILKWORM BREEDING IN INDIA

Period 1890-1940

9. The patronage of the British Raj during the early decades of the 20th century not only helped in establishing Sericulture Training Schools or Sericultural Research Institutes, but also brought sericulture in the mainstream of science (Ghosh, 1949). Regarding the progress in silkworm breeeding, Ghosh (1949) detailed the status of the subject for the Gangetic plain of West Bengal, southern India (especially Mysore) and for northern and north-western temperate zones.

I. For Gangetic plains of Bengal :

10. For sericulture in Bengal, the major achievement in silkworm breeding during this period was the creation of new "Fixed Multivoltine Hybrids". By crossing *Nistari*, *Chotapalu* races with a univoltine Italian race and following selection for removing undesirable characters, new multivoltines, *Nistid* and *Nismo*, were developed. In fact, *Nismo* was developed through backcrossing *Nistid* with an Italian race. Using a similar procedure, several other new multivoltines were also developed by Ghosh (1949) in Burma and other areas under British rule.

11. Effort was also made for introduction of F_1 hybrids of traditional *Nistari* and *Chotopalu* as well as F_1 hybrids between *Nistari* or *Borapalu* and *Nistid* and *Nismo*. However, due to a lack of proper seed organisation, the use of F_1 hybrids could not be popularised to a great extent.

II. For Mysore area :

12. An effort was made to stabilise temperate univoltine and bivoltine races in the Mysore region. Through a unique initiative of Department of Sericulture, F_1 hybrids, between females of multivoltine *Mysore* race and males of univoltine race, was successfully introduced as early as the 1930s (Ghosh, 1949 ; Nanavathy, 1965). However, at a later stage most probably, some univoltine Chinese (*Shi*) × Japanese (*Nichi*) was stabilised in Mysore or other places and crosses used to be raised between males of such race and females of *Mysore* race. The present day *C' nichi* (*C* most probably denotes a degenerated form of '*Shi*' - meaning Chinese) may be such a stabilised form of highly productive Chinese × Japanese hybrid (Chatterjee *et al.*, 1992b).

III. For northern India :

13. This area is a representative of temperate sericulture in India and utilised univoltine or bivoltine silkworm races from France and Italy. Regional Department of Sericulture also tried to maintain these races for further utilisation (Ghosh, 1949 ; Tazima, 1958) and in later days also tried to utilise F_2 of imported F_1 hybrids. As expected, these attempts were not met with the desired result and new Indian bivoltine/univoltine races came into existence some time later.

Period 1940-1960

14. The breeding technology applied during the period is in fact a continuation of the process earlier initiated. Using multivoltine *Nistari*, *Pure Mysore* races and exotic races from Italy, Russia (*Azerbajian*), Japan (*Sokaginri*, *Hokka-Ginryu*) or China (*Nang Nung* etc.), several new multivoltines with improved cocoon characters were evolved. These races were *Ichot*, *Itan*, *D14b*, *D3c*, *MBDIV*, *MBDV* (Sengupta *et al.*, 1971). This development was primarily meant for sericulture in Bengal. Also of interest to note is the introduction of rearing of F_1 hybrids of *Nistari* and bivoltine hybrids during the winter season (Sengupta and Datta, 1973).

15. Using a similar breeding technology, in Mysore an attempt was made in two directions :

a. to evolve new improved multivoltines and

b. to introduce new multi × bivoltine hybrids (of Japanese and Chinese origin).

16. The major achievement during the period was for temperate zones. Harada from Japan evolved two bivoltine breeds from Japanese and Japanese × Chinese crosses suitable to Indian conditions. These two races, *Kalimpong A* and *Kalimpong B* still are popular commercially. The former was derived from $N_{122} \times C_{110}) \times (N_{124} \times C_{124})$ while the latter was evolved from $N_{501} \times N_{502}$. Efforts were also made to stabilise progenies of crosses like $C_{108} \times J_{122}$, *Changnung* $\times J_{122}$, *Nang Nung 6D* $\times J_{122}$, *Shungetsu* $\times$ *Hosho* and a few others (Sengupta and Datta, 1973).

Period 1960-1980

I. In southern India :

17. During this period Indian sericulture scientists realised the need for developing total package for tropical sericulture. Concerted efforts were made not only to improve upon "silkworm breeding but also to evolve a technology of silkworm rearing and new mulberry varieties to support the high-yield potential of improved silkworm breeds along with agronomical package" (Krishnaswami, 1988). This in fact brought about a radical change in the productivity realisation (Table II).

Table II. Overview of production and productivity of mulberry silk in India during 40 years.

Tab!eau II. Panorama de la production et de la productivité de la soie mûrier en Inde pendant 40 ans.

Year	Production		Productivity	
	Cocoons (× 1000 MT)	Raw silk (MT)	Renditta	Raw silk per ha.
Année	*Production*		*Productivité*	
	Cocoons (× 1000 tonnes)	*Soie grège (tonnes)*	*Rendement à la bassine*	*Soie grège par ha.*
1949-50	16.00	969 (100)*	-	15.0
1969-70	20.57	1,758 (181)	15.1	17.9
1979-80	55.90	4,193 (433)	13.3	26.5
1989-90*	110.19	10,756 (1,110)	10.24	38.2

The figures in parentheses indicate the growth index of raw silk from the base year.
Les chiffres entre parenthèses indiquent l'indice de croissance de la soie grège à partir de l'année de base.
* Includes tasar silk also / *Soie tasar comprise.*

18. The most important aspect was that the work on silkworm breeding for high-yielding bivoltine/univoltine stocks which was earlier restricted to temperate areas like Kalimpong, Dehradun, Kashmir, etc., was brought down to plain areas. This time scientists of Central Sericulture Research and Training Institute (CSRTI), Mysore, put their efforts in breeding silkworm for high-yielding hybrids comparable to that of Japan. Krishnaswami and his collaborators were successful in evolving several high-yielding strains with regular diapause. This heralds the introduction of the concept of

using F_1 crosses between oval and dumbbell lines and the group showed that strains comparable to Japanese bivoltine hybrids can be reared in plains also (Krishnaswami, 1988 ; Datta, 1988). The breeding plans of these strains (e.g., *NB7*, *NB18*, *NB4D2*) are given in Fig. 1-2.

19. Prior to the evolution of high-yielding univoltine (=univoltine/bivoltine) breeds at CSRTI, Mysore, Narayanan and his group (Narayanan *et al.*, 1967) were successful in evolving several high-yielding multivoltines (e.g. *Kolar gold*, *Kollegal Jawan*, *Mysore Princess*) from the double cross (*Pure Mysore* × *Nang Nung 6D*) × *SH* (Japanese), only.

20. This was accompanied with the evolution of *Tamilnadu white*, another improved multivoltine to replace *Pure Mysore* in sericulture zones of Tamil Nadu, erstwhile Madras Presidency. Several other groups also worked on the evolution of improved multivoltines in South India (Sidhu, 1967 ; Narasimhanna and Gururajan, 1965).

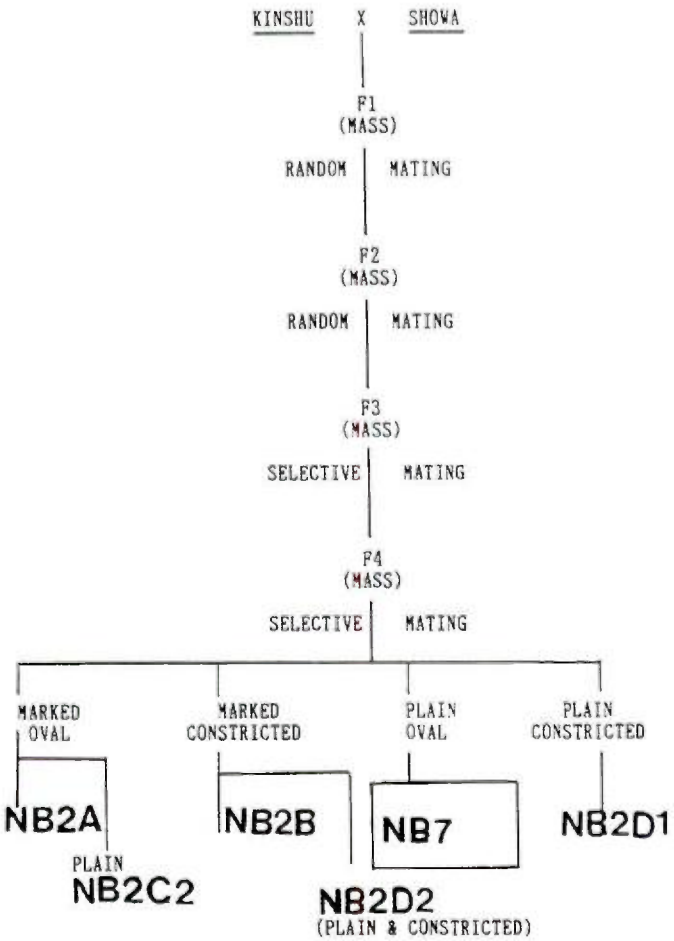


Fig. 1 : Breeding plan from which NB_7 was derived.

Fig. 1 : Plan de sélection à partir duquel NB_7 a été obtenu.

II. In Bengal, plains and hills :

21. Bengal sericulture gradually became differentiated into two components : temperate hill areas and plains. The former started practising bivoltine sericulture, the latter mainly remained as an area for low- or medium-yielding breeds/hybrids. However, at a later date farmers started using hybrids of temperate zones during winter months (Tazima, 1958 ; Sengupta and Datta, 1973). Nonetheless, emphasis remained with the evolution of improved multivoltines. CSRTI, Berhampore, in the process, developed various strains using *Nistari* and other exotic strains or stabilised segregants of exotic hybrids (Table III).

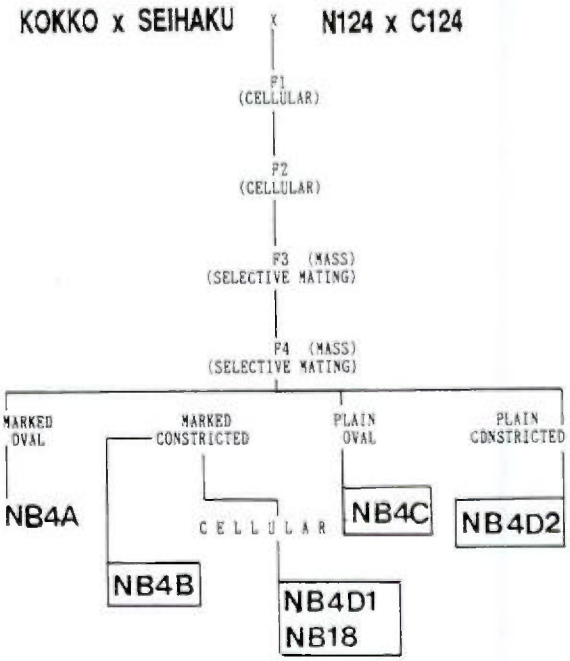


Fig. 2 : Layout of breeding plan from which NB_4D_2 and NB_{18} were derived.

Fig. 2 : Schéma du plan de sélection à partir duquel NB_4D_2 et NB_{18} ont été obtenus.

22. However, after 1972, a new dimension was added and mutation breeding programme was adopted. The approach was to evolve beneficial mutations through X-ray and chemicals and using those beneficial mutants in further cross-breeding programmes (Datta *et al.*, 1975, 1978, 1981). Those attempts gave rise to several CB lines at CSRTI, Berhampore, and the strains were characterised by golden yellow colour and dumbbell or oval-shaped cocoons. However, an attempt was also made to generate "noise" through X-irradiation at a very low dose and then adopt simple selection (Chatterjee *et al.*, 1980) and one of the lines later got popularised as a hybrid with *Nistari* (*Nistari* × *G-race*).

Table III. Rearing performance of the lines under six race breeding plans*.

Tableau III. Performance d'élevage des lignées de six plans de sélection*.

Line (F_{10} generation)	Yield/10000 larvae brushed		Single weight (g)	
	No.	Wt (g)	cocoon	shell
Lignée (génération F_{10})	*Rendement/10000 larves levées*		*Poids (g)*	
	Nombre	*Poids (g)*	*d'un cocon*	*d'une coque*
K (W2)	2542	2411	0.92	0.13
L (Y2)	2454	2329	0.86	0.12
L (Y3)	2246	1853	0.72	0.10
M (Y1)	4591	4199	0.92	0.14
M (W1)	4198	4683	1.07	0.18
M (W3)	4381	4011	0.94	0.15
N (Y2)	3918	3551	0.86	0.13
N (Y3)	3650	3418	0.90	0.15
N (W1)	2839	2587	0.86	0.13
O (Y2)	3385	3034	0.96	0.15
O (Y3)	3318	2628	0.84	0.13
O (W1)	2769	2792	0.94	0.15
P (Y1)	3281	3045	0.90	0.14
Nistari	8841	7089	0.75	0.10

* From Sengupta and Datta (1973) / *D'après Sengupta et Datta (1987).*
K = (Nistari × J_{122}) female / *femelle* × Japanese male / *mâle.*
L = (Nistari × Japanese) female / *femelle* × ($N_{122}.C_{110} \times N_{124}.C_{124}$) male / *mâle.*
M = (Nistari × Shungetsu × Hosho) female / *femelle* × ($N_{122}.C_{110} \times N_{124}.C_{124}$) male / *mâle.*
N = (Nistari × $N_{122}.C_{110} \times N_{124}.C_{124}$M) female / *femelle* × Japanes male / *mâle.*
O = (Nistari × (B × A) × (Nong Nun6D × J_{122}) female / *femelle* × ($N_{122}.C_{110} \times N_{124}.C_{124}$) male / *mâle.*
P = (Nistari × Chang Nung.$J_{122} \times C_{108}.C_{122}$) female / *femelle* × ($N_{122}.J_{110} \times N_{124}.C_{124}$) male / *mâle.*

III. In Kashmir Valley :

23. Following the approach initiated by Harada in 1958 at Regional Sericultural Station, Kalimpong, scientists in Jammu and Kashmir as also in Dehradun (hill areas of Uttar Pradesh) took up various breeding programmes for evolving univoltine and bivoltine strains. Such attempts gave rise to *Pampore* series (*Pampore-5*, etc.), *BL* series (e.g. *BL*) and *Jam* series (Table IV).

Period 1980 onwards

24. The breakthrough in rearing high-yielding bivoltine hybrids in plains was able to attract international assistance in the dissemination of the technology far and wide. However, at the adoption level instead of bivoltine hybrids (oval × dumbbell breeds, e.g. *KA* × *NB_4D_2*) being accepted by farmers, the F_1 hybrid of *Mysore* and dumbbell lines *NB_4D_2* or *NB_{18}* became highly popular. This happened not only in Karnataka (erstwhile Mysore State) but the concept also spread to the adjacent non-traditional States of Andhra Pradesh, Tamilnadu, Maharashtra and Kerala (Krishnaswami, 1988). In fact, even today more than 75 % of the silk yarn produced in India is contributed by these silkworm

hybrids (Chatterjee and Datta, 1989 ; Datta and Chatterjee, 1991). This aspect led Central Silk Board to analyse ground realities (Bivoltine Task Force Report, 1988) and several aspects came to the fore :

a. bivoltine hybrids are much superior in absolute yield potential, but at farmers' level, only 35 to 40 % of this potential can be realised ;

b. whereas for multivoltine × bivoltine hybrids, the yield gap is only 8-10 % at farmers' level ;

c. indigenous races (e.g. *Nistari*, *Pure Mysore*, *C' nichi*, *Moria*, etc.) have acquired certain genetic endowments more adaptive to the Indian situation ;

d. India being a poor country, it is extremely difficult to provide the requisite infrastructure, hygiene and management prescribed under the total package (detailed earlier) for bivoltine sericulture adoption (Datta, 1988 ; Datta and Chatterjee, 1991) by the majority of the farmers of the traditional sericultural tracts ; and

e. it was also felt that in India, silkworm genetics has been an area of total neglect and to address various critical issues of silkworm breeding technology in India, research in various aspects of silkworm genetics need to be strengthened (Datta, 1992 ; Chatterjee, 1992).

E. NEW DIRECTIONS FOR SILKWORM BREEDING IN INDIA

25. Responding to the analysis of ground realities and taking various other aspects into consideration, Central Silk Board inspired scientists to have a new look at the situations in silkworm breeding *vis-à-vis* the need of sericulture industry. Scientists of CSR & TI, Mysore, during 1989-90 initiated the effort to formulate breeding strategies to match the need of the industry as also the constraints highlighted by ground realities. Consequently, the following were accepted as *prima facie* :

a. India needs silk yarn (comparable to that realised from Japanese bivoltine/univoltine) of high neatness, evenness, cohesion and tensile strength for new diversification in textile industry.

b. The high-yielding (diapausing) hybrids presently available do not have adaptability comparable to that shown by multi × bivoltine hybrids.

c. Differential germload tolerance also contributes to the lower adaptability of high-yielding bivoltine (univoltine) strains in India (Chatterjee and Datta, 1989 ; Datta, 1989).

d. Different agroclimates influence the yield potential of various silkworm breeds/hybrids.

e. Differential socio-economic status limits the input capacity for sericulture.

f. A large portion of sericultural tracts in India does not have assured irrigation throughout the year and incidentally such areas need greater attention from the point of view of rural development.

g. Besides hardiness, low-yielding tropical races have excellent sensory properties, such as gloss, etc., as well as physical properties like heat-insulating property, water absorbability (Miki and Murakami, 1989).

26. On the basis of preliminary evaluation of varying agroclimates, potential areas for sericulture were categorised into 4 different zones having different potential of yield :

Zone 1 : Hill areas with high rainfall and cool climate (e.g. Western Ghat of Karnata, Maharashtra and Kerala, Tarai region in Uttar Pradesh, north-eastern region).

Zone 2 : Plain areas with assured irrigation (e.g. southern plateaus, north Gangetic plains, North-Eastern belt, southern Madhya Pradesh).

Zone 3 : Plain areas with semi-assured irrigation (some specific zones in the southern plateau and southern Madhya Pradesh).

Zone 4 : Semi-arid zones having uncertain rainfall and dry spell during December to May (e.g. parts of interior Karnataka, Madhya Pradesh and Maharashtra).

F. STEPS TAKEN TO ADDRESS OBJECTIVES SPECIFIED EARLIER

27. In order to address the objectives specified earlier and to provide support from silkworm breeding, CSR & TI, Mysore, took steps to utilise the breeds already developed or obtained from other

countries for specific areas and to formulate new breeding strategies. Attempts will be made to enumerate the achievements realised in these aspects and work initiated in new directions.

Improving productivity for dry zones :

28. As indicated elsewhere, a large number of farmers in the semi-arid zones of Karnataka regularly rear *Pure Mysore* × *C' nichi* having a productive potential of 18-20 kg of cocoons per 100 layings and a shell ratio of 12-14 % (14.0 cg). Farmers of these areas cannot afford to entertain a high risk factor. It was envisaged that a marginal improvement in the productivity of the hybrid combination for these areas would be of help to the farmers as also to the reelers. However, the requirement of such areas is again limited by the high temperature during March to May and high temperature tolerant breed is an essential requirement for the period. Accordingly, Chinese low-yielding breeds and traditional multivoltine races of India (*Pure Mysore* × *Nistari*) were utilised to have a new breeding plan (Fig. 3). The institute released several such breeds, of which RD_1 hybrids and MY_1 hybrids are becoming more and more popular among the farmers (Table IV).

Table IV. Performance of new low/medium-yielding hybrids in semi-arid and hot areas of southern States.

Tableau IV. Performance des nouveaux hybrides à rendement faible/moyen en régions semi-arides et chaudes des Etats du sud.

Combination	Yield/100 disease-free layings	Shell ratio	Return/ 100 dfls
Combinaison	*Rendement/ 100 pontes saines*	*Richesse soyeuse*	*Gain pour 100 pontes saines*
PM × C' nichi	14.4	12.2	1362=25
$MY_1 \times NB_{18}$	35.4	17.5	4602=00
$RD_1 \times NB_{18}$	26.2	16.5	3456=20
$P_2D_1 \times NB_{18}$	52.9*	17.6	5744=50
$PCN \times NB_{18}$	21.6	16.0	2808=00

* On limited trials (500 disease-free layings) / *Tests à petite échelle (500 pontes saines).*

29. It was further argued that improvement of the yarn quality with special reference to neatness and uniformity in denier may further increase the value of the output. With this background, a new breeding programme was initiated after analysing the reeling parameters for various low-yield breeds (Chatterjee *et al.*, 1992). The results showed (Table V) that even using the low-yielding breeds of China and India neatness can be improved to the desired level. Low-yielding breeds with cocoon weight ranges from 1 to 1.3 g are generally characterised by a low silk ratio percentage of 10-14. Recently, adopting recombination breeding effort were also made to raise the silk ratio percentage above 16 (Table VI).

For hill areas with high rainfall and cold climate :

30. Such areas of Western Ghats, Eastern Ghats and other comparable areas in north-eastern and southern Madhya Pradesh are very congenial for utilising high-yielding hybrids with a yield potential

of 60-80 kg having average cocoon and shell weights of 1.8-2.0 g and 0.30-0.35 cg, respectively. It was agreed that improvement of silk ratio percentage further, without increasing the cocoon weight, would make the rearing of such hybrids more remunerative. With this idea, scientists of CSR & TI, Mysore, initiated new oval breeds : *CC1* and *CA2*. The breeding technology adopted differs from that of earlier workers in that the breeding resource materials used were all oval lines (Fig. 4). Further providing the breeding generation with mulberry leaf of proper nourishment, the breeders were successful in selecting genotypes with higher contribution to shell ratio. These breeds are proposed as oval component of F_1 hybrids with NB_4D_2 or NB_{18}.

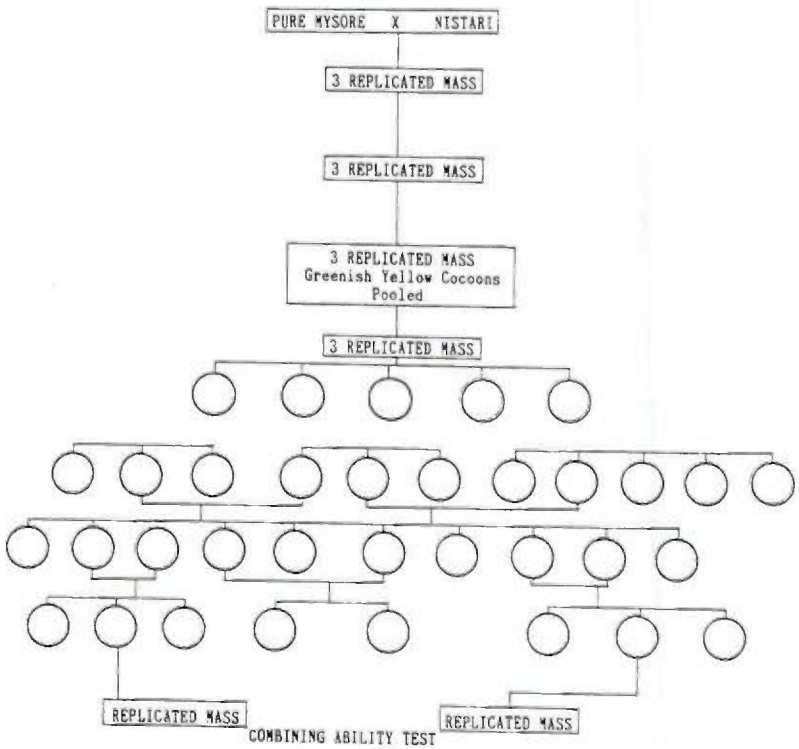


Fig. 3 : Breeding plan indicating evolution of the low-yielding breed MY_1.

Fig. 3 : Plan de sélection montrant l'évolution de la souche à faible rendement MY_1.

Improving adaptability of high-yielding breeds with better yarn quality :

31. As indicated elsewhere, adaptability of high-yielding breeds to tropical agroclimates and low level of management is the most crucial issue for India. To address the issue, geneticists and breeders of CRS & TI, Mysore, adopted different approaches to generate basic information, to test the information for their use in silkworm breeding and to adopt new breeding plans based on the rational analysis of information already available. New directions in research towards developing/improving breeding technologies may be defined as follows :

- genetical dissection of hardiness in tropical races and possible identification of biochemical markers for breeding ;
- understanding the genetics of disease resistance in the silkworm and possibility of obtaining markers for disease resistance ;
- use of a wider genetic base to improve the genetical latitude of adaptability ;
- use of selection pressure during breeding generations for improving adaptability ;
- introduction of shuttle breeding to increase the latitude of tolerance to environmental fluctuations ;
- improving upon our understanding of genetics of quantitative traits contributing to the yield of silk and quality of silk ;
- applications of different breeding/selection methods to increase productivity along with adaptability ;
- paving the way for identification of specific chromosomal segments and their transfer and introgression in germline, i.e. to initiate the breeding with tagging the genes of importance.

Table V. Improvement of fibre characters.

Tableau V. Amélioration des caractères liés à la fibre.

	F_1			F_6		
	Neatness (%)	Cocoon weight	Silk ratio (%)	Neatness range (%)	Cocoon weight (g)	Silk ratio (%)
		F_1			F_6	
	Netteté (%)	*Poids du cocon*	*Richesse soyeuse*	*Fourchette de netteté (%)*	*Poids du cocon (g)*	*Richesse soyeuse*
1. FC1	71	1.345	15.5	80-91	1.12	16.5
2. FC2	77	1.240	13.2	79-87	1.00	16.0
3. FC3	75	1.372	12.2	80-85	1.00	14.5
4. FC5A	80	0.865	16.5	83-87	0.99	16.0
5. FC5B	80	-	-	83-88	1.00	16.0
6. FC6	67	0.916	14.8	81-91	1.01	14.5
7. FC7	71	1.038	14.8	77-90	1.00	17.5

General understanding of hardiness :

32. The higher adaptability of low-yielding tropical silkworm strains is a well known fact (Tazima, 1958 ; Chatterjee and Datta, 1989 ; Datta, 1989). Geneticists of CSR & TI, Mysore, since 1986 have tried to throw light on this aspect, and works on correlation/interactions of biochemical traits and quantitative parameters led to the identification of digestive amylase in silkworms as having great significance to survival (Chatterjee *et al.*, 1989). It was further shown that while digestive amylase has a strong positive linear correlation with survival, invertase in the digestive juice has a negative linear correlation with survival. Experiments were also initiated to test whether digestive amylase can be used as a marker for breed. Results showed a positive trend and the results in Table VII show the performance at Regional Experimental Lab (RSRS). However, it is to be admitted that further

test breeding works are to be taken up to improve upon the shell ratio. In this regard, Chatterjee *et al.* (1992c) further showed that alkaline phosphatase and invertase have positive contributory effects for shell weight as also shell ratio. Future results on breeding with these biochemical markers opt to throw more light on this aspect.

Table VI. Performance of new lines (for improving shell weight and shell ratio).

Tableau VI. Performance de nouvelles lignées (pour l'amélioration du poids de la coque et de la richesse soyeuse).

Line	Larval duration		ERR no./ 10000 larvae		Cocoon weight (g)		Shell ratio (%)		Filament length		Denier	
	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6
Lignée	*Durée larvaire*		*ERR/ 10000 larves*		*Poids du cocon (g)*		*Richesse soyeuse (%)*		*Longueur du filament*		*Denier*	
	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6	F_1	F_6
HS2A	22:00	20:10	6520	8671	1.014	1.075	16.9	17.0	531	538	2.20	2.00
HS2B		20:09		8776		1.122		19.3		722		1.87
HS3A	22:03	20:21	6560	9786	1.073	1.187	18.4	17.9	544	676	2.11	1.86
B5A	21:00	20:06	8040	9407	1.102	1.291	12.0	15.1	482	615	1.67	2.04
B5B		20:02		9065		1.156		15.0		608		1.92
B5C		20:06		9216		1.251		16.3		416		2.81

ERR : Effective rate of rearing / *Taux effectif d'élevage.*

Genetical understanding of disease resistance :

33. Scientists of CSR & TI, Mysore, during 1990 initiated a work in this regard and the information available so far in this regard clearly points out that there are two aspects :

i) general immunity in the silkworm ;

ii) specific marker gene(s) for resistance to specific pathogens.

34. Studies around the world confirm the existence of an antibacterial and antiviral immunity system in the silkworm. The significance of red-fluorescent protein (RFP) in immunity already was established by Japanese scientists and recent work at CSR & TI, Mysore (Sethuraman, 1991) showed prospect of identifying gene-system and their ultimate use in silkworm breeding. Similarly, works on antibacterial at NISES, Tsukuba, CSR & TI, Mysore (Datta *et al.*, 1991), as also in other laboratories are expected to contribute towards breeding for disease resistance.

35. With regard to specific gene(s) for resistance, Japanese as also Chinese scientists have already identified and localised two dominant genes (*Nid 1* and *Nid 2*) and one recessive gene (*nsd* : linkage 21) denoting resistance to viral pathogens. Taking the cue from their work, scientists of Breeding Laboratory at CSR & TI, Mysore, first started screening varied silkworm stocks for differential resistance to nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection. The results so far obtained show the prospect of identifying homozygous stocks having higher resistance to NPV (Chatterjee *et al.*, unpublished). However, in such a breeding technology, the availability of purified stocks of viral pathogens is very

important, as it was shown by Japanese that pathogen sample of DNV (denso-nuclear virus) thought to be uniform type was later proved to be a mixture of DNV1 and DNV2.

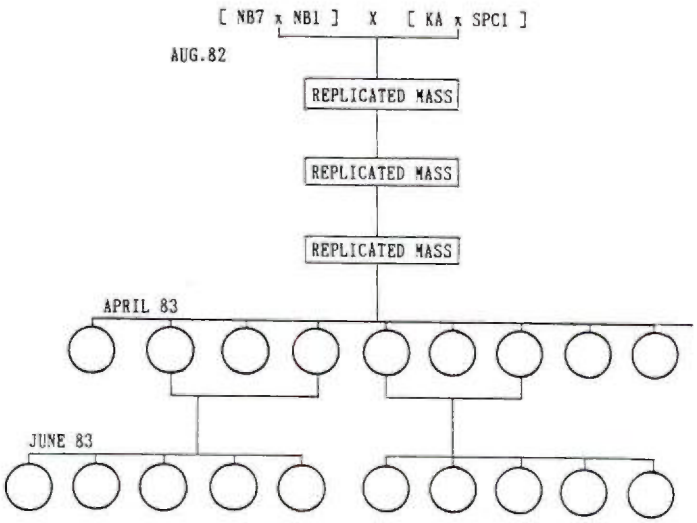


Fig. 4 : Breeding plan adopted for evolving a new oval breed (CC_1).

Fig. 4 : Plan de sélection adopté pour la mise au point d'une nouvelle souche à cocons ovales (CC_1).

Widening of the genetic basis to improve adaptability :

36. Examination of earlier breeding plans revealed that most of the breeding plans for high-yielding breeds were dependent on only a few Japanese × Chinese hybrids (single or double). Thus the breeding resources were examined and Russian, Korean, Brazilian, European, Japanese and indigenous Pampore-5 were selected. Data (Table VII) on general combining ability (GCA) recombinational programmes were planned using Brazilian, *IZHMD*, *Pampore-5*, *European B*.

Use of selection pressure for adaptability :

37. In India as also elsewhere, during the breeding procedure maximum efforts are made to provide all possible congenial climatic, nutritional and management input for the expression of commercially important quantitative characters. However, such procedures do not provide the necessary condition(s) for the selection of genes or genotypes contributing to higher survival. Recently, this aspect has been duly given importance by Japanese breeders.

38. The breeding plan adopted recently included the essential component of providing selection pressure in the form of crowding and reducing the number of feeds. The usual technology of rearing for breeding prescribes 250 larvae (from IV instar onwards)/6 sq. ft area. Presently, breeding for improving general adaptability, the same space was provided for 400 larvae. Data (Table VIII) show that even in F_1 hybrids, breeds evolved without selection pressure have a lower survival than the breeding lines developed through the maintenance of crowding pressure. However, further hybrid testing is necessary for proper comparative evaluation. Likewise experiments are also initiated to determine the suitability of other selection pressures (e.g. high temperature, high humidity) for incorporating into the breeding technology.

Table VII. Performance of new breeds at Regional Research Stations.

Tableau VII. Performance des nouvelles souches dans les stations régionales de recherches.

Breed	Reared by		Fecundity	Cocoons/disease-free layings		Cocoons per kg	Effective rate of rearing (%)
				Number	Wt (g)		
Souche	*Elevées par*		*Fécondité*	*Cocons par ponte saine*		*Cocons par kg*	*Taux effectif d'élevage (%)*
				Nombre	*Poids (g)*		
290	RSRS, Salem	Minimum	325	256	310	733	95.1
		Maximum	565	516	570	1157	98.8
	RSRS, Chamarjanagar	$\overline{m}$*	436	267	269	993	63.6
	CSRTI, Mysore	Minimum	350	472	610	696	94.4
		Maximum	540	480	690	774	96.0
390	RSRS, Chamrajnagar	$\overline{m}$*	457	376	339	1108	89.0
	CSRTI, Mysore	Minimum	510	483	622	729	96.6
		Maximum	670	487	664	783	97.4
490A	RSRS, Salem	Minimum	445	216	236	849	47.3
		Maximum	584	384	381	1008	90.7
	RSRS, Chamrajnagar	$\overline{m}$*	498	409	373	1096	92.9
	CSRTI, Mysore	Minimum	415	448	558	803	89.6
		Maximum	505	433	580	833	96.6
490B	RSRS, Chamrajnagar	$\overline{m}$*	531	396	369	1073	84.7
	CSRTI, Mysore	Minimum	510	479	528	829	95.8
		Maximum	610	490	578	926	98.0
490C	RSRS, Chamrajnagar	$\overline{m}$*	541	362	331	1093	74.6
	CSRTI, Mysore	Minimum	520	425	488	771	85.0
		Maximum	640	467	572	895	93.4
590A	RSRS, Salem	Minimum	438	177	235	736	39.2
		Maximum	724	563	690	964	94.5
	RSRS, Kodathi	Minimum	434	320	430	650	65.4
		Maximum	622	532	790	757	98.7
	CSRTI, Mysore	Minimum	501	483	746	641	96.6
		Maximum	635	492	756	660	98.4
590B	RSRS, Salem	Minimum	520	233	527	442	59.6
		Maximum	610	556	781	771	95.7
	RSRS, Kodathi	Minimum	526	305	510	462	59.8
		Maximum	631	610	1160	622	98.6
	CSRTI, Mysore	Minimum	569	488	908	506	97.6
		Maximum	633	491	966	537	98.2

Continued / *Suite page suivante*

Table VII (continued) / *Tableau VII (suite).*

Breed	Reared by		Fecundity	Cocoons/disease-free layings		Cocoons per kg	Effective rate of rearing (%)
				Number	Wt (g)		
Souche	*Elevées par*		*Fécondité*	*Cocons par ponte saine*		*Cocons par kg*	*Taux effectif d'élevage (%)*
				Nombre	*Poids (g)*		
690	RSRS, Coonoor	Minimum	641	476	881	538	79.1
		Maximum	749	525	976	542	84.1
	CSRTI, Mysore	Minimum	680	441	712	581	88.2
		Maximum	731	493	848	619	93.6
890	RSRS, Coonoor	Minimum	556	318	628	506	50.4
		Maximum	655	484	957	506	84.8
	CSRTI, Mysore	Minimum	620	492	834	541	98.4
		Maximum	698	493	912	590	98.6
990	RSRS, Coonoor	Minimum	568	349	519	663	66.3
		Maximum	720	515	755	682	95.8
	CSRTI, Mysore	Minimum	564	489	764	620	97.8
		Maximum	706	492	790	644	98.4
1090A	RSRS, Coonoor	Minimum	579	447	790	557	72.0
		Maximum	736	526	933	574	90.0
	CSRTI, Mysore	Minimum	626	471	656	638	94.2
		Maximum	677	482	756	718	96.4
1090B	RSRS, Kodathi	Minimum	518	460	800	511	92.2
		Maximum	590	556	990	626	97.5
	RSRS, Coonoor	Minimum	383	205	362	530	61.6
		Maximum	615	462	859	572	87.3
		Minimum	635	484	816	559	96.8
		Maximum	698	491	878	593	98.2

$\overline{m}$: Mean / *Moyenne.*
* Consolidated data / *Données consolidées.*

Introduction of shuttle breeding :

39. In India, high- to medium-yielding breeds are evolved in the laboratory where only a limited population is reared and, as indicated earlier, the maximum feasible congenial input are given. New approaches tried to incorporate the programme of taking breeding materials to Region Stations during F_{10}. This provides opportunity to spread the population and also provides scope to subject the breeding materials to selection pressure of low management, fluctuating environmental situations. The data in

Table IX show the performance of some breeding materials reared at RSRS under the shuttle breeding programme.

Table VIII. Performance of F_4-F_5 generations of new breeding plans (with selection pressure of crowding) and performance of other combinations evolved without selection pressure.

Tableau VIII. Performance des générations F_4-F_5 obtenues à partir de nouveaux programmes de sélection (soumises à une sélection par stress de surpopulation) et d'autres combinaisons isolées sans pression de sélection.

Combination *Combinaison*	Larvae after III ecdysis *Larves après la 3e ecdysis*	Larval duration *Durée larvaire*	Cocoons harvested *Cocons récoltés*	Cocoon weight (g) *Poids du cocon (g)*	Shell weight (cg) *Poids de la coque (cg)*	Shell ratio *Richesse soyeuse*
I. Breeds developed without crowding pressure :						
I. Souches développées sans pression de surpopulation :						
A_3	300	22:06	175	1.98	41.5	21.0
A_6	300	22:06	198	1.84	40.0	21.7
B_9	300	22:11	266	1.64	35.5	31.7
B_{910}	300	22:06	283**	1.55	33.8	21.8
NB_{18}	300	22:19	252	1.51	30.9	20.5
$NB_{\overline{7}}$	300	22:23	214	1.49	29.5	19.8
$B_3 \times A_4$	300	21:20	221	2.43	49.6	20.4
$B_8 \times A_3$	300	21:20	201	2.17	47.8	22.0
$NB_{18} \times A_4$	300	21:12	261	2.35	51.0	21.7
$NB_{18} \times A_6$	300	21:12	189	2.29	48.1	20.9
II. Breeding lines developed through selection with crowding pressure :						
II. Lignées sélectionnées isolées par pression de surpopulation :						
935 (F_4)	400	21:07	370**	1.56	35.4	22.6
930 (F_4)	400	22:00	267**	1.33	29.1	21.3
931 (F_4)	400	22:00	393**	1.52	32.9	21.6
932 (F_4)	400	21:00	390**	1.53	30.6	20.1
9128B (F_5)	400	20:06	387**	1.60	35.6	22.2
916A (F_5)	400	21:06	376**	1.39	29.0	20.9
916B (F_5)	400	21:00	371**	1.50	31.8	21.2
913C (F_5)	300	19:20	289	1.20	24.3	20.2

* In earlier generations F_{3-4}, the same crowing pressure was given / *Les générations précédentes F_{3-4} ont été soumises à la même pression de surpopulation.*

** Crops with 90 % survival against III ecdysed larvae kept / *Récoltes comprenant 90 % de survie par rapport aux larves conservées en sortie de 3e ecdysis.*

Improving upon our understanding of genetics of quantitative traits :

40. In Japan, various works were taken up since the 1950s to estimate the heritability of various quantitative traits in the spring and summer seasons. An attempt was also made to ascertain the minimum number of dominant K-factor for various yield traits (Nino *et al.*, 1990 ; Gamo and

Hirabayashi, 1983 ; Gamo *et al.*, 1985). In India also, various works were earlier carried out on the combining ability and heritability of several quantitative characters (Pershad *et al.*, 1986 ; Datta and Pershad, 1988 ; Krishnaswami *et al.*, 1964 ; Jose, 1991 ; Kalpana, 1991). However, so far no information is available on the linkage between yield traits and other morpho-biochemical markers or to ascertain the extent of genetic control of quantitative characters related with the yield of silk yarn and their quality. For such characters additive polygenic control was suggested by Nino *et al.* (1990) and others. But no attempt was made to test the assumption.

Table IX. Performance of some new breeds evolved with selection pressure reared at Regional Sericultural Research Station, Bangalore, during fixation of cocoon shape and shell ratio.

Tableau IX. Performance de certaines souches nouvellement isolées par pression de sélection et élevées à la station régionale de recherches séricicoles de Bangalore durant la fixation de la forme du cocon et de la richesse soyeuse.

Combination *Combinaison*	Actual number of harvested cocoons/ disease-free laying *Nombre effectif cocons récoltés/ ponte saine*	Average yield/ disease-free laying *Rendement moyen par ponte saine (g)*	Shell weight (g) *Poids de la coque*	Silk ratio (%) *Richesse soyeuse (%)*
690 (15)	359	605	0.36	19.8
890 (15)	382	650	0.31	20.7
990 (15)	452	690	0.38	19.9
1090A (4)	537	936	0.33	18.8
1090B (15)	375	605	0.34	20.1

The number in parentheses denotes the number of layings reared / *Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de pontes élevées.*

41. Thus, it is very important to initiate in-depth genetical analysis of quantitative traits. Under the recent Biotechnology Seminar on Silkworm Genetics and Biotechnology held at Mysore, India, this aspect has been strongly highlighted and specific programmes to identify the genes with major effect for filament length, denier and neatness are planned. The ultimate objective is to pave the way for mapping quantitative trait loci (QTLs) as done for many other agricultural crops (Eltson and Stewart, 1973 ; Chatterjee, 1992). Works on association and/or linkage between morphological markers and quantitative traits have also been taken up at CSR & TI, Mysore, the results of which are expected to provide more information on practical breeding (Chatterjee, 1992).

Application of different breeding/selection methodologies :

42. During the last fifty years, vast enrichment of the science of breeding has been made possible for plants and other materials and the information is available internationally. It is imperative that scientists of India and other countries having similar problems should test the efficacy of various breeding strategies to address various problems for tropical and subtropical areas. Such strategies include recurrent selection, recombination breeding, mutation breeding, breeding through stress or backcross breeding with indigenous robust materials.

Paving the way for transfer and introgression of specific gene(s) in breeds :

43. The new advancement in DNA technology opened new avenues for adopting more direct means for the transfer of specific gene(s) contributing to disease resistance, resistance to specific parasites or genes linked with specific productivity factors. However, these require the basic step of identifying and isolating the genetic material carrying either the QTLs or other specific gene systems as indicated above and this eventually involves the mapping of the total genome (Datta, 1989). A work in this direction has also been initiated at CSR & TI, Mysore, and in three other sericultural countries (Goldsmith, 1991).

Need for better characterisation of breeding resources :

44. During the last five decades, in India, materials were received from various sources and an attempt has also been made towards cataloguing them based on the information available on receipt of the materials. However, it is well accepted that today characterisation of breeding resource materials and grouping them into meaningful clusters are the two most vital aspects of cataloguing. Furthermore, it is also to be admitted that systematic modalities are yet to be developed for proper conservation of the breeding resource. Preliminary examinations revealed that during the breeding process a large number of sublines were derived, out of which one or two ultimately came for commercialisation and mass multiplication. In many cases also, the characters were changed from that observed at the time of receipt. It is also to be indicated that most of the breeding resource materials obtained or collected from various sources were basically hybrid combinations of different genetic constitution. Obviously, their proper maintenance is an extremely difficult job. Recent studies in the breeding and genetics laboratories of CSR & TI, Mysore, stress these aspects indicated above (Chatterjee and Datta, 1992 ; Chatterjee *et al.*, 1992c). Nonrealisation of a large degree of heterosis in Indian hybrids suggests the absence of a wide variation among the high-yielding breeds. This aspect is applicable also to other countries in need of developing a silkworm breeding technology.

G. BREEDING TECHNOLOGY FOR OTHER SILKWORM SPECIES

45. As indicated elsewhere, India has the unique heritage of utilising four other silkworm species. The silkworm breeding of these species has great significance for tribal development, afforestation and maintenance of ecological balance. Accordingly, attention is paid to the R & D programme connected with the use of other silkworm species in India. However, very little can be said about the breeding technology for non-mulberry silkworm species in India.

Tropical tasar (*Antheraea mylitta*) :

This species has about 30 ecotypes over a large area covering parts of West Bengal, Bihar, pockets in Uttar Pradesh, Madhya Pradesh, eastern Orissa, northern Andhra Pradesh, Maharashtra and southern Karnataka. Earlier, seed organisations for farmers used specific ecotypes of that zone. For example, *Daba* in Bihar, *Modal* and *Bogai* in Orissa, *Railey* and *Jhabua* in Madhya Pradesh, *Andhra Local* in Andhra Pradesh, *Bhandara* in Maharashtra. However, the breeders after 1975 introduced a resource material from a small pocket, Sukindagarh of Orissa, to various tasar silkworm rearing States. This attempt had temporary success.

47. During 1982-85, using more than one ecotype and following recombination breeding, efforts were made to improve the adaptability of the material under difficult conditions. Three of these races, i.e. *Nagri 1*, *Nagri 2* and *Nagri 3*, were popularised during 1983-85 in Orissa, Maharashtra and Bihar. Efforts were also made during the time to introduce recurrent selection as also selection of a particular population showing association of high survivability and high silk ratio percentage. With the increasing deforestation, the resource material of tasar is dwindling at a very fast rate. Without a proper infrastructure and creation of isolated pockets in specific forest areas for releasing tasar moths and monitoring their stabilisation, the unique resource material for *A. mylitta* will be lost. Further, for this species also, studies on the genetic characterisation of ecotypes need to be augmented. This is important not only to India but also to other sericultural countries because this provides a source of unique gene pool available only in India.

Oak tasar in India :

48. India had several other wild species of *Antheraea* but did not have any other species similar to the oak tasar silkworm of China or Japan. However, in 1970s Jolly and his group were successful in establishing a hybrid of *A. roylei* from the sub-Himalayan belt and *A. pernyi* (Chinese tasar). This was named as *A. proylei* (Jolly) and was introduced as temperate tasar for utilisation of the natural flora of oak species abundant in North-West and North-Eastern India.

The muga silkworm, a unique material :

Sericulture in Brahmaputra valley may be as old as 4000 years and the muga silkworm is a unique example of domestication where the larvae are reared outside but for cocooning, the worms need to be brought inside the house. This silkworm has another uniqueness in that so far neither the silkworm nor its food plant have been reported anywhere outside Brahmaputra valley and Tarai land of Nepal.

Recently, an attempt was made to collect cocoons from forests and also from different areas of North Eastern India. However, a systematic breeding programme is yet to be initiated for improvement of cocoon characters and ultimately to increase the production to a level of export earning.

The eri silkworm, silk for the poor in India :

50. It (*Philosamia ricini*) is a completely domesticated species. As it was mostly used for spinning, the potential of its utilisation remained restricted. However, rich nations like Japan are interested in utilising eri silk for stockings and undergarment. In India, except for evolving a 'white cocoon' variety, very little has been done so far in the area of breeding. It is not an impossible task to change the character of yarn as also the spinning behaviour of the eri silkworm. What is required is a proper planning to be adopted as a priority. However, it may be mentioned that the Department of Biotechnology, Government of India, is aware of the potential as also the scope in this area and several areas of priority are already identified for consolidating R & D inputs.

CONCLUDING REMARKS

51. The present communique is an attempt to present a brief glimpse of the long heritage of silk in India and an attempt towards self-criticism. As indicated elsewhere, till some time back, silkworm breeding used to be considered as an art rather than an area of science. However, looking at the vast achievement realised in different areas of agriculture and animal breeding, one can strongly hope to develop a breeding technology on a firm basis of science, the fruits of which will help in developing technologies in other areas of insect breeding. It is true that sericulture does not only involve production of cocoons but also the physical and chemical properties of the silk yarn (which again has a complicated protein structure). But it is also to be admitted that in comparison to the vast amount of studies on genetics and experimental breeding conducted on other areas of breeding involving plants and animals, the work so far carried out in silkworms in India or other tropical countries is extremely meagre. International attention to the issue would be apt to boost up the morale of the scientists engaged in generating information on silkworm breeding technology in various Asian and Pacific countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his gratitude to Mr P.S.S. Thomas, IAS, Member Secretary, for his help in enabling to interact with scientists of Vietnam, Korea, Thailand, Philippines and Bangladesh at an ESCAP meeting. The author also acknowledges the kind help received from Dr R.K. Datta in writing this review. Help from Dr Rammohon Rao, Dr A.K. Patnaik, Dr S.K. Aswath and Miss Balamba for preparing the manuscript is also acknowledged.

DEDICATION

Dedicated to the memory of Sri Hariprasad Chatterjee, my jamindar-cum burgeoise grandfather who lost much for his hobby of breeding new varieties of roses and jasmine.

REFERENCES

CHATTERJEE S.N. (1992) Strengthening research on silkworm genetics in India. Base paper presented in 'Brainstorming Meeting on Genetics and Biotechnology in Silkworm and Mulberry' held at CSR & TI, Mysore, India.

CHATTERJEE S.N., CHATTERJEE G.K., RAO G.P., NIRMAL KUMAR S., SUNDAR B. (1989) Variability of digestive amylase in mulberry silkworm. CSR & TI News Letter, 3(4), 84(1).

CHATTERJEE S.N., DATTA R.K. (1989) The growth and importance of biotechnology : an overview. Indian Silk, 28, 60-67.

CHATTERJEE S.N., DATTA R.K. (1992) Hierarchical clustering of 54 races and strains of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. : significance of biochemical parameters. Theor. Appl. Genet., 85, 394-402.

CHATTERJEE S.N., DATTA R.K., SENGUPTA K. (1980) Use of X-ray in inducing beneficial mutations in multivoltine silkworm, *B. mori*. Proc. Seminar on Sericulture held in Tamilnadu, India.

CHATTERJEE S.N., RAMMOHON RAO P., JAYASWAL K.P., RAMAKRISHNA S., DATTA R.K. (1992a) New breeding approaches to improve productivity through recombination breeding. Proc. Nat. Conf. on Mulberry Sericulture, India. pp. 96-97.

CHATTERJEE S.N., RAMA MOHANA RAO P., JAYASWAL K.P., RAVINDRA SINGH, DATTA R.K. (1992) Genetic variability in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., breeds with low silk yields. Indian J. Seric., 32(1), 69-86.

CHATTERJEE S.N., RAO G.P., CHATTERJEE G.K., ASHWATH S.K., PATNAIK A.K., DATTA R.K. (1992c) Correlation between yield and biochemical parameters in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Theor. Appl. Genet., (accepted).

DATTA R.K. (1984) Improvement of silkworm races, *Bombyx mori* L., in India. Sericologia, 24(3), 393-415.

DATTA R.K. (1988) Report of task force on bivoltine sericulture development. Central Silk Board, India.

DATTA R.K. (1989) Improving productivity of Indian silk. Base paper presented in 'Brainstorming Meeting on Biotechnology in Sericulture', New Delhi, India.

DATTA R.K. (1992) Scenario of biotechnology research at CSR & TI, Mysore, India. Welcome address in 'Brainstorming Meeting on Genetics and Biotechnology in Silkworm and Mulberry', Mysore, India.

DATTA R.K., ABRAHAM E.G., NAGARAJU J. (1991) Induced antibacterial proteins in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 31(Suppl.), 68.

DATTA R.K., CHATTERJEE S.N. (1991) Sericulture research and its impact in India. Sericologia, 31(4), 605-615.

DATTA R.K., DAS S.K., PAL D.C., SENGUPTA K. (1981) Evolution of superior multivoltine breeds through mutation breeding. Proc. Seric. Symp. and Seminar, Tamilnadu Agricult. Univ., India, 39-49.

DATTA R.K., PERSHAD G.D. (1988) Combining ability among multivoltine × bivoltine silkworm (*Bombyx mori*) hybrids. Sericologia, 28(1), 21-29.

DATTA R.K., SAMADDAR S., GANGULY A. (1975) Proc. II All India Congr. Cytol. Genet., 1, 38-39.

DATTA R.K., SENGUPTA K., DAS S.K. (1978) Induction of dominant lethals with ethyl methane sulphonate in male germ cells of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Mutation Res., 56, 299-304.

ELSTON R.C., STEWART J. (1973) The analysis of quantitative traits for simple genetics models for parental F_1 and backcross data. Genetics, 73, 695-711.

GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative traits by diallel cross in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. J. Breed., 33(2), 178-190.

GAMO T., OTSUKA Y., FUJISHIMA T., HIROKI T., TAZIMA T. (1985) Estimation of combining ability and genetic analysis by diallel crosses between regional races of the silkworm : rearing performance and cocoon yields. Misc. Publ. Nat. Inst. Sericult. Entomol. Sci., 126, 93-138.
GHOSH C.C. (1949) Silk production and weaving in India. CSIR Monograph, India.
GHURYE G.S. (1951) *In* Indian Costumes. The Popular Book Depot Publ. G.R. Bhathkal.
GOLDSMITH M.R. (1991) The *Bombyx* genome mapping project. Sericologia, 31(Suppl.), 24-25.
GOPALACHAR A.R.S. (1978) Three decades of sericulture progress : Sericulture industry in India - Potential and prospects. Publ. by Central Silk Board, India.
JOSE J. (191) Inheritance studies of quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L. Dissertation submitted to CSR & TI, Mysore, India.
KALPANA G.V. (1991) Quantitative analysis of the pattern of inheritance of post-cocoon parameters in silkworm, *Bombyx mori*. Dissertation submitted to CSR & TI, Mysore, India.
KRISHNASWAMI S. (1988) Development of appropriate technology for sericulture in India. Proc. Int. Congr. on Tropical Sericulture Practices, Bangalore, India.
KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., SUBBA RAO S. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races of silkworm. Indian J. Genet. and Plant Breed., 24(3), 212-222.
MIKI M.A., MURAKAMI A. (1989) An attempt to introduce the polyvoltine race in silkworm breeding : Physical nature of silk fibre or protein structure as a genetic character. Proc. VI Int. Congr. SABRAO, 973-976.
MUKHERJEE N.G. (1912) Handbook of sericulture. Govt. Book Depot, Calcutta, India.
NANAVATHY M.M. (1965) Silkworm from grub to glamour. Paramount Publishing House, Bombay, India.
NARASIMHANNA M.N., GURURAJAN N.K. (1965) Contribution to the genetics of silkworm, *Bombyx mori* : Synthesis of a new race of *Bombyx mori*. J. Mysore. Univ., 28(1 & 2), 38-43.
NARAYANAN E.S., SONWALKAR T.N., NATARAJA N. (1967) Studies in the variability of denier throughout the reelable length of the bave in the exotic and indigenous mulberry cocoons. Indian J. Seric., 2(1), 89-93.
NINO T., EGUCHI R., SHIMAZAKI A., SHIBUKAWA A. (1990) Estimation of combining ability by diallel crosses in the sex-limited yellow cocoon strains of the silkworm, *Bombyx mori*. Acta Seric. Entomol., 13, 1-26.
PERSHAD G.D., DATTA R.K., BHARGAVA S.K., VIJAYAKUMAR H.V., JOLLY M.S. (1986) Combining ability analysis in multivoltine races of *Bombyx mori* L. Sericologia, 26(3), 307-315.
RHYS DAVIDS (1903) Buddhist India. Published in London.
SENGUPTA K., DATTA R.K. (1973) Studies on the evolution of superior multivoltine breeds of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Presented at Int. Silk Congress held in Barcelona.
SENGUPTA K., DATTA R.K., BISWAS S.N., SINGH B.D. (1971) Studies on the heterosis in multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Yield performances of F_1 hybrids of Nistari and four evolved multivoltine hybrids. Indian J. Seric., 10(1), 6-13.
SETHURAMAN B.N. (1991) Isolation and characterisation of antiviral factor(s) in silkworm, *Bombyx mori*. Dissertation submitted to CSR & TI, Mysore, India.
SIDHU N.S. (1967) A multivoltine breed of silkworm, *Bombyx mori* L., for tropics in evolution. Indian J. Seric., 1(2), 64-67.
TAZIMA Y. (1958) Report on sericulture industry in India. Publ. by Central Silk Board, India.
WARMINGTON E.H. (1928) Commerce between the Roman Empire and India. Cambridge University Press.
YOKOYAMA T. (1957) On the application of heterosis in Japanese sericulture. Int. Genetics Symp.. Cytologia (Suppl.), 527-531.

Revue

LA SELECTION DU VER A SOIE EN INDE

S.N. CHATTERJEE

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

A. HISTORIQUE

1. L'histoire de la soie en Inde remonte à la période du chalcolithique, époque à laquelle un texte en pali sur la littérature bouddhiste de l'ère pré-chrétienne (-700 à -550 av. J.-C.) décrivant la scène du *Nirvana*, présentait en fait l'art du tissage et de la teinture de la soie par des artisans des hautes plaines du Gange (Rhys Davids, 1903). L'importance de cette région est manifeste car le mot "soie" en pali signifie "tissus de *Benaras (Kaseyyaka)*". Cependant, la majeure partie de la soie produite en Inde à cette époque provenait très probablement (Datta, 1988) de différentes espèces sauvages ou semi-sauvages de vers à soie. De -500 à -100 av. J.-C., la soie est citée dans des textes palis, romains et sanscrits. De nos jours, la soie fait partie intégrante de la culture et du mode de vie indiens.

2. Jusqu'au XIXe siècle, la sériciculture, ou l'art de faire des tissus de soie, est restée la tradition secrète "farouchement gardée" de quelques pays. Le Japon a été le premier pays à aborder ce sujet d'un point de vue scientifique à la fin de la période *Edo* (1603-1868) et au cours de la période *Meiji* (1868-1912). Ceci concerne particulièrement la science de la sélection du ver à soie et l'utilisation de la vigueur hybride chez le ver à soie (Yokoyama, 1957).

3. En Inde, depuis le Moyen-Age, les différents aspects de la sériciculture étaient sous le mécénat des rois et des empereurs (comme le montrent les textes palis et sanscrits) mais l'élevage des vers à soie était essentiellement aux mains des éleveurs et des producteurs d'oeufs (Datta, 1984). Cependant, d'après Mukherjee (1912), les éleveurs des plaines gangétiques du Bengale avaient une notion rudimentaire du concept de l'élevage de différentes races de vers à soie en fonction des régions et des saisons. Par exemple, à Midnapore (district méridional du Bengale où se trouve le célèbre port de Tramalpiti) (Warmington, 1928), la race *Boropalu* était élevée à l'automne, tandis que la race *Cheenapalu*, ou *Bulupalu*, était élevée en toutes saisons, sauf en hiver. De même, dans d'autres régions de Murshidabad et de Bhirbhum, les paysans préféraient les races *Desipalu*, *Nistari* ou *Madrasipalu* (Mukherjee, 1912).

B. IMPORTANCE DE LA SERICICULTURE EN INDE

4. L'industrialisation de la sériciculture est évidente à la lecture des rapports d'exportations de fils de soie d'Inde vers divers pays (Datta et Chatterjee, 1991). L'empire britannique s'est particulièrement intéressé à la sériciculture du fait de la situation internationale concernant la Chine et le Japon, une situation due à la guerre mondiale, et aussi parce qu'il cherchait à obtenir des matières premières pour l'industrie textile en métropole (Gopalachar, 1978).

5. Après l'indépendance, l'Inde a accordé beaucoup d'importance à la sériciculture originellement pour promouvoir l'exportation, le matériel exporté n'était plus de la soie grège mais des tissus finis. Aujourd'hui, malgré les progrès du développement industriel, l'importance de la sériciculture en Inde s'est encore accrue car elle ouvre des perspectives de développement rural, de création de petites entreprises et de revenus à l'exportation (Datta, 1988). De plus, notre nouvelle approche des problèmes liés à l'environnement se traduit par une revalorisation de la sériciculture,

comme le montrent les subventions allouées par le gouvernement indien en fonction des plans quinquennaux (Tableau I).

C. LA SCIENCE DE L'ELEVAGE ET DE LA SELECTION DU VER A SOIE

6. Le Japon a le premier pris conscience de l'importance de l'élevage et de la sélection du ver à soie en tant que science et cette prise de conscience a fortement contribué au développement de la sériciculture. Cependant, jusqu'à récemment, ce développement technologique était étroitement protégé, le langage constituant également une barrière non négligeable. A cet égard, il faut préciser que la technologie de l'élevage et de la sélection mise au point par le Japon était initialement destinée aux zones tempérées et aux pays à économie forte.

7. Toutefois, aujourd'hui, il est de plus en plus évident que la sériciculture peut constituer un outil important dans le développement des zones rurales, de mise en valeur des terres non cultivées et de reboisement. Il se trouve que ces problèmes concernent en grande partie les pays du tiers monde qui se situent surtout dans les zones tropicales et subtropicales du globe.

8. Il est essentiel de développer rapidement une technologie spécifique de la sériciculture tropicale dans les pays en voie de développement. De fait, le transfert de technologies adaptées au niveau économique élevé des zones tempérées vers les pays défavorisés des zones tropicales et subtropicales ne constitue pas nécessairement la solution la plus appropriée. Il peut servir les intérêts des pays donneurs de technologies mais pas ceux des pays qui les reçoivent. Aujourd'hui, il devient nécessaire, pour élaborer des technologies, non seulement de prendre en compte les conditions agro-climatiques mais également le niveau économique des utilisateurs de ces technologies.

D. ORGANISATION DU SECTEUR RECHERCHE-DEVELOPPEMENT POUR L'AMELIORATION DE LA SELECTION DU VER A SOIE EN INDE

De 1890 à 1940

9. Au cours des premières décennies du XXe siècle, le gouvernement de l'empire britannique a non seulement permis, par son soutien financier, l'établissement des écoles de formation en sériciculture et des instituts de recherches séricicoles mais également d'aborder la sériculture d'un point de vue scientifique (Ghosh, 1949). Pour ce qui concerne les progrès de l'élevage et de la sélection du ver à soie, Ghosh (1949) a fait une étude détaillée de ce sujet pour les plaines gangétiques du Bengale occidental, pour l'Inde du sud (en particulier, Mysore) et pour les zones tempérées du nord et du nord-ouest.

I. Plaines gangétiques du Bengale :

10. Pour ce qui concerne la sériculture au Bengale, la principale réalisation en matière d'élevage et de sélection du ver à soie au cours de cette période a été la création de nouveaux "hybrides polyvoltins fixés" : on a pu isoler les souches polyvoltines *Nistid* et *Nismo* par croisement des races *Nistari* et *Chotapalu* avec une race italienne monovoltine puis sélection jusqu'à élimination des caractères indésirables. En fait, *Nismo* a été isolé par croisement de retour de *Nistid* avec la race italienne. Ghosh a mis au point, à l'aide d'une méthode identique, d'autres polyvoltins à Burma et dans d'autres régions sous contrôle britannique.

11. Des tentatives ont été faites pour introduire des hybrides F_1 des races traditionnelles *Nistari* et *Chotopalu* ainsi que des hybrides F_1 entre *Nistari* ou *Borapalu* et *Nismo*. Cependant, en raison d'un manque de structure de grainage, on n'a pas pu étendre l'utilisation des hybrides F_1.

II. Région de Mysore :

12. On a également tenté de fixer les monovoltins et les bivoltins des régions tempérées dans la région de Mysore. Grâce à une initiative unique du Département de Sériculture, on est parvenu à introduire, dès les années 1930, des hybrides F_1 entre des femelles de la race polyvoltine *Mysore* et des mâles monovoltins (Ghosh, 1949 ; Nanavathy, 1965). A une période probablement ultérieure, un

croisement souche chinoise monovoltine (*Shi*) × souche japonaise (*Nichi*)a été fixé à Mysore ou un autre endroit et on a utilisé des croisements entre des mâles de cet hybride et des femelles de la race *Mysore*. La race *C' nichi* actuelle ("C" étant probablement une forme dégénérée de "Shi" qui signifie "chinois") pourrait être la forme fixée de l'hybride à haute performance chinois × japonais (Chatterjee et coll., 1992b).

III. Nord de l'Inde :

13. Dans cette région, représentative de la sériciculture tempérée en Inde, on utilisait des races de vers à soie monovoltines et bivoltines de France et d'Italie. Le Département régional de sériciculture a également tenté de conserver ces races en vue d'une utilisation future (Ghosh, 1949 ; Tazima, 1958) et, par la suite, d'utiliser des F_2 d'hybrides F_1 importés. Comme on peut s'y attendre, ces tentatives n'ont pas abouti aux résultats escomptés et de nouvelles races indiennes bivoltines/monovoltines sont apparues plus tard.

De 1940 à 1960

14. La technologie de sélection appliquée au cours de cette période reprend le processus initié auparavant. A l'aide de la race polyvoltine *Nistari*, des races *Pure Mysore* et des races exotiques d'Italie, de Russie (*Azerbaijan*), du Japon (*Sokaginri, Hokka-Ginryu*) ou de Chine (*Nang Nung*, etc.), plusieurs races polyvoltines avec des caractères améliorés pour le cocon ont été isolées. Ces races sont : *Ichot, Itan, D14b, D3c, MBDIV, MBDV* (Sengupta et coll., 1971). Ces races étaient initialement destinées à la sériculture du Bengale. Il est également intéressant de noter l'introduction de l'élevage d'hybrides F_1 de *Nistari* et d'hybrides polyvoltins en hiver (Sengupta et Datta, 1973).

15. A l'aide d''une technologie de sélection identique, une tentative a été faite à Mysore dans deux directions :

a) mise au point de nouveaux polyvoltins améliorés, et

b) introduction de nouveaux hybrides polyvoltins × bivoltins (d'origines japonaise et chinoise).

16. La principale réalisation de cette période a concerné les régions tempérées. Harada, du Japon, a isolé deux souches bivoltines à partir de croisements japonais et japonais × chinois adaptées au climat indien. Ces deux races, Kalimpong A et Kalimpong B, sont encore utilisées à l'échelle commerciale. La première est dérivée de $(N_{122} \times C_{110}) \times (N_{124} \times C_{124})$ et la deuxième a été isolée à partir de $N_{501} \times N_{502}$. On a également tenté de fixer la descendance de croisements tels que $C_{108} \times J_{122}$, *Changnung* $\times J_{122}$, *Nang Nung 6D* $\times J_{122}$, *Shungetsu* × *Hosho* et quelques autres (Sengupta and Datta, 1973).

De 1960 à 1980

I. Dans le sud de l'Inde :

17. Au cours de cette période, les chercheurs indiens ont pris conscience de la nécessité de mettre au point un ensemble de techniques pour la sériculture tropicale. Des efforts concertés ont été faits pour améliorer la sélection du ver à soie mais aussi développer une technologie de l'élevage, des variétés nouvelles de mûrier susceptibles de répondre aux besoins des souches de vers à soie améliorées à fort potentiel ainsi qu'un ensemble de techniques agronomiques (Krishnaswami, 1988). Ceci a en effet modifié radicalement la productivité effective.

18. L'aspect le plus important de cette question réside dans le fait que les travaux sur la sélection du ver à soie pour l'obtention de stocks bivoltins/monovoltins, auparavant limités aux régions tempérées comme Kalimpong, Dehradun, Cachemire, etc., ont été introduits dans les plaines. Cette fois, les chercheurs du Central Sericulture Research and Training Institute (CSRTI) de Mysore se sont intéressés à la sélection du ver à soie en vue d'obtenir des hybrides comparables à ceux du Japon. Krishnaswami et ses collaborateurs ont réussi à isoler plusieurs souches performantes ayant une diapause régulière. Ces travaux sont à l'origine du concept de l'utilisation des croisements F_1 entre lignées à cocons ovales et lignées à cocons ceintrés et l'équipe de Krishnaswami a démontré que des

souches comparables aux hybrides bivoltins japonais pouvaient également être élevées en plaines (Krishnaswami, 1988 ; Datta, 1988). Les programmes de sélection de ces souches (par exemple : NB_7, NB_{18}, NB_4D_2) sont présentés dans les figures 1 et 2.

19. Avant l'isolement de souches monovoltines (=monovoltines/bivoltines) au CSRTI de Mysore, Narayanan et son équipe (Narayanan et coll., 1967) ont réussi à isoler plusieurs polyvoltins à haut rendement (par exemple : *Kolar gold*, *Kollegal Jawan*, *Mysore Princess*) en utilisant seulement le croisement double (*Pure Mysore* × *Nang Nung 6D*) × *SH* (Japanese).

20. Parallèlement, on a isolé *Tamilnadu white*, un autre polyvoltin amélioré, pour remplacer *Pure Mysore* dans les zones séricicoles du Tamil Nadu, ancienne Présidence de Madras. Plusieurs autres équipes ont également travaillé sur l'isolement de polyvoltins améliorés dans le sud de l'Inde (Sidhu, 1967 ; Narasimhanna et Gururajan, 1965).

II. Dans les plaines et les collines du Bengale :

21. La sériculture bengali s'est progressivement scindée en deux composants : la zone tempérée des collines et les plaines. La première zone s'est intéressée à la séricilculture bivoltine et la deuxième est restée une zone d'élevage de souches/hybrides à rendement faible ou moyen. Par la suite, les fermiers se sont mis à l'élevage des hybrides des zones tempérées au cours des mois d'hiver (Tazima, 1958 ; Sengupta et Datta, 1973). Néanmoins, les recherches restaient orientées vers le développement de polyvoltins améliorés. Le CSRTI de Berhampore, au cours de ces travaux, a mis au point diverses souches à partir de *Nistari* et d'autres souches exotiques ou des ségrégants stabilisés d'hybrides exotiques (Tableau III).

22. Cependant, après 1972, une nouvelle étape a été franchie et un programme de sélection par mutation a été adopté. L'approche choisie a été d'obtenir des mutations bénéfiques à l'aide de rayons X et de produits chimiques et d'utiliser ces mutants bénéfiques dans des programmes complémentaires de sélection par croisement (Datta et coll., 1975, 1978, 1981). Ces tentatives ont permis d'obtenir plusieurs lignées poly × bi au CSRTI de Berhampore, souches qui se caractérisent par leur couleur jaune d'or et leurs cocons ceintrés ou ovales. Par ailleurs, on a tenté de générer un "bruit" par une faible exposition aux rayons X et ensuite d'adopter une sélection simple (Chatterjee et coll., 1980). L'une des lignées ainsi obtenues a ensuite été répandue comme hybride de *Nistari* (*Nistari* × race *G*).

III. Dans la vallée du Cachemire :

23. Suivant l'approche introduite par Harada en 1958 à la Regional Sericultural Station de Kalimpong, les chercheurs de l'Etat de Jammu et Cachemire ainsi que ceux de Dehradun (collines de l'Uttar Pradesh) ont entrepris divers programmes de sélection visant à mettre au point des souches monovoltines et bivoltines. Ces tentatives ont donné naissance à la série des *Pampore* (*Pampore 5*, etc.), à la série des *BL* (par exemple, *BL*) et à la série des *Jam* (Tableau IV).

A partir de 1980

24. La technique de l'élevage d'hybrides polyvoltins à haut rendement en plaine constitue une avancée capitale qui a permis d'obtenir un soutien international dans la diffusion de cette technologie dans toutes les régions d'Inde. Cependant, au niveau de l'adoption, les fermiers ont préféré, aux hybrides bivoltins (cocons ovales × souches à cocons ceintrés, par exemple $KA \times NB_4D_2$), l'hybride F_1 de *Mysore* et les lignées à cocons ceintrés NB_4D_2 et NB_{18}. Cette attitude a été constatée non seulement au Karnataka (ancien Etat de Mysore) mais a également été observée dans les Etats limitrophes non traditionnels de l'Andhra Pradesh, du Tamilnadu, du Maharashtra et du Kerala (Krishnaswami, 1988). En fait, aujourd'hui encore, plus de 75 % du fil de soie produit en Inde provient de ces hybrides (Chatterjee et Datta, 1989 ; Datta et Chatterjee, 1991). Cet état de fait a incité le Central Silk Board à entreprendre une analyse des réalités du terrain (Bivoltine Task Force Report, 1988) qui a fait ressortir les points suivants :

a) les hybrides bivoltins sont nettement supérieurs du point de vue du potentiel absolu de rendement mais les fermiers réalisent seulement 35 à 40 % de ce potentiel ;

b) alors que l'écart de rendement ne s'élève pas à plus de 8 à 10 % pour les hybrides polyvoltins × bivoltins ;

c) les souches indigènes (par exemple, *Nistari*, *Pure Mysore*, *C' nichi*, *Moria*, etc.) ont acquis certains caractères génétiques plus adaptés au milieu indien ;

d) l'Inde étant un pays pauvre, il est extrêmement difficile d'y introduire les infrastructures nécessaires, les conditions sanitaires et le type de gestion recommandés dans le cadre du programme agronomique (décrit plus haut) pour l'adoption de la sériciculture bivoltine (Datta, 1988 ; Datta et Chatterjee, 1991) ;

e) il a également été remarqué que la génétique du ver à soie est restée pendant longtemps un domaine totalement négligé et l'on a jugé nécessaire de renforcer les recherches sur divers aspects dans ce domaine afin de résoudre certains problèmes critiques de la technologie de la sélection du ver à soie en Inde (Datta, 1992 ; Chatterjee, 1992).

E. DE NOUVELLES ORIENTATIONS POUR LA SELECTION DU VER A SOIE EN INDE

25. A l'issue de l'analyse des réalités du terrain et compte tenu de divers autres aspects, le Central Silk Board a incité les chercheurs à aborder les conditions de la sélection du ver à soie en fonction des besoins de l'industrie séricicole sous un nouvel angle. En 1989-90, les chercheurs du CSRTI de Mysore ont jeté les bases de nouvelles stratégies de sélection susceptibles de répondre aux besoins de l'industrie ainsi qu'aux contraintes mises en évidence par l'analyse des réalités du terrain. En conséquence, les points suivants ont été adoptés a priori :

a) l'Inde a besoin d'un fil de soie (comparable à celui obtenu à partir de bivoltins/monovoltins japonais) de grande qualité de netteté, de régularité, de cohésion et de limite élastique à la traction pour favoriser la diversification de l'industrie textile.

b) Les hybrides performants (diapausants) existant à l'heure actuelle n'ont pas une faculté d'adaptation comparable à celle des hybrides polyvoltins × bivoltins.

c) La différence de tolérance aux germes contribue également à la faible capacité d'adaptation des souches performantes bivoltines (monovoltines) en Inde (Chatterjee et Datta, 1989 ; Datta, 1989).

d) Différents agroclimats influencent le potentiel de rendement des divers souches/hybrides de vers à soie.

e) Les écarts de niveaux socio-économiques limitent les investissements dans le domaine de la sériciculture.

f) De nombreuses régions des zones séricicoles d'Inde n'ont pas de système d'irrigation régulière, il est donc nécessaire de s'intéresser plus particulièrement à ces zones du point de vue du développement rural.

g) Outre la résistance, les races tropicales à faible rendement possèdent d'excellentes propriétés sensorielles, comme le lustre, etc. et physiques, comme l'isolement à la chaleur, l'absorption de l'eau (Miki et Murakami, 1989).

26. Sur la base de l'évaluation préliminaire des différents agroclimats, les régions potentielles de sériciculture ont été divisées en quatre zones à différent potentiel :

Zone 1 : régions montagneuses à forte pluviosité et climat frais (par exemple : Ghat occidental du Karanataka, du Maharashtra et de Kerala, région de Tarai dans l'Uttar Pradesh et le nord-est).

Zone 2 : plaines avec irrigation régulière (par exemple, plateaux du sud, plaines gangétiques du nord, ceinture nord-est, sud du Madhya Pradesh).

Zone 3 : plaines avec irrigation semi-régulière (certaines zones spécifiques du plateau méridional et sud du Madhya Pradesh).

Zone 4 : zones semi-arides à pluviosité irrégulière et sécheresse de décembre à mai (par exemple, certaines régions de l'intérieur du Karnataka, du Madhya Pradesh et du Maharashtra).

F. MESURES PRISES POUR ATTEINDRE LES OBJECTIFS DECRITS PLUS HAUT

27. Afin de réaliser les objectifs décrits plus haut et apporter un appui à la sélection du ver à soie, le CSRTI de Mysore a pris des mesures visant à utiliser, dans des zones spéficiques, les souches déjà isolées ou provenant d'autres pays et à formuler de nouvelles stratégies de sélection. On tentera de faire le point sur les résultats obtenus dans ces domaines et sur les nouvelles orientations des travaux.

Amélioration de la productivité en zone aride :

28. Comme on l'a indiqué par ailleurs, un grand nombre de fermiers des zones semi-arides du Karnataka élèvent habituellement *Pure Mysore* × *C' nichi* qui a un potentiel de production de 18 à 20 kg de cocons pour 100 pontes et une richesse soyeuse de 12 à 14 % (14,0 cg). Les fermiers de ces régions ne peuvent pas se permettre un risque financier élevé. On a estimé qu'une amélioration partielle de la productivité de cet hybride dans ces zones serait profitable tant pour les fermiers que pour les filateurs. Cependant, il faut souligner que le potentiel de ces régions est limité par la température élevée qui règne de mars à mai et qu'il est indispensable d'utiliser des souches tolérant les fortes températures pendant cette période. Pour cette raison, on a choisi d'utiliser des souches chinoises à faible rendement et des races polyvoltines traditionnelles d'Inde (*Pure Mysore* × *Nistari*) dans le nouveau programme de sélection (Fig. 3). L'institut a diffusé plusieurs de ces souches, dont les hybrides RD_1 et MY_1 qui sont de mieux en mieux acceptés par les fermiers (Tableau IV).

29. Par ailleurs, partant du principe que l'amélioration de la qualité du fil, principalement pour ce qui concerne la netteté et la régularité du denier, pourrait augmenter le revenu, un nouveau programme de sélection a été mis en place après analyse des paramètres de dévidage chez diverses souches à faible rendement (Chatterjee et coll., 1992a). Les résultats (Tableau V) montrent que la netteté peut être portée au niveau souhaité même pour les souches chinoises et indiennes à faible rendement. Les souches à faible rendement et donnant des cocons de 1 à 1,3 g se caractérisent généralement par une faible richesse soyeuse de 10 à 14. Récemment, des tentatives ont également été faites pour porter la richesse soyeuse à 16 en utilisant la méthode de la recombination-sélection (Tableau VI).

Pour les zones de collines à forte pluviosité et à climat froid :

30. Ces zones, comme les Ghats occidentaux, les Ghats orientaux et d'autres régions comparables du nord-est et du sud du Madhya Pradesh, se prêtent tout à fait à l'utilisation des hybrides performants dont le rendement est de 60 à 80 kg, le poids moyen du cocon de 1,8 à 2,0 g et le poids de la coque de 0,30 à 0,35 cg. Il a été établi que l'amélioration de la richesse soyeuse, sans augmenter le poids du cocon, rendrait l'élevage de tels hybrides bien plus rémunérateur. Sur ces bases, les chercheurs du CSRTI de Mysore ont isolé de nouvelles souches à cocons ovales : *CC1* et *CA2*. La technologie de sélection adoptée diffère de celle utilisée préalablement dans la mesure où le matériel de sélection utilisé est composé de lignées à cocons ovales (Fig. 4). De plus, en donnant des feuilles de mûrier de bonne qualité nutritive à la génération de sélection, les éleveurs ont pu isoler des génotypes donnant une meilleure contribution à la richesse soyeuse. Ces souches sont proposées comme composants ovales des hybrides F_1 avec NB_4D_2 ou NB_{18}.

Amélioration de l'adaptation des souches performantes à fil de meilleure qualité :

31. Comme on l'a indiqué par ailleurs, l'adaptation des souches performantes aux conditions agroclimatiques tropicales et au faible niveau de gestion est le problème le plus important pour l'Inde. Pour résoudre cette question, les généticiens et les éleveurs du CSR & TI du Mysore ont adopté différentes approches pour obtenir des informations de base, vérifier si ces informations sont utilisables dans la sélection du ver à soie et adopter de nouveaux programmes de sélection basés sur l'analyse rationnelle des informations disponibles. Les nouvelles orientations de la recherche dans le développement/l'amélioration des technologies de sélection peuvent être définies de la manière suivante :

- étude génétique de la résistance chez les races tropicales et identification éventuelle des marqueurs biochimiques pour la sélection ;
- compréhension de la génétique de la résistance aux maladies chez le ver à soie et possibilité d'obtention de marqueurs pour la résistance aux maladies ;
- utilisation d'une base génétique plus importante pour élargir le champ génétique de la capacité d'adaptation ;
- utilisation du stress au cours du processus de sélection pour améliorer la capacité d'adaptation ;
- introduction de la sélection alternative pour augmenter le champ de tolérance aux fluctuations de l'environnement ;
- amélioration de la compréhension de la génétique des caractères quantitatifs contribuant au rendement en soie et à sa qualité ;
- applications de différentes méthodes d'élevage/de sélection pour augmenter la productivité et la capacité d'adaptation ;
- préparer les recherches pour l'identification des segments chromosomiques spécifiques ainsi que leur transfert et leur introduction dans la lignée germinale, c'est-à-dire mettre en place la sélection en marquant les gènes importants.

Compréhension globale de la vigueur :

32. La capacité d'adaptation supérieure des souches de vers à soie tropicales à faible rendement est un fait établi (Tazima, 1958 ; Chatterjee et Datta, 1989 ; Datta, 1989). Les généticiens du CSRTI de Mysore tentent depuis 1986 de faire la lumière sur ce phénomène et des travaux sur la corrélation/l'interaction des caractères biochimiques et des paramètres quantitatifs ont permis de démontrer que l'amylase digestive jouait un rôle significatif dans la survie du ver à soie (Chatterjee et coll., 1989). On a également montré que, si l'activité amylase digestive est corrélée de manière linéraire et positive avec la survie, l'activité invertase du suc digestif est corrélée de manière linéaire mais négative avec celle-ci. Des expériences ont été mises en place afin de vérifier si l'amylase digestive pouvait être utilisée comme marqueur de souche. Les résultats de ces expériences ont révélé une tendance positive et le tableau VII présente les performances obtenues au Regional Experimental Laboratory (Regional Sericultural Research Station). Des tests de sélection doivent néamoins être entrepris afin d'améliorer la richesse soyeuse. Chatterjee et coll. (1992c) ont montré que la phosphatase alcaline et l'invertase contribuent de manière positive au poids de la coque et à la richesse soyeuse. De prochains résultats sur la sélection à l'aide de ces marqueurs biochimiques permettront de clarifier cet aspect.

Compréhension génétique de la résistance aux maladies :

33. Les chercheurs du CSRTI de Mysore ont mis en place un programme de travail sur cette question en 1990 et les informations obtenues jusqu'à présent montrent clairement qu'il y a deux aspects :

1) l'immunité générale chez le ver à soie ;
2) les gènes marqueurs spéficiques de la résistance à des agents pathogènes spécifiques.

34. Des études dans différents pays ont permis de confirmer l'existence d'un système immunitaire antibactérien et antiviral chez le ver à soie. L'importance de la protéine fluorescente rouge (RFP) dans l'immunité a été démontrée par les Japonais et des travaux récents réalisés au CSRTI de Mysore (Sethuraman, 1991) ont montré qu'il était possible d'identifier un système génétique utilisable dans la sélection du ver à soie. Parallèlement, des travaux sur les antibactériens au National Institute of Sericultural and Entomological Science de Tsukuba et au CSRTI de Mysore (Datta et coll., 1991) et dans d'autres laboratoires doivent permettre d'apporter une contribution à la sélection de la résistance aux maladies.

35. Pour ce qui concerne le(s) gène(s) spécifique(s) de la résistance, des chercheurs japonais et chinois ont déjà identifié et localisé deux gènes dominants (*Nid 1* et *Nid 2*) et un gène récessif (*nsd* : liaison 21) dénotant une résistance aux agents pathogènes viraux. Continuant sur cette voie, des chercheurs du Breeding Laboratory du CSRTI de Mysore ont commencé à sélectionner diverses souches de vers à soie afin de déterminer la différence de résistance à l'infection par le virus de la

polyédrose nucléaire (NPV). Les résultats obtenus jusqu'à présent permettent de penser qu'il sera possible d'identifier des souches homozygotes ayant une résistance supérieure au NPV (Chatterjee et coll., non publié). Cependant, pour une telle technologie de sélection, il est très important de disposer de souches exemptes d'agents pathogènes viraux car les Japonais ont démontré qu'un échantillon de DNV (virus de la densonucléose) pathogène que l'on croyait de type uniforme était en fait un mélange de DNV1 et DNV2.

Elargissement de la base génétique pour améliorer la capacité d'adaptation :

36. L'examen des premiers programmes de sélection a révélé que la plupart des programmes de sélection pour souches performantes étaient basés uniquement sur quelques hybrides japonais × chinois (simples ou doubles). On a donc étudié les ressources génétiques et sélectionné des races russes, coréennes, brésiliennes, européennes, japonaises ainsi que la souche locale Pampore-5. Les données (Tableau VIII) sur la capacité combinatoire générale (GCA) ont été obtenues à partir de souches brésiliennes, *IZHMD*, *Pampore-5*, *European B*.

Utilisation de la pression de sélection pour améliorer l'adaptation :

37. En Inde, comme ailleurs, on s'efforce de réunir, au cours du processus de sélection, les meilleures conditions climatiques, nutritionnelles et la meilleure gestion pour l'expression des caractères quantitatifs d'intérêt commercial. Cependant, de telles méthodes ne permettent pas de sélectionner les gènes ou génotypes qui contribuent à un taux de survie supérieur. Récemment, les éleveurs japonais se sont intéressés de très près à l'étude de cette question.

38. Le programme de sélection adopté tient compte de la nécessité de fournir une pression de sélection par stress de surpopulation et de réduction du nombre de nourrissages. Selon la technique habituelle de sélection, on compte 250 larves (à partir du 4e âge) pour une surface de 6 pieds carrés. Pour améliorer la capacité d'adaptation générale, on utilise mainenant 400 larves pour le même espace. Les données (Tableau VIII) montrent que les hybrides F_1, de souches développées sans stress de sélection, ont un taux de survie inférieur à celui des lignées sélectionnées soumises au stress de surpopulation. Toutefois, des tests supplémentaires sur les hybrides sont nécessaires pour permettre une évaluation comparative fiable. De même, des expériences sont en cours pour déterminer si les autres stress de sélection sont appropriés (par exemple : température et humidité élevées) avant de les inclure dans la technique de sélection.

Introduction du Δ :

39. En Inde, les souches à rendement élevé ou moyen sont mises au point en laboratoire, où l'on élève une population limitée et, comme on l'a indiqué plus haut, dans les meilleures conditions possibles. Les nouvelles approches prévoient de donner les matériels de sélection aux stations régionales au stade F_{10}. Ceci permet de propager la population et de soumettre les matériels à une pression de sélection en leur faisant subir une mauvaise gestion et des milieux fluctuants. Les données présentées dans le tableau IV donnent la performance de certains matériels de sélection élevés au RSRS dans le cadre du programme de sélection alternatif.

Amélioration de notre connaissance de la génétique des caractères quantitatifs :

40. Au Japon, divers travaux ont été entrepris depuis les années 1950 pour évaluer l'héritabilité de différents caractères quantitatifs au printemps et à l'automne. On a également tenté de déterminer le nombre minimum de facteurs K dominants pour divers paramètres du rendement (Nino et coll., 1990 ; Gamo et Hirabayashi, 1983 ; Gamo et coll., 1985). En Inde également, plusieurs travaux ont déjà été réalisés sur la capacité combinatoire de l'héritabilité d'un certain nombre de caractères quantitatifs (Pershad et coll., 1986 ; Datta et Pershad, 1988 ; Krishnaswami et coll., 1964 ; Jose, 1991 ; Kalpana, 1991). Cependant, on ne dispose encore d'aucune information sur la liaison entre les paramètres du rendement et d'autres marqueurs morpho-biochimiques ou qui permette de déterminer l'étendue du contrôle génétique des caractères quantitatifs liés au rendement en fil de soie et à sa qualité. Pour ces caractères, le contrôle polygénique additif a été proposé par Nino et coll. (1990) et d'autres chercheurs. Aucune expérience n'a toutefois été réalisée pour vérifier cette hypothèse.

41. Il est donc très important d'entreprendre une analyse génétique approfondie des caractères quantitatifs. Cet aspect a été longuement abordé lors du séminaire sur la biotechnologie et la génétique du ver à soie qui s'est récemment tenu à Mysore (Inde) et des programmes spéficiques d'identification des gènes ayant un effet majeur pour la longueur du filament, le denier et la netteté sont en projet. A terme, l'objectif est de préparer le terrain pour la cartographie des locus des caractères quantitatifs (QTL), comme cela a été fait pour de nombreuses autres cultures (Eltson et Stewart, 1973 ; Chatterjee, 1992). Des travaux sur l'association et/ou la liaison entre les marqueurs morphologiques et les caractères quantitatifs, dont les résultats permettront d'obtenir des informations sur la sélection au niveau pratique, ont également été entrepris au CSRTI de Mysore (Chatterjee, 1992).

Application de méthodologies différentes d'élevage et de sélection :

42. Pendant les cinquante dernières années, des progrès énormes ont été possibles dans le domaine de la sélection chez les plantes et d'autres matériels et les informations sont disponibles au niveau international. Il est impératif que les chercheurs d'Inde et d'autres pays qui connaissent des problèmes semblables testent l'efficacité de diverses stratégies de sélection afin de résoudre les problèmes liés aux zones tropicales et subtropicales. Ces stratégies comprennent la sélection récurrente, la sélection recombinatoire, la sélection par mutation, la sélection par le stress ou la sélection par croisement de retour avec des matériels locaux robustes.

Préparation du transfert et de l'introduction du (des) gène(s) spécifique(s) dans les souches :

43. Les nouvelles avancées de la technologie de l'ADN ouvrent des perspectives nouvelles et permettent l'adoption de moyens plus directs pour le transfert du ou des gène(s) spécifique(s) contribuant à la résistance aux maladies ou à certains parasites spécifiques et des gènes liés aux facteurs spécifiques de la productivité. Cependant, ils nécessitent l'identification et l'isolement préalable du matériel génétique porteur soit des QTL, soit d'autres systèmes génétiques spécifiques, comme on l'a indiqué plus haut, et ceci implique, à terme, la cartographie de l'ensemble du génome (Datta, 1989). Des travaux dans cette direction ont également été entrepris au CSRTI de Mysore et dans trois autres pays séricicoles (Goldsmith, 1991).

Nécessité d'une meilleure caractérisation des ressources de sélection :

44. Pendant les cinq dernières décennies, en Inde, les matériels utilisés provenaient de sources variées et on a également tenté de les cataloguer à partir des informations disponibles au moment où ils ont été reçus. Cependant, il est aujourd'hui admis que la caractérisation des matériels de sélection et leur classement en groupes significatifs sont les deux aspects les plus importants du cataloguage. De plus, les modalités systématiques restent encore à développer pour une conservation adéquate du matériel de sélection. Les examens préliminaires révèlent qu'un grand nombre de sous-lignées ont été obtenues au cours du processus de sélection, parmi lesquelles deux ont pu être commercialisées et reproduites en masse. Dans de nombreux cas, les caractères étaient différents de ceux observés au moment de la réception des souches. Il faut également indiquer que la plupart des matériels utilisés pour la sélection obtenus ou collectés à partir de diverses sources étaient au départ des combinaisons hybrides de constitution génétique différente. Il est évident que leur conservation est un travail extrêmement difficile. Ces aspects ont été mis en évidence après des études récentes réalisées dans les laboratoires de génétique et de sélection du CSRTI de Mysore (Chatterjee et Datta, 1992 ; Chatterjee et coll., 1992c). La non-obtention d'un degré élevé d'hétérosis chez les hybrides indiens suggère l'absence d'une variation importante parmi les souches à haut rendement. Ceci est également vrai pour les pays devant développer une technologie de sélection du ver à soie.

G. TECHNOLOGIES DE SELECTION POUR D'AUTRES ESPECES DE VERS A SOIE

45. Comme on l'a indiqué, l'Inde dispose d'un patrimoine unique au monde avec une tradition d'élevage de quatre espèces de vers à soie. La sélection de ces espèces a beaucoup d'importance du point de vue du développement des villages, du reboisement et du maintien de l'équilibre écologique.

On s'intéresse donc au programme de recherche et de développement portant sur les autres espèces de vers à soie d'Inde. Cependant, il existe peu d'informations sur la technologie de sélection des espèces de vers à soie non mûrier d'Inde.

Tasar tropical (*Antheraea mylitta*) :

Cette espèce se répartit en 30 écotypes environ, sur une vaste région qui recouvre une partie du Bengale occidental, le Bihar, certaines poches de l'Uttar Pradesh, le Madhya Pradesh, l'Orissa occidental, le nord de l'Andhra Pradesh, le Maharashtra et le sud du Karnataka. Autrefois, les centres de grainage distribuaient aux fermiers des écotypes spéficiques de cette zone, par exemple : *Daba* dans le Bihar, *Modal* et *Bogai* dans l'Orissa, *Railey* et *Jhabua* dans le Madhya Pradesh, *Andhra Local* dans l'Andhra Pradesh ou *Bhandara* dans le Maharashtra. Cependant, après 1975, les éleveurs ont introduit un matériel provenant d'une petite poche de Sukindagarh dans l'Orissa dans divers Etats d'élevage de vers à soie tasar. Cette tentative connut un succès provisoire.

47. De 1982 à 1985, en utilisant plusieurs écotypes et suivant la sélection recombinatoire, des efforts ont été faits afin d'améliorer la capacité d'adaptation du matériel dans des conditions défavorables. Trois de ces races, *Nagri 1*, *Nagri 2* et *Nagri 3*, ont été répandues entre 1983 et 1985 dans l'Orissa, le Maharashtra et le Bihar. On a également tenté, pendant cette période, d'introduire la méthode de la sélection récurrente et la sélection d'une population donnée associant un taux de survie et une richesse soyeuse élevés. Avec l'accroissement de la déforestation, les ressources tasars diminuent très rapidement ; sans infrastructure adéquate et sans la création de poches isolées dans les zones forestières spécifiques assurant la réintroduction des papillons tasars et le contrôle de leur stabilisation, les ressources d'*A. mylitta* disparaîtront. De plus, il est également nécessaire pour cette espèce d'intensifier les recherches sur la caractérisation génétique des écotypes. Ceci est important non seulement pour l'Inde mais aussi pour d'autres pays séricicoles car cette espèce constitue une source de pool génétique unique que l'on ne trouve qu'en Inde.

Le tasar du chêne en Inde :

48. L'Inde a plusieurs autres espèces d'*Antheraea* sauvages mais n'avait originellement aucune espèce semblable au ver à soie tasar du chêne de Chine ou du Japon. Dans les années 1970, Jolly et son équipe ont réussi à mettre au point un hybride d'*Antheraea roylei* de la ceinture sub-himalayenne et d'*A. pernyi* (tasar chinois). Cet hybride a été appelé *A. proylei* (Jolly) et introduit comme tasar tempéré pour utiliser la flore naturelle des espèces de chênes abondantes dans le nord-ouest et le nord-est de l'Inde.

Le ver à soie muga, un matériel unique :

La séricicuture dans la vallée du Brahmapoutre pourrait remonter à 4000 ans et le ver à soie muga constitue un exemple unique de domestication car, bien que ses larves soient élevées en extérieur, elles doivent être portées à l'intérieur des locaux pour le filage. Le caractère unique de ce ver à soie réside également dans le fait que jusqu'à présent ni cette espèce ni sa plante nourricière n'ont été observées hors de la vallée du Brahmapoutre et du territoire Tarai au Népal.

Le ver à soie eri, de la soie pour les pauvres en Inde :

50. Ce séricigène (*Philosamia ricini*) est une espèce complètement domestiquée. Comme elle est principalement utilisée pour le filage à main, son potentiel d'utilisation reste restreint. Cependant, de riches nations comme le Japon s'intéressent à la soie eri pour les bas et les sous-vêtements. En Inde, hormis la mise au point d'une variété à cocons blancs, très peu a été fait dans le domaine de la sélection. Il n'est pas impossible de modifier le caractère du fil et le comportement de filage du ver à soie eri, ceci demandrait une plannification adéquate à adopter en priorité. Il faut toutefois indiquer que le département de biotechnologie du gouvernement indien est conscient du potentiel et des perspectives dans ce domaine et plusieurs priorités ont déjà été identifiées pour consolider les apports en recherche et développement.

CONCLUSIONS

51. Cette revue donne un bref aperçu de la longue histoire de la soie en Inde et tente de faire une autocritique. Comme il a été par ailleurs indiqué, jusqu'à récemment, la sélection du ver à soie était considérée comme un art plutôt que comme un domaine scientifique. Cependant, lorsque l'on considère les importantes avancées réalisées dans les différents domaines de l'agriculture et de la sélection animale, on peut fortement espérer voir se développer une technologie de sélection sur des bases scientifiques solides, dont les résultats permettront le développement de technologies dans d'autres domaines de la sélection des insectes. Il est vrai que la sériciculture ne concerne pas seulement la production de cocons mais également les propriétés physiques et chimiques du fil de soie (qui a, rappelons-le, une structure protéique complexe). Il faut également admettre que, par comparaison avec l'étendue des études en génétique et en sélection expérimentale effectuées dans d'autres domaines de sélection utilisant des espèces végétales et animales, les études réalisée jusqu'à présent sur le ver à soie en Inde et dans d'autres pays tropicaux sont excessivement minces. L'attention de la communauté internationale sur ces questions permettrait de relancer l'intérêt des scientifiques engagés dans la recherche d'informations sur la technologie de sélection du ver à soie dans divers pays d'Asie et du Pacifique.

Review

EFFECT OF HORMONES ON THE MULBERRY - A REVIEW

S. BISWAS & K. SENGUPTA

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

Keywords : Mulberry, hormones.

INTRODUCTION

The term hormone is applied to those specific organic chemical compounds which, being produced in given parts of an organism, mostly in small quantities, are transported to the other regions where they induce definite and typical physiological effects. There are increasing evidences that hormones have decided impacts on plant physiology and biochemistry and they play a key role in the life of higher plants.

Several review papers (Paleg, 1965 ; Key, 1969 ; Pratt and Goeschl, 1969 ; Skoog and Armstrong, 1970 ; Wareing and Saunders, 1971 ; Abeles, 1972 ; Scott, 1972 ; Jones, 1973 ; Evans, 1974 ; Milborrow, 1974 ; Torrey, 1976 ; Walton, 1980 ; Letham and Palni, 1983 ; Yang and Hoffman, 1984 ; Pharis and King, 1985) and books (Wilkins, 1969 ; Moore, 1979 ; Purohit, 1983 ; Hoard *et al.*, 1987) have appeared on hormones, devoted to the biochemistry and physiology of metabolism and mode of their action. In these reviews and books, relevant concepts concerning hormonal control of plant development have been discussed.

Among the well-recognized hormones, the auxins, gibberellins, cytokinins, ethylene gas and abscisic acid have the most pronounced effects to modify plant growth. Growth regulation in higher plants is like contrapuntal music, each of the various growth regulators playing concertedly on the instruments of growth. In some places, one specific hormone may be the principal limiting factor in growth, while simultaneous interaction of two or more of the above types of plant hormones regulating various aspects of growth and differentiation appears to be a general feature of higher plants.

The hormonal effects on growth are diverse and often differ from organ to organ and from plant to plant. This is, however, not unexpected since growth itself is a complex phenomenon. For instance, the organs of a plant differ in regard to the location of the growth and the way in which the growth occurs. Hence, an attempt has been made in the present review to summarise the work related to the effect of hormones on mulberry especially concerning the exogenous applications of phytohormones on the growth and development of mulberry plants.

a) Commercial chemical compounds acting as auxins : 'Poebder', 'Rootone', 'Rutin', 'Seradix BN' 2 and 3.

b) Abbreviations used : ABA, abscisic acid ; BA/BAP, 6-benzylaminopurine (6-benzyl adenine) ; 'ethrel'/'ethephon', 2-chloroetyl phosphonic acid ; CCC/cycocel, 2-chloroethyl trimethyl ammonium chloride ; 2,4-D, 2,4-dicholorophenoxy acetic acid ; GA/GAS/GA_3, gibberellins ; IAA, indole-3-acetic acid ; IBA, indolebutyric acid ; IPA, indolepropionic acid ; 2 iP, N^6-2-isopenyladenine ; NAA/ λ-NAA, naphthalene acetic acid ; β-NAA, β-naphthoxyacetic acid ; PABA, P-aminobenzoate ; 2,4,5-TCP, 2,4,5-trichlorophonoxyacetic acid ; TIBA, 2,3,5-triodobenzoic acid.

A. EFFECTS OF AUXINS ON THE MULBERRY

On root induction and root growth :

Auxins have a pronounced beneficial effect on rooting of mulberry cuttings. Both natural and synthetic substances including commercial compounds, which act as auxins, have been found to be very much effective in inducing root formation and increasing the root number and length in many mulberry varieties difficult to be propagated vegetatively. However, all auxins do not act on all mulberry varieties. For example, the auxins 'Seradix BN' 2[(a)] and 3 act on the mulberry variety 'Captan's' (Inforzato, 1950), Seradix hormone 'Poebder' on 'Kosen' and 'Goshoerami' (Rao and Khan, 1963), 'Rootone' on Assamese local, 'Portugal', 'Kosen', 'Assama jatti', 'China white', 'Kaliakutahi' and 'Susanpur' (Anonymous, 1967-68), 'Rutin' on 'Kosen' (Anonymous, 1979-80), IAA[(b)] on 'Kosen' (Mukherjee and Sharma, 1971) and 'Chinese white' (Fotadar *et al.*, 1990), IBA on an unknown variety of West Bengal (Sen and Bose, 1964), 'Kanva-2', 'MR-2' (Shanmugavelu, 1975), 'Husang' (Ni *et al.*, 1984), 'Kinira' (Aleksandrov, 1988), 'Goshoerami', 'Rokyaso', 'Kairyonezumigaeshi', 'Ichinose' and 'Kokuso 27' (Fotadar *et al.*, 1990) ; NAA on 'Kanva 2' (Shanmugauelu, 1975), 'S146' (Mukherjee and Sikdar, 1977) and 'Kosen' (Anonymous, 1979-80) and 2,4-D on 'S-146' (Anonymous, 1972-73) and 'Kosen' (Anonymous, 1975-76) are very much effective to induce root, while the auxins, IAA, NAA and 2,4-D, on the varieties, 'Kokuso', 'Morettiana', 'China' and 'CSRS-1' (Anonymous, 1973-74) and 'Rootone' on 'Kokuso-70', 'Morettiana' and *Morus levigata* (Anonymous, 1967-68) are not effective.

A large body of evidence also indicates that the auxin effect differs with the kinds and concentrations of auxins, mulberry varieties, periods of treatment and ages of the mulberry shoots used for cuttings. Mukherjee and Sharma (1971), while studying the rooting of mulberry cuttings of 'Kosen' variety, found that an increase in the concentration of IAA 100 to 500 ppm induced a better rootage and growth whereas in IBA and NAA a reverse sequence was observed. Ahmed and Mathew (1978) observed that the dry weight of root of mulberry (*Morus alba* L.) was least in the cuttings treated with the highest concentration of IAA and increased gradually with the fall in the concentration. However, the comprehensive studies of Honda (1970, 1972) and Alexandrov *et al.* (1983) on the effect of growth substances on root initiation of soft wood (new shoot), semi-soft wood and hard wood cuttings have shown that NAA is the most effective in inducing root of soft wood and semi-soft wood cuttings and both NAA and IBA are equally effective for root initiation of hard wood cuttings. Furthermore, the effect of IAA is poor in every case as compared to NAA and IBA, Honda (1970) also observed that NAA (α-naphthalene acetate) increased the rooting percentage and the amount of root of semi-soft wood cuttings when the cuttings were immersed in a weak solution of 10-20 ppm of this substance for 24 hours or in a concentrated solution of 4,000 ppm for 2-3 seconds. But for the rooting of hard wood cuttings the optimum concentrations of NAA were found 4,000 to 7,000 ppm in the case of the concentrated solution dip method and 150 ppm in the case of the weak solution immersion method, where the cuttings were kept in the solution for 24 hours. Further studies (Anonymous, 1977-78) on the concentrated solution dip method of treatment with IAA, IBA, NAA and 2,4-D on rooting of 'Kosen' variety have also offered evidence that NAA (2,000 ppm) increased both fresh and dry weight of roots but other hormones have a negative effect on rooting.

It is also evident that in the case of long-time (24 hours) application of NAA the promoting effect on rooting decreases with the increase in concentration. For example, Mukherjee and Sikdar (1977) while studying the rooting of matured cuttings of S-146 (an evolved variety of mulberry) found the highest root number, root length and fresh and dry weight of roots, in 25 ppm NAA treated cuttings and that all the parameters decreased significantly with increase in concentration. Furthermore, the highest concentration (150 ppm) of NAA used had some inhibitory effects on all aspects of root development. While different concentrations of α-naphthalene acetate (NAA) were tested against the root formation in hard wood cuttings at different times, Tsuboi and Honda (1971) have found a relationship between the time of treatment and the concentration of NAA. They showed that (1) when the immersion was done either for a long time at a lower concentration or for a short time at a higher concentration, a similar effect on root formation was observed from 150 to 7,500 ppm concentration, (2) the range of time of immersion effective for root formation was wider at a lower concentration and narrower at a higher concentration and (3) given an excessive moisture and low temperature of

the soil, root formation would be initiated, particularly in the case of short-time immersion at high concentration.

Addition of sucrose to auxin also enhances rooting of mulberry cuttings. Honda (1970) has observed that the addition of sucrose (2-3 %) to a weak solution of NAA enhances rooting both in semi-soft wood (10 ppm) and hardwood cuttings (100 ppm). Chakraborty and Mukherjee (1980) treated mulberry cuttings with IAA, IBA, 2,4-D each of 50 and 100 ppm concentrations and with 2 % sucrose or in combination by the dip method for 24 hours and found that the combination of growth substances was not much effective except IAA + 2 % sucrose and 2,4-D (100 ppm) + 2 % sucrose. It is true that both auxin and sucrose lead to an increase in the total ribosome. The auxins in the presence of sucrose might have a synergistic effect on the availability or utilization of messenger RNA (Key, 1969).

According to the investigations of Mukherjee and Sikdar (1977) addition of vitamins, particularly thiamine, with NAA increased the survivability of matured cuttings of S-146. The effect, however, is not so promising as thiamine has no direct action on root formation but it stimulates the subsequent growth of roots in slow growing cuttings while mixed with growth regulators (Tincker and Unwin, 1939 ; Shive, 1940).

Evidence has been provided in a number of studies that ringed cuttings are much more responsive to auxins as compared to unringed cuttings (Mishra and Jauhari, 1970 ; Anonymous, 1972-73 ; Mukherjee and Sikdar, 1974 ; Chakraborty and Mukherjee, 1980). Even, ringed cuttings of 'Kosen' variety under etiolated condition may show a pronounced effect of hormones, especially of 2,4-D (Anonymous, 1977-78). Mukherjee and Sikdar (1974) have reported that the treatment with 2,4-D at 50 ppm shows the best results in ringed cuttings of S-146 mulberry variety.

The origin and formation of adventitious roots in cuttings after planting depend on the development of root primordia and the mutual competition between each primoridium. Auxin helps the formation of primordia more rapidly and increases its number. For example, in an experiment of Honda (1970) when cuttings were applied with NAA and kept at 30 °C underground temperature, callus formation took place after 5 days and the early stage of development of root primordia was observed after 6 days. The root primordia projected through the epidermis and the initiation of root took place during 10-12 days. The increase in the number of roots became lower after 18-20 days. Many more root primordia remained in a latent condition. In the case of cuttings without NAA application and kept at 30 °C underground temperature, the formation of callus was almost the same as in the case of NAA treatment, but the formation of root primordia was slower and less in number. The findings also led the author to conclude that NAA had no effect of callus formation.

On lateral bud sprout :

It has been widely observed that the growing apex of the mulberry shoot inhibits outgrowth of lateral apices of the same plant. The inhibiting influence, at least in part, is exercised by auxin formed in the growing apex and its transport. In decapitated plants the inhibiting effect can be accomplished by the application of auxin (NAA). For example, in an experiment of Minamizawa and Matsuhisa (1978) the shoots were pinched and leaves were plucked followed by spraying of 500 ppm NAA. There it was found that the lateral bud sprouting was retarded except 2-3 apical buds. When shoots were lodged horizontally and sprayed with 500 ppm NAA, there was no sprouting and all the buds had retarded sprouting. Suzuki *et al.* (1988) used NAA as spray to reduce the number of lateral buds sprouting from both defoliated, decapitated erect shoots of mulberry coppice (*Morus alba* L. cv. Shinichinose).

The lateral bud sprouting can be accelerated by inhibiting the auxin (IAA) transport from the growing apex of shoot with the help of a weak auxin, 2,3,5-triodobenzoic acid (TIBA). Ohyama (1967) has found that TIBA spraying accelerates lateral bud sprouting within a few days after spraying. When spraying is followed by topping, the acceleration is further increased both in number and growth. However, the effect of TIBA on the sprouting of lateral buds seems to be different by mulberry varieties. In the investigation of Ohyama (1967) it was observed that the varieties 'Tomieso' and 'Hosoe' were maximum responsive to TIBA, while 'Kairyo-roso' showed minimum. Further evidence (Anonymous, 1976-77, 1977-78, 1978-79) also indicates that TIBA has no effect on increasing growth and leaf yield of 'Mandalay' variety.

On onset of leaf senescence :

As to the effect of auxin on the onset of leaf senescence, Ahmed and Mathew (1977) have found that in mulberry the onset of leaf senescence is considerably delayed by IAA without any pronounced effect on the number of new leaves. The findings are in accordance with the best known explanation that retardation of leaf senescence by auxin is closely linked to the regulation of protein and RNA synthesis, where auxin maintains DNA as a functional template for DNA-dependent synthesis of RNA (Key, 1969).

On abscission :

From the available evidence, it seems that auxin retards abscission of leaves. Suzuki (1986) observed that abscission of debladed petioles of mulberry (*Morus alba* L. cv. ichinose) was depressed when a part of the petiole, 1 cm in length, was allowed to remain and the cut surfaces were treated with a lanoline paste containing 500 ppm auxin (IAA). Further details of this subject are discussed in the 'Ethylene' chapter.

On sex expression/sex reversal :

Sex expression in plants is under the influence of hormones (Frankel and Galun, 1977) and in most cases the relative endogenous balance of GA and ethylene has been found to be involved in the differentiation of sex (Mohan Ram and Jaiswal, 1974). However, evidence concerning the involvement of other hormones in sex expression is not uncommon. The interactive involvement of auxin and cytokinin in the differentiation of sex has been reported by Durand *et al.* (1972). In mulberry, induction of localised sex expression by transitional alteration of NAA treatment at mid-growth stage of shoot (Minamizawa, 1974) as well as the evidence that spraying of IAA (1000 ppm) is very much effective to induce femaleness in 'Kosen' variety of mulberry (Anonymous, 1976-77) strongly suggest that auxins have had a role, at least in part, for the female sex expression. But in this context, evidence is also available that auxins do not exert any appreciable influence on sex reversal except a weak auxin, TIBA rarely promotes production of mixed inflorescence in a male accession, RFS-135 of CSR&TI, Mysore (Anonymous, 1986-87). In spite of some exceptions, the positive effect of auxin on female sex expression has been further supported by the *in vitro* development of female sex organs. Seki *et al.* (1972) found that mulberry female flower organs developed well in Nitsch medium containing IAA (2.0 ppm). They also observed that flowering of cultivated plants was not synchronous. Maturation and division of the cultivated flowers occurred naturally.

On tissue culture :

i) On somatic tissue culture :

Tissue culture is one of the useful methods for the study of physiological problems in woody plants, such as flowering, bud dormancy and bud growth, because correlations among tissues or organs might be eliminated under defined conditions in tissue culture system. The most critical organic components of tissue culture media are auxin and cytokinin. The interaction between the two hormonal substances regulates root and shoot initiation. Seki *et al.* (1971) have made a fundamental study on the culture from the mulberry tree. They have found that both IAA and NAA are effective to proliferate callus in kinetin-supplemented Murashige and Skoog (MS) medium. For the multiplication of callus, IAA is found to be effective in the absence of kinetin. However, optimum multiplication is obtained in the presence of 0.2 ppm IAA in 0.02 ppm kinetin supplement MS basal medium. In another investigation (Anonymous, 1988-89a) it has been observed that a higher level of NAA in BAP (BA) supplemented MS medium induces callus proliferation, but completely inhibits shoot bud induction. Oka and Ohyama (1973) have developed a culture technique for inducing callus from stem segments of young shoots of mulberry tree (var. Ichinose). There MS medium containing 2,4-D at 10^{-5} M has been used for the basic medium. As for the effect of auxins, 2,4-D is found more potent for callus formation than IAA and NAA but 2,4-D strongly antagonizes organized development (Murashige, 1974). During subculturing auxins are ineffective for callus proliferation in the absence of kinetin. Oka and Ohyama (1976) have found that in the first passage of subculture the callus grows on a medium supplemented with NAA and BA but does not grow on a medium with NAA only. As to the

kind of auxin, NAA is more effective for subculturing than IAA or 2,4-D and the most effective concentration of NAA and BA are 10^{-5} M and 10^{-6} M, respectively.

It is evident that the root formation *in vitro* only takes place due to the synergistic effect of auxins and cytokinins. But the auxins differ significantly in stability, effectiveness and their influence on organogenesis. Ghugale *et al.* (1971) have made a trial with several auxins and found that IAA, IBA, IPA, α-NAA and β-NAA are able to form root, while 2,4-D and 2,4,5-TCP are not effective. Seki *et al.* (1971) have reported that 0.2 ppm IAA or NAA is the most effective for root formation in the MS medium supplemented with 0.1 ppm kinetin. Moreover, considerable evidence supports that differentiation in cells and cell groups and organogenesis are required controlled way by adjustment of the conditions of the medium. For example, Ohyama and Oka (1976) used MS + NAA (1 mg/l) for root formation after developing shoots in an MS medium supplemented with BA alone. Ivanicka (1978) used MS + 0.2 mgl^{-1} NAA + 0.2 mgl^{-1} IBA medium for root formation from the prior *in vitro* developed shoot. Further, it has been suggested that a higher level of auxin in the medium nullifies the effectiveness of cytokinin. For example, in the investigations of Kim *et al.* (1985) cotyledonary, leaf, hypocotyl and shoot-tip explants of mulberry (*M. alba* L.) derived from embryos cultured with BA were induced to form adventitious shoots when cultured in media containing high BA with or without a low concentration of NAA. The adventitious shoots formed at the basal cut ends of the cotyledons and leaves. Histopathological analysis of the explants showed a wound cambium at the base of the bud primordia. In addition to adventitious buds, shoot-tip explants also produced axillary buds. There higher levels of NAA in the medium completely nullified the effectiveness of BA.

Considering the role of auxins on *in vitro* development of shoots from axillary buds, Oka and Ohyama (1975) and Oka (1985) have suggested that both auxin and cytokinin are to be added to the basal medium for bud sprouting although cytokinin is effective for a longer time than auxin. In an experiment Oka (1985) found that when an axillary bud with a stem 10-15 mm in length was placed on an MS medium supplemented with NAA the bud developed a shoot. But when the stem length was reduced to 3-5 mm, both BA and NAA were needed for bud growth. Shoot development from axillary buds were always accompanied with rooting at the base of the stem. So that the author concluded that it might be due to rooting at the base of the stem and the subsequent supply of cytokinin through the root system that the axillary bud responded to NAA rather than BA. However, it should be noted that auxin exerts no effect on winter bud sprouting although it induces callus at the base of the bud (Oka and Ohyama, 1974).

ii) On embryo and endosperm culture :

The effect of auxins on embryo culture of mulberry seed is influenced by light and dark conditions. For example, Seki *et al.* (1974) found that when 2.0 ppm of auxin, 2,4-D, IAA or NAA was added to the medium, the highest growth rate of callus induced from the embryo was obtained with 2,4-D followed by IAA and NAA in the light condition (550, 1500 lux) but in the dark condition it was obtained with IAA followed by NAA and 2,4-D. Further, the growth rate was considerably high when 1.0 ppm 2,4-D and 1.0 % casein hydrolysate were added in the constant light condition. On the other hand, when 2.0 ppm auxin 2,4-D, IAA or NAA was added to the medium, the growth rate of callus induced from endosperm was almost the same in both dark and light conditions and remained very low.

iii) On anther culture :

It should be remembered that the mulberry is represented by one sex only in most of the cultivars and hence inbreeding for raising a homozygous line is not at all possible except of few monoecious varieties. Recently, scientists have become very much interested in regenerating haploidy through anther culture. There is evidence that, depending upon the cultural condition, anther at uninucleate stage can be differentiated into callus. When anthers at uninucleate stage cultured on MS and Nitsch media supplemented with auxins (NAA, 2,4-D) and cytokinins (BAP, kinetin) respond in two ways either by producing calli which emerge from anther locules or by forming a 4-celled structure from the uninucleate microspore (Anonymous, 1989-90). While, considering the role of auxins on the callus formation from anther locules, it has been observed that 2,4-D produces a friable callus and both NAA and IAA separately produce compact calli, but 2,4-D responds better in the presence of cytokinin

(Anonymous, 1988-89a). Katagiri (1989) has found that IBA is effective to induce callus in culture of mulberry pollen. In his experiment culture for pollen division was done using a half strength of B_5 medium with 1 ppm BA and IBA, 20 mM myoinositol, 5 mM glutamine, 2 % sucrose and 0.4 M manitol, pH 5.6, after starvation treatment.

iv) On protoplast culture :

During protoplast culture addition of auxin in the enzyme solution increases protoplast yield. Ohnishi and Kiyama (1987) have added both 2,4-D and BA (cytokinin) to the enzyme solution to increase protoplast from mulberry leaves as well as from mulberry callus. They have reported that the most suitable concentrations of 2,4-D and BA for the isolation of protoplasts from mulberry leaves are 0.02 and 0.2 ppm, respectively. While the mulberry callus is used, the yield of protoplasts increases upon the addition of 2,4-D at a concentration of 2.0 ppm.

B. EFFECTS OF GIBBERELLIC ACID (GA)

On seed germination :

The treatment with gibberellic acid (GA) at wide ranges of concentrations shows acceleration on germination of mulberry seeds. Rao *et al.* (1963) found that the most effective concentrations of GA_3 on seed germination was 50 ppm, but in more recent studies (Anonymous, 1987-88, 1988-89b), it has been observed that 100 ppm GA_3 is the most effective along with high germination rate in the shortest period of 5 days. The positive role of GA in seed germination is further confirmed by the works on phytochrome. There it has been observed that the germination of mulberry seeds is accelerated by short-term irradiation of red light (Saito and Morahashi, 1981 ; Anonymous, 1988-89b). Red light causes increased synthesis of GA and depression of endogenous auxin.

On rooting :

Although GA plays a major role in seed germination, it has no positive effect on root induction from cuttings and even on root differentiation from callus tissue (Ghugale *et al.*, 1971). Moreover, GA has an inhibiting effect on the growth of roots (Cazrnolwiski, 1966). Ahmed and Mathew (1978) have found that the positive effect of IAA in inducing rooting from mulberry cuttings is antagonized by GA_3. But in this context, an important evidence that GA_3 enhances the survivability percentage of mulberry cuttings has come from the works of Bindroo *et al.* (1983). They found that semi-soft wood cuttings with two upper leaves intact gave the highest percentage of survivability with 5 ppm GA_3 and that was even better than that of IAA and IBA treated cuttings.

On shoot growth :

As to the effect of GA on mulberry shoot growth, several investigators (Takizawa and Kano, 1958, 1960 ; Pylnov, 1961 ; Abdullaev and Aliev, 1965 ; Czarnolowiski, 1966 ; Ahmed and Mathew, 1977) have suggested that GA has a stimulating effect on the growth of stem, petiole and lamina. Pylnov (1961) showed 2-3 folds increase in leaf yield under the influence of GA (2:1000 solution). Abdullaev and Aliev (1965) showed that a weak aqueous solution of GA (25 mg/l) has a favourable effect on the growth and development of shoots and leaves of mulberry. But the stimulating effect of GA on the increase in leaf yield and leaf area is disagreed in many investigations. The reports of 3 years' investigations at CSR&TI, Berhampore, West Bengal, (Anonymous, 1972-73, 1973-74, 1974-75) indicate that GA has no substantial effect in increasing the leaf yield of mulberry. Suzuki and Kitano (1989a) reported that GA_3 stimulates shoot elongation but depresses leaf enlargement. Furthermore, the works with CCC (cycocel), which inhibits GA biosynthesis somewhere beyond the formation of kaurene, indicate that foliar spray of cycocel increases leaf yield (Anonymous, 1979-80) but decreases the plant's height and internodal distance (Okabe, 1984).

Although there are some contradictions about the stimulating effect of GA on mulberry leaf growth, there is evidence that GA acts as one of the promoting factors for leaf emergence and the growth of shoots as well as the effect of GA action is influenced by soil water content and soil temperature. In a series of experiments, Ohnishi (1986a, 1986b) has found that the effect of GA treatment is more remarkable under conditions of soil water stress and low soil temperature than in

the cases of adequate water content and high soil temperature, respectively. He has also found that the water content of leaves is increased by GA treatment, particularly, the water content of the leaves is increased in the GA treatment under soil water stress is comparable to that of the leaves grown under adequate levels of soil water, suggesting that GA acts as one of the promoting factors for leaf emergence and growth of the shoots. Furthermore, it has also been suggested that the effect of GA treatment becomes more remarkable under conditions suboptimal for growth and that GA acts as though it compensates for such unfavourable conditions. GA changes the inorganic components in mulberry leaves and a fair relationship between the GA treatment and potassium content in leaves has been found. In a series of experiments, Ohnishi and Aoki (1966a, 1966b) observed that the K_2O content in GA treated leaves was greater than that of untreated, while the GA treatment resulted in the decrease of CaO and MgO contents in leaves. They also found that even in the case of considerable increase of potassium application, the K_2O content in GA treated leaves was greater than that of untreated, while the degree of decrease of CaO and MgO contents was smaller in the case of GA treatment. Furthermore, when jugded (K + Ca)/mg and MgO/K_2O ratios, it was assumed that leaves were apt to become a state of Mg deficiency by GA treatment.

On sex expression/sex reversal :

Like all morphogenetic processes, the development of flowers of different sexes, either on the same or on different individuals is under the influence of hormones (Frankel and Galun, 1977). Further, it has been suggested that the relative endogenous balance of ethylene and GAs (Mohan Ram and Jaiswal, 1974) as well as the interactive involvement of GA and cytokinins (Chailakhyan and Khyranin, 1979) control sex expression in many plants. In the mulberry, the production of male flowers on female plants by the exogenous application of GA strongly suggests the possible role of endogenous GAs in male sex expression. Jaiswal and Kumar (1980) have observed that GA_3 treatment on female plants of *M. nigra* at 100 and 300 ppm produces inflorescence having intersex and male flowers and various degrees of transformation of female flowers into male. Ogure *et al.* (1980) have presented evidence showing that with the application of 250 to 800 ppm solutions of GA_3 successively each in June and July, 'Ostiemasa', a monoecious cultivar, sets only male flower clusters. But it is to be noted that the effect of exogenous GA to modify sex is not so promising. For example, Jaiswal and Kumar (1980) found that the pollen formed on the induced male flower were smaller in size in comparison to normal ones and failed to germinate. Ogure *et al.* (1980) observed that with the application of GA_3, 'Kenmochi', a female cultivar, set a considerably large number of damaged flower clusters in which some of the florets remained undeveloped and failed to set fruit. Moreover, in an investigation at CSR&TI, Mysore, Karnataka (Anonymous, 1985-86), five female accessions, viz. 130, 145, 146, 156 and 162, were sprayed with GA_3 (1000 ppm) to modify the sex. There, GA_3 produced rudimentary male flowers only in two accessions, Acc. 130 and Acc. 156.

On the other hand, there is evidence that decreasing the endogenous GA by spraying cycocel, an inhibitor of GA biosynthesis, is useful in inducing femaleness in a male mulberry variety. From the evidence (Anonymous, 1976-77) it seems that cycocel at a concentration of 500 ppm is very much effective to induce femaleness in 'Kosen', a male mulberry variety. But the effect of cycocel in inducing femaleness in male cultivars also differs with mulberry varieties. Such as, cycocel is effective on RFS 135, while it does not exert any appreciable influence on Acc. 119 at CSR&TI, Mysore (Anonymous, 1986-87).

On tissue culture :

The addition of GA to the culture medium enables to overcome the pseudodormancy problem of refrigerated mulberry callus. Yasukura and Ohnishi (1990) have observed pseudodormancy of mulberry callus after 3 weeks of refrigeration and that was most conspicuous after 8 weeks. This pseudodormancy is not found when GA at an optimum concentration of 3 ppm is added to the culture medium. In addition, GA_3 in NAA- and BA-supplemented MS medium increases leaf production and internode extension of shoots (Ohyama and Oka, 1976).

Interaction of GA with other hormones :

It is evident that GA sometimes counteracts the effects of ABA in the mulberry. For example, Ohyama and Oka (1975) have found that the ABA-inhibited growth of cultured buds is partially overcome by an equal strength (10 ppm) of GA_3 and they have presumed that ABA may specially antagonise gibberellin in buds. Suzuki and Kitano (1989b) have observed that the inhibitory effect of ABA on bud break and shoot growth of the post-dormant stem segments can be reversed by GA_3 application. But the conditions described above evidentially do not happened in all cases such as the inhibitive effect of ABA of isolated winter buds of mulberry is not released by the addition of GA_3 (Oka, 1985). It is probably, in winter buds GA activity is inhibited due to the presence of a promoter of cold hardiness, since the promoter of cold hardiness is a growth retarding substance like ABA inhibits GA activity (Irving and Lampen, 1968 ; Irving, 1969) and in the mulberry more than one growth inhibiting substances have been found in the rest period of winter buds (Yahiro and Hayashi, 1971b).

It is interesting to note that the synergistic effect of GA and ethylene causes inhibition of apical growth during the active growth period and acceleration of the development of lateral buds. This evidence has come from the works of Iwata and Nakagawa (1972a, 1972b), where ethrel (an ethylene-releasing compound) sprayed to accelerate defoliation of the lower section of branches during the active growth period inhibited apical growth and subsequent GA spraying on the apical portion alleviated the growth inhibiting effect of ethrel. The combination effect of ethrel and GA accelerated the development of lateral buds and the maximum growth of lateral buds was obtained at 3,000 ppm concentration of ethrel and 100 ppm of GA.

In addition, Ahmed and Mathew (1980) have presented evidence showing that the synergistic effect of GA and auxin (IAA) induced a high percentage of lenticels in cuttings which were devoid of vegetative buds.

C. EFFECTS OF CYTOKININ

On root growth :

Cytokinin, especially kinetin, stimulates root growth of mulberry trees and it has been suggested that the mechanism is fundamentally attributed to the heterotrophy of unit cell. Lee (1984) has found that the effect of foliar spray of kinetin on root growth is notably outstanding when nitrogen (N) or nitrogen, phosphate and potash (NPK) are supplemented to the soils of treated plants.

On shoot growth :

Although very little work has been done on the effect of exogenous cytokinin on mulberry shoot growth in field condition, there is evidence showing that the foliar spray of kinetin promotes the growth of mulberry trees and the appropriate level of kinetin for growth optimal is 100 ppm (Lee, 1984). Moreover, a considerable amount of work on endogenous cytokinin contents shows some relationship between the growth of axillary buds and the cytokinin contents in axillary buds and in leaves and branches remaining after pruning, indicating that cytokinins (zeatin and zeatin riboside) possibly affect the growth of axillary buds. The evidence which indicates the possible role of endogenous cytokinins has come from the studies of Yanagisawa *et al.* (1985, 1988) and Yanagisawa and Shiioiri (1987) who found that cytokinin level in axillary buds increased with sprouting of axillary buds and that level in the axillary buds on the elongated branches was higher than that in the axillary buds on the stump of the base which had been formed following pruning. The zeatin contents in the branches remaining after pruning showed a tendancy to increase with the regeneration of axillary buds. However, zeatin contents in the axillary buds of the remaining branches were low after 3 days after pruning, while, on the other hand, zeatin-riboside contents in the remaining branches decreased with the regeneration of axillary buds and the degree of decrement was maximum on the 7th day after pruning but, after 14 days after pruning, the contents showed a tendancy opposite to the former one. The zeatin-riboside contents in the axillary buds on the remaining branches increased with the regeneration of axillary buds and the increment was largest on the 10th day after pruning. The zeatin contents in the remaining leaves showed a tendancy to decrease with the recovery of the physiological function of leaves, while zeatin-riboside contents in the leaves increased with the leaf growth from

the start of regeneration of axillary buds to the 'Dappo' and 'Enko' stages. The changes of zeatin-riboside contents showed a tendency opposite to that of zeatin.

On dormancy :

Cytokinin promotes sprouting of resting buds but it has no conspicuous effect to accelerate sprouting at the quiescent period and on apical dormancy breaking. Yahiro (1980) has found that the sprouting of resting buds is promoted by benzyladenine (BA) treatment of 50 ppm and 100 ppm. However, a 10 ppm treatment of BA has no effect of the resting buds. A 50 ppm treatment of kinetin accelerates sprouting of resting buds slightly over the control. BA is generally far more effective than kinetin in breaking dormancy but neither BA nor kinetin treatments accelerate sprouting at the quiescent period of dormant buds.

On flowering and fruit setting :

Spraying of kinetin at the time of maximum flowering improves crossability of diploid and tetraploids. The treatment increase fruit set and the effective concentrations of kinetin for diploid and tetraploid mulberry plants are found 0.003 % and 0.005 %, respectively (Aliev, 1980).

On tissue culture :

The importance of cytokinin in tissue culture technique has been partially discussed in the preceeding text along with auxin. There it has been found that the most critical organic components in a tissue culture medium are cytokinin and auxin and the interaction between the two hormonal substances regulates root and shoot initiation. However, that much amount of information is not enough to define the effectivity of cytokinin in various aspects of mulberry tissue culture. In this chapter, therefore, the research findings which are mainly confined to the specific role of cytokinins have been considered for reviewing.

From the available evidence it seems that during tissue culture, in the absence of cytokinin subculturing is not possible. For example, Oka and Ohyama (1976) observed that, at the time of successive subculturing, the callus in MS medium became necrotic and died. But, moreover, cytokinin is mainly responsible for shoot initiation on callus and shoot growth. Evidence presented by Ohyama and Oka (1976) indicates that the addition of BA to the MS medium causes shoot formation but never induces any root formation. Nino (1990) observed that *in vitro* grown mulberry shoot tips frozen in liquid nitrogen were able to regrow when transferred into a modified MS medium (NH_4NO_3 825 mg/l), as detected by the organised apical growth of the cryopreserved shoot tips when the medium was supplemented with BA (1.0 mg/l).

As to the kind of cytokinin BA (sometimes denoted as BAP, i.e. 6-benzylaminopurine instead of 6-benzyladenine) is the most effective for *in vitro* development of shoots. In the most impressive evidence Oka (1985) has found that the *in vitro* development of shoots from winter buds, terminal buds and isolated greenish axillary buds are optimum when BA at a concentration of 1 mg/l is incorporated into the MS medium. Zeatin is also effective to develop shoots but the effectiveness is poorer than that with BA. However, kinetin has been found ineffective to develop shoots from the buds although the effectiveness of kinetin for callus multiplication of mulberry stems is established (Seki *et al.*, 1971). The higher concentration (10 ppm) of BA has been found effective in inducing huge adventitious buds in leaves isolated from winter buds of mulberry. However, N^6-2-isopenenyl-adenine (2-iP) is not effective in the adventious buds induction though it keeps leaves in fresh condition for a longer period (Saito and Katagiri, 1989).

There is also evidence that BA is effective to form shoots from the culture of winter buds in an SDS medium. For example, in an investigation of Oka and Ohyama (1978) winter buds were stocked at a cold temperature (2.5 °C). The buds were surface-sterilized, removed of scale and cultured in an SDS medium containing BA at a concentration of 1 mg/l. Cultures were maintained for 4-6 weeks at 28 °C under 12 hr daily illumination. The best shoot formation was found at the lower pH range of 4-5.

Katagiri (1989) has found that BA is effective to induce callus in culture of mulberry pollen. He used both MS and B_5 media. But the results indicate that half strength of a B_5 medium containing 1 ppm BA, 1 ppm IBA, 20 M myoinositol, 5 mM glutamine, 2 % sucrose and 0.4 M mannitol is very much effective to induce callus at pH 5.6 after starvation treatment.

D. EFFECTS OF ETHYLENE

On rooting :

It is well recognized that ethylene stimulates adventitious root formation but inhibits root growth. However, in the mulberry, the information about the ethylene effects on root growth and adventitious root formation is not enough, although an evidence that application of an ethylene-releasing compound, which decomposes spontaneously in an aqueous solution in tissues to yield ethylene, induces rooting of mulberry cuttings has come from Suzuki (1987). In his study he observed that ethephon at optimum concentrations (0.1, 1 ppm) promoted rooting of performed primordia of *Morus alba* cv. Minamisakari hard wood stem sections (cuttings).

On shoot growth :

Ethylene inhibits apical growth of mulberry trees but stimulates the onset of new shoot elongation. Iwata and Nakagawa (1972a, 1972b) have found that the foliar spray of ethrel on the mulberry tree inhibits the apical growth during the active growth period and a high concentration of ethrel sprayed over the top portion of the mulberry tree withers the apical portion. Evidence presented by Suzuki (1987) indicates that ethylene stimulates the onset of new shoot elongation in low concentration. However, continuous basal applications of ethephon in an aqueous solution slightly depresses shoot elongation of the post-dormant erect stem segments (Suzuki and Kitano, 1989a).

On abscission :

There is much evidence from various sources (Iwata and Nakagawa, 1972a ; Suzuki, 1987 ; Suzuki and Kitano, 1989a) showing that ethylene markedly stimulates defoliation of the lower section of branches of the mulberry tree. In such experiments ethrel has been used as a foliar spray to accelerate defoliation and for this 10 ppm ethrel is found most effective. But, sprayed in high concentration, ethrel causes complete defoliation of mulberries (Iwata and Nakagawa, 1962b). However, it is evident that leaf senescence and abscission in the mulberry are regulated by a basic auxin ethylene control system. Suzuki (1986a) in his most convincing experiment observed that the application of 1,000 ppm ethrel to debladed petioles of mulberry (*Morus alba* L. cv. Shinichinose) 3 days after deblading stimulated the abscission of the blades more significantly than when the application was made concurrently with deblading. Abscission of the debladed petioles of mulberry was depressed when a part of the petiole, 1 cm in length, was allowed to remain and the cut surfaces were treated with lanolin paste containing 500 ppm auxin (IAA). Incubation of the detached shoot tips of mulberry in 500 ppm ethrel accelerated the defoliation and abscission of the debladed petioles more as compared with the incubation in 500 ppm abscisic acid (ABA).

On epinasty of leaf petiole :

Ethylene does, however, appear to play a part in epinasty of leaf petiole. This has been revealed by an experiment which has shown that application of ethrel on leaf blade and petiole causes epinasty (Suzuki, 1986). In that case of epinasty, however, it was found that the minimum amount of ethrel required ranged between 1 ppm, when applied to the leaf blade, to 10 ppm, when applied to the petiole. Curvature of the petiole was maximum 2 days after the application of ethrel, then petioles recovered to some extent when the leaf blade was treated with 1-10 ppm ethrel or when the petiole was treated 10-100 ppm ethrel. The application of 500 ppm ethrel to the upper side of the petioles caused a much greater curvature than the application to the underside. Among the lower, middle and upper portions of the petiole, the lower (basal) portion was most sensitive to the 500 ppm ethrel treatment. Furthermore, the response of petioles to ethrel depended on their developmental stages, i.e. the curvature was in the following order, middle leaf > upper leaf > lower leaf.

On sex expression/sex reversal :

A number of reports (Ogure, 1976, and the references given below) indicate that exogenous application of ethylene in the form of ethrel is very much effective to induce femaleness in the mulberry. Ogure *et al.* (1980a, 1980b) have suggested that the application of 400 ppm ethrel solution in August, more precisely between late July and late August, is the most effective in feminisation of predominantly male mulberry cultivars. In their experiments they observed a large number of female flower clusters in the part of shoots developed after August when the shoot growth began to retard. Jaiswal and Kumar (1980b) found that the treatment of male plants of *M. nigra* L. with ethephen (ethrel) at concentration ranges 960-3,840 ppm induced the production of female flowers and intersexual flowers showing various degrees of transformation into female and later, some fruit setting in inflorescences with intersexual and/or female flowers. Furthermore, it has been suggested that ethylene releases within the shoots on which ethrel is spread, moves to the non-treated shoots of the same stock and is able to induce female flowers (Ogure *et al.*, 1981). However, the effect of ethrel on sex expression in the mulberry differs with cultivars. For example, Ogure *et al.* (1980a) observed that the rate of sex expression was the highest in 'KNG' followed by the male type of 'Shiromekeiso', 'Shinichinose', 'Atsubamidori' and 'Akameroze', successively, but no alteration was observed in 'Tsukasaro'. Moreover, in another investigation at CSR&TI, Mysore (Anonymous, 1985-86), three male accessions, 119, 144 and 214, were sprayed with ethrel (9,600 ppm) to modify sex and the results revealed that ethrel suppressed the male flower incidence only in two accessions, 214 and 119.

E. EFFECTS OF ABSCISIC ACID (ABA)

On seed germination :

The hormonal balance of ABA and GA in seeds has a regulatory role in the germination and this balance can be altered either by decrease of the inhibitor (ABA) or by increase in the promoter (GA) and perhaps by both such changes. Ohyama and Oka (1978) offered evidence that the germination of mulberry seeds was prevented by the exogenous application of ABA. During investigation, they observed a slight retardation on the germination when seeds were treated with 0.1 ppm ABA and complete inhibition on germination when these were treated with 2.0 ppm concentration. A high percentage (99 %) of seed germination was observed when decoated seeds were treated with a 2.0 ppm ABA solution for 60 hours, followed by successive blotting and after 8 days wetting with water. However, the result which showed a high percentage of germination of decoated seeds treated with ABA is not an exception, since in that type of seeds mechanical resistance of seed coat and endogenous ABA, which occurs in the seed coat, are removed so that the balance of endogenous hormones is altered by decreasing the inhibitor (ABA). Furthermore, the effect of ABA in inhibiting seed germination is relatively transient and after rinsing away the inhibiting solution germination promptly resumes (Sumner and Lyon, 1967).

On rooting :

It has been widely observed that ABA has an inhibiting effect on the growth and development of roots. However, an evidence presented by Suzuki (1987) indicates that ABA at optimum concentrations (0.1, 1 ppm) promotes rooting of performed primordia of *M. alba* L. cv. Minamisakari hard wood stem sections (cuttings).

On bud dormancy and bud break :

Most, indeed probably all, perennial plants form resting buds (dormant buds) at some stage in the annual cycle of growth which does appear to be controlled by day length, adverse environmental conditions and endogenous hormones. The hormonal control of bud dormancy was studied, most extensively, by Yahiro and Hayashi (1971a, 1971b) and Yahiro and Tashiro (1989) and their reports indicate that ABA and another inhibiting substance of unknown chemical act as inhibitors in the rest period of winter buds. In the course of their study, they observed that in mulberry winter buds, during dormancy, the content of inhibitors was high in the period when the rest was deep, but it decreased with the termination of the rest. The findings also suggest that endogenous ABA, at least in part, is involved in regulating dormancy of winter buds and it has been further supported by the works on

tissue culture. For example, Oka (1985) observed that ABA completely inhibited the growth of isolated winter buds *in vitro* at 10 mg/l and partly at 1 mg/l. In addition, considerable amount of evidence suggests that ABA inhibits both non- and post-dormant bud break. Suzuki and Kitano (1989a, 1989b) have reported that continuous basal application of ABA in an aqueous solution inhibits post-dormant bud break of stem pieces. Ohyama and Oka (1975) have shown that when stem pieces of 5 cm length are immersed in a 100 ppm ABA solution for 24 hours, bud break is delayed considerably though lower concentrations of ABA from 0.1 to 1 ppm have no effect on the time of bud break. Suzuki (1987) has reported that 50 ppm ABA inhibits bud break completely of *M. alba* L. cv. Minamisakari stem sections.

On shoot elongation and defoliation :

From the available evidence it seems that ABA inhibits shoot elongation and defoliation of mulberry plants. In the evidence of Suzuki (1987) it has been observed that a 10 ppm ABA solution depresses new shoot elongation and defoliation greatly. Suzuki and Kitano (1989a) have found that continuous basal application of ABA inhibits shoot growth of post-dormant erect stem segments and defoliation of new shoots markedly.

On tissue culture :

The use of abscisic acid (ABA) in tissue culture is limited since ABA suppresses the metabolism of callus (Ohnishi *et al.*, 1986) and over a certain limit of quantity it inhibits the development of adventitious roots and differentiation of adventitious buds (Oshigue, 1989). However, it has been effectively utilized for the preservation of mulberry callus which is very important to reduce the number of medium replacements. The preservation method has been developed by the addition of both ABA and P-aminobenzoate (PABA), which is based on the suppression of the metabolism of the callus by ABA along with the preservation of the freshness of the callus by PABA. During the establishment of the method, Ohnishi *et al.* (1986) observed that the callus became brown after 8 weeks of preservation at a low temperature only as well as 8 weeks after the addition of ABA only. Also by adding only PABA the proliferation of the white part of the compact callus was promoted and browning inhibition was observed after 8 weeks. However, the addition of both ABA and PABA led to the suppression of the callus proliferation and the callus could be preserved for 20 weeks without losing its freshness in the dark at 28 °C. At a low temperature and over a long period of time, the callus was found alive but growth was retarded when the callus was exposed to ambient conditions.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The evidences outlined in this review strongly suggest that almost all the stages of growth and development of mulberry plants, such as seed germination, adventitious root induction and growth, bud dormancy, sprouting and growth, leaf emergence and growth, sex expression in flowers, fruit setting, epinasty of leaf petiole and senescence and abscission of leaves, are affected under the influence of hormones. Moreover, it is apparent that studies on hormonal effects and their application offer numerous advantages for the regulation of growth in mulberry plants.

The propagation of mulberry plants through induction of roots in cuttings under the influence of hormones is the most important in this context and has received the greatest attention, especially about the effect of auxins. Both synthetic including commercial chemical compounds act as auxin and natural auxins are very much effective to induce roots on cuttings on many mulberry varieties which are difficult to propagate vegetatively. Apart from auxins, ethylene and abscisic acid have also been found to induce adventitious roots on cuttings. However, literature concerning their effect is scanty and needs further study, especially as regards the effect of ehtylene since the effect of ethylene on stimulation of adventitious root formation is well recognized.

The evidence that GA acts as one of the promoting factors for leaf emergence and growth of shoots and that the effect of GA is more remarkable under condition of soil water stress and low soil temperature may open a new vista in mulberry cultivation under rainfed conditions in low rainfall areas and in temperate regions.

The knowledge that GA promotes - and ABA inhibits - seed germination, TIBA accelerates lateral bud sprouting, ethrel along with GA accelerates the development of lateral buds and cytokinins break dormancy and promote the growth of axillary buds may be applicable to regulate seed germination and the growth of mulberry plants at different times.

The concepts that sex expression in the mulberry is controlled by endogenous hormones and with the application of exogenous hormones sex can be altered are very helpful in breeding works. Unfortunately, progress in this area is hindered because sex expression in many varieties is not promising.

Significant progress has also been made in our knowledge about the effects of hormones in tissue culture and an understanding is presently being reached on the interactive involvement of auxin and cytokinin in the regulation of root and shoot induction in the callus, preservation of the callus in normal temperature for a long period with ABA along with PABA and overcoming the pseudodormancy problem of preserved callus with the help of GA.

Although we have much information about the effects of hormones on mulberry plants and in tissue culture, our knowledge of the hormonal effects is full of gaps ; virtually nothing is known about the biochemistry of the hormonal effects. Moreover, some of the effects are still obscure. For example, the evidence that GA spraying responds more than auxins in increasing the survival percentage of the cuttings which have two upper leaves intact and ABA promotes rooting of preformed primordia of mulberry cuttings cannot be explained by the general mode of action of the respective hormones. Obviously, it will be a long way from the present state of knowledge to an understanding of the metabolic events occurring in mulberry plants upon exposure to exogenous hormones.

REFERENCES

ABDULLAEV I.K., ALIEV M.O. (1965) Effect of gibberellin on the growth, development and food value of mulberry tree leaves. Izv. Akad. Nauk. Azer. SSR, Ser. Biol. Nauk., 3, 3-8.

ABELES F.B. (1972) Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. Ann. Rev. Plant Physiol., 23, 259-292.

AHMED S.M., MATHEW P. (1977) Morphological changes in leaves of mulberry induced by IAA and GA. Geobios, 4(6), 235-238.

AHMED S.M., MATHEW P. (1978) Study on the effect of IAA and GA_3 on rooting of mulberry stem. Geobios (Jodhpur), 5(3), 107-110.

AHMED S.M., MATHEW P. (1980) Effect of IAA and gibberellic acid on dormant lenticels of mulberry (*Morus alba*). Phytomorphology, 29(1), 7-13.

ALEKSANDROV A. (1988) Investigations of the rooting process in ripe mulberry cuttings taken from various overmatured shoots. Rasteniev "D Nauki, 25(9), 86-93.

ALEKSANDROV A., ZHELEV A., KARANOV E., PEEVA I. (1983) Use of indolebutyric acid in rooting ripe mulberry cuttings. Gradinar Lozar. Nauka, 20(8), 25-32.

ALIEV M.O. (1980) Use of kinetin with hybridization of *Morus* forms of different ploidy. Trans. Acad. Sci. Az. SSR, Ser. Biol., Med. Sci., 5, 37-43.

ANONYMOUS (1967-68) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Karnataka, India.

ANONYMOUS (1972-73) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1973-74) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1974-75) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1975-76) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1976-77) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1977-78) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

ANONYMOUS (1978-79) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.
ANONYMOUS (1979-80) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.
ANONYMOUS (1985-86) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Karnataka, India.
ANONYMOUS (1986-87) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Karnataka, India.
ANONYMOUS (1987-88) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Karnataka, India.
ANONYMOUS (1988-89a) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.
ANONYMOUS (1988-89b) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Karnataka, India.
ANONYMOUS (1989-90) Annual Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.
BINDROO B.B., TIKU A.K., JAVID G.N. (1983) Studies on the propagation of mulberry under temperate climatic condtions. Part II : Propagation through soft wood cuttings. National Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, p. 65.
CHAILAKHYAN M. Kh., KHYRANIN V.E. (1979) Planta, 144, 205.
CHAKRABORTY S., MUKHERJEE S.K. (1980) Effect of ringing, growth promoters and sucrose either singly or in combination on the rooting of poor rooting mulberry variety (var. Kosen). Proc. Sericulture Symposium and Seminar, Tamilnadu Agri. Univ., 73-77.
CZARNOLOWISKI H. (1966) The influence of gibberellic acid on the growth of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings. Zeszythn Nauk. Univ. Miicolata Kopernika Tornnir Biol., 8, 285-294.
DURAND B., DURAND R., KHALEM G., CHAMPAULT A., DELAIGUE M. (1972) Soc. Bot. Fr. Memories, p. 191.
EVANS M.L. (1974) Rapid responses to plant hormones. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 195-223.
FOTADAR R.K., AHSAN M.M., DHAR K.L., DHAR A. (1990) Screening of mulberry varieties for rooting and induction of rooting by the use of growth regulators. Sericologia, 30(3), 347-361.
FRANKEL R., GALUN E. (1977) Pollination mechanisms and reproduction of plant breeding. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
GHUGALE D.D., KULKARNI D.D., NARASHIMHAN R. (1971) Effect of auxins and gibberellic acid on growth and differentiation of *Morus alba* and *Populus nigra* tissues *in vitro*. Indian J. Expt. Biol., 9(3), 381-384.
HOARD G.V., LENTON J.R., JACKSON M.B., ATKIN R.K. (1987) Hormone Action in Plant Development : A Critical Appraisal. Butterworths, London, Boston, Durban, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington, p. 315.
HONDA T. (1970) Studies on the propagation of mulberry trees by cuttings. Bull. Sericult. Exp. Sta., 24(1), 231-236.
HONDA T. (1972) Technical problems on mulberry cuttings in Japan. JARQ, 6(4), 235-239.
INFORZATO R.O. (1950) The use of hormones in the rooting of cuttings of mulberry. Bragantia, 10(12), 385-387.
IRVING R.M. (1969) Characterization and role of an endogenous inhibitor in the induction of cold hardiness in *Acer negundo*. Plant Physiol., 44, 801-805.
IRVING R.M., LAMPHEN (1968) Regulation of cold hardiness in *Acer negundo*. Plant Physiol., 43, 9-13.
IVANICKA J. (1987) *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. Sc. Hortic. (Aust.), 32(1,2), 33-40.
IWATA E., NAKAGAWA I. (1972a) Effect of gibberellin on apical growth inhibition of mulberry by ethrel. J. Sericult. Sci. Japan, 41(4), 294-300.
IWATA E., NAKAGAWA I. (1972b) Effect of gibberellin and chloroethane phosphonic acid on the sprouting and growth of lateral buds in mulberry plants. J. Sericult. Sci. Japan, 41(4), 294-300.

JAISWAL V.S., KUMAR A. (1980a) Induction of male inflorescences on the female plants of *Morus nigra* L. by GA_3. Indian J. Expt. Biol., 18, 911-913.
JAISWAL V.S., KUMAR A. (1980b) Sex reversal and fruit formation on the male plants of mulberry (*Morus nigra* L.) by 2-chloro-ethylphosphonic acid. J. Expt. Bot., 31, 497.
JONES R.L. (1973) Gibberellins : their physiological role. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 571-598.
KATAGIRI K. (1989) Callus induction in culture of mulberry pollen. J. Sericult. Sci. Japan, 58(6), 527-529.
KEY J.L. (1969) Hormones and nucleic acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 449-474.
KIM H.R., PATEL K.R., THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146(3), 335-340.
LEE J.W. (1984) Effects of foliar spray of kinetin (6-furfurylaminopurine) on the growth of mulberry tree and the metabolica activities in the leaves. Korean J. Sericult. Sci., 26(1), 1-20.
LETHAM D.S., PALNI L.M.S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Ann. Rev. Plant Physiol., 34, 163-197.
MILBORROW B.V. (1974) The chemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 259-307.
MINAMIZAWA K. (1974) Studies on the mechanism of localised sex differentiation in mulberry. VI. Induction of the localised sex expression in monecious mulberry twigs by transitional alteration of NAA treatment at mid-growth stage of the shoot. J. Sericult. Sci. Japan, 42(2), 146-149.
MINAMIZAWA K., MATSUHISA F. (1978) Lateral sprouting in mulberry and its control by naphthalene acetic acid application. J. Sericult. Sci. Japan, 47(4), 343-350.
MISHRA A.K., JAUHARI O.S. (1970) Root induction in layers, stem cuttings of *Morus alba* L. and *Ziziphus mauritiana* Lam with special reference to plant growth regulators. Indian J. Hortic., 27(3/4), 141-146.
MOHAN RAM H.Y., JAISWAL V.S. (1974) Plant growth substances. Y. Sumiki (ed.), Hirokawa Publ. Co., Tokyo, p. 987.
MOORE T.C. (1979) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer Verlag, New York, Heidelber, Berlin, p. 274.
MUKHERJEE S.K., SHARMA D.N. (1971) Effect of some growth regulators on the rooting of mulberry cuttings. Indian J. Seric., 10(1), 23-27.
MUKHERJEE S.K., SIKDAR A.K. (1974) Effect of ringing and application of growth regulators and vitamins on the propagation of mulberry cuttings. Indian J. Seric., 13(1), 1-10.
MUKHERJEE S.K., SIKDAR A.K. (1977) Effect of auxin, vitamins and their combinations on the rooting of mulberry cuttings. Indian J. Seric., 16, 1-9.
MURASHIGE I. (1974) Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 135-166.
NI G. *et al.* (1984) On propagating Husang, a group of mulberry varieties, by means of cuttings. (3) An experiment on inducing the mulberry cuttings by quick immersion in the solution of IBA. Canye Kexue, 10(2), 63.
NINO T. (1990) Establishment of the cryopreservation procedure of mulberry shoot tips from *in vitro* grown shoots. J. Sericult. Sci. Japan, 59(2), 135-142.
OGURE M. (1976) Effects of ethrel on sex expression in mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 45(2), 185-186.
OGURE M., HARASHIMA N., NAGANUMA K., MATSUSHIMA M. (1980a) Effects of ethrel and gibberellin on sex expression in mulberry, *Morus* spp. J. Sericult. Sci. Japan, 49(4), 335-341.
OGURE M., HARASHIMA N., NAGANUMA K., MATSUSHIMA M. (1980b) Effect of time for ethrel treatment on sex expression in mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 49(6), 517-520.
OGURE M., HARASHIMA N., NAGANUMA K., MATSUSHIMA M. (1981) Sex expression on ethrel treated and non treated shoots of a tree, *Morus alba* L. J. Sericult. Sci. Japan, 50(1), 16-19.
OHNISHI T. (1986a) Influence of gibberellin treatment on the growth of mulberry trees under different conditions of soil water content. J. Sericult. Sci. Japan, 55(4), 289-292.
OHNISHI T. (1986b) Influence of gibberellin treatment on the growth of mulberry trees under different conditions of soil temperature. J. Sericult. Sci. Japan, 55(4), 293-296.

OHINISHI T., AOKI M. (1966a) Studies on the gibberellin treatment for the mulberry tree. Part 3 : Effect of gibberellin treatment on mulberry trees by different manuring. Bull. Fac. Text. Sci. Kyoto Univ., 5(1), 43-48.
OHNISHI T., AOKI M. (1966b) Studies on the gibberellin treatment for the mulberry tree. Part 4 : Effect of potassium application on the inorganic components of mulberry leaves. Bull. Fac. Text. Sci. Kyoto Univ., 5(1), 49-55.
OHNISHI T., KIYAMA S. (1987) Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance. J. Sericult. Sci. Japan, 56(5), 407-410.
OHNISHI T., YASUKURA F., TAN J. (1986) Preservation of mulberry callus by the addition of both abscisic acid and P-aminobenzoate in culture medium. J. Sericult. Sci. Japan, 55(3), 252-255.
OHYAMA K. (1967) Effect of TIBA (2,3,5-triodobenzoic acid) spray on the acceleration of lateral bud sprouting on mulberry tree. Bull. Sericult. Exp. Sta., 22(1), 1-12.
OHYAMA K., OKA S. (1975) Effect of abscisic acid and gibberellic acid on bud break in mulberry plants. J. Sericult. Sci. Japan, 44(4), 321-326.
OHYAMA K., OKA S. (1976) Regeneration of whole plants from isolated shoot tips of mulberry trees. J. Sericult. Sci. Japan, 45(2), 115-120.
OKA S. (1985) *In vitro* culture of isolated buds and organ formation in mulberry. Bull. Sericult. Expt. Sta., 29(6), 747-852.
OKA S., OHYAMA K. (1973) Induction of callus and effects of constituents of medium on callus formation on mulberry tree. J. Sericult. Sci. Japan, 42(4), 317-324.
OKA S., OHYAMA K. (1974) Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. 1. Effects of growth substance on the development of shoots and organ formation from winter buds. J. Sericult. Sci. Japan, 43(5), 230-235.
OKA S., OHYAMA K. (1975) Studies on *in vitro* culture of excised bud in mulberry tree. 1. Effect of growth substances on the development of shoots from bud. J. Sericult. Sci. Japan, 44(6), 444-450.
OKA S., OHYAMA K. (1976) A study on the medium for the sub-culture of mulberry callus. J. Sericult. Sci. Japan, 45(5), 385-391.
OKA S., OHYAMA K. (1978) Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. III. Effects of agar concentration, pH and sugars of medium on the development of shoot from winter buds. J. Sericult. Sci. Japan, 47(1), 15-20.
OKABE T. (1984) Relationship between spray of growth regulator to the mulberry seedlings, flowering and fruiting. J. Sericult. Sci. 53(1), 21-26.
OSHIGUE K. (1989) On the redifferentiation of shoot callus to different culture in mulberry. J. Fac. of Textile Sci. and Techn., Shinshu Univ, No. 107, Series E, Agriculture and Sericulture, 11, 12-39.
PALEG L.G. (1965) Physiological effects of gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol., 16, 291-322.
PHARIS R.P., KING R.W. (1985) Gibberellins and reproductive development in seed plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 36, 517-568.
PRATT H.K., GOESCHL J.D. (1969) Physiological roles of ethylene in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 541-584.
PUROHIT S.S. (1983) Aspects of physiology and biochemistry of plant hormones. Kalyani Publishers, New Delhi, Ludhiana, p. 345.
PYLNOV I.V. (1961) Effect of gibberellin on the grwoth of the mulberry tree, *Morus alba* L. Vet. Akad. Nauk Ser. Biol., 1, 46-50.
RAO L.S.P., KHAN A.A. (1963) Vegetative propagation of Japanese mulberry varieties by use of growth regulators. Indian J. Seric., 1(3), 7-23.
RAO L.S.P., RAO T.P., NARAYAN F.S. (1963) Response of mulberry seeds to gibberellic acid treatment. Curr. Sci., 32, 348-349.
SAITO H., KATAGIRI K. (1989) Adventitious bud induction in leaves isolated from winter buds of mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 58(3), 197-202.
SAITO H., MORAHASHI Y. (1981) Actions of phytochrome and low temperature on germination of mulberry seeds. J. Sericult. Sci. Japan, 50(5), 415-421.
SCOTT T.K. (1972) Auxins and roots. Ann. Rev. Plant Physiol., 23, 235-258.

SEKI H., TAKEDA M., TRUTRUMI K., USHIKI Y. (1971) Studies on the callus culture of the mulbeery tree. The effect of concentrations of auxin and kinetin on the callus culture of the mulberry stem. J. Sericult. Sci. Japan, 40(2), 75-81.
SEKI H., TAKEDA M., MEGURO K. (1972) *In vitro* culture of flower organs in mulberry tree. 1. Culture of female flower organs in the mulberry bud. J. Sericult. Sci. Japan, 41(3), 181-186.
SEKI H. TAKEDA M., YAMAGUCHI T. (1974) Studies on the callus culture of the mulberry tree (II). The callus culture of embryo and endosperm of the mulberry seed. J. Sericult. Sci. Japan, 43(6), 487-491.
SEN P.K., BOSE T.K. (1964) Physiological studies on regeneration of roots. VI. Effects of growth substances on root formation in justica, mulberry and mango stem cuttings and concomitant changes in carbohydrate and nitrogenous substances in the rooting tissues. Indian Agriculturist, 8(2), 102-119.
SHANUMUGAVELU K.G. (1975) Induction of rooting of mulberry (*Morus alba* Linn.) cuttings with the aid of plant growth regulators under intermittent mist. Indian J. Seric., 14(1), 22-26.
SHIVE J.W. (1940) Growth substances and their practical importance. *In* Horticulture H.L. Pearse, CAB Publ., 1948 Ed., p. 23.
SKOOG F., ARMSTRONG D.L. (1970) Cytokinins. Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 359-384.
SUMNER D.C., LYON J.L. (1967) Planta. 75, 28-32.
SUZUKI T. (1986a) Effects of ethrel, auxin and abscisic acid on leaf (petiole) abscission of new shoots of mulberry (*Morus alba*). J. Sericult. Sci. Japan, 55(4), 309-313.
SUZUKI T. (1986b) Effects of ethrel treatment of epinasty of mulberry petioles. J. Sericult. Sci. Japan, 55(6), 494-497.
SUZUKI T. (1987) Effects of abscisic acid and ethephon on rooting of nodes of mulberry hard wood stem sections. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61(1), 37-40.
SUZUKI T., KITANO M. (1989a) Lateral bud development and shoot growth in low-pruned *Morus alba* as affected by stem orientation. Physiol. Plant, 76(4), 493-499.
SUZUKI T., KITANO M. (1989b) Dormancy and spring development of lateral buds in mulberry (*Morus alba*). Physiol. Plant, 75(2), 188-194.
SUZUKI T., KITANO M., KOHNO K. (1988) Lateral bud outgrowth on decapitated shoots of low-pruned mulberry (*Morus alba*). Tree Physiol., 4(1), 53-60.
TAKIZAWA Y., KANO S. (1958) Abs. 2nd meeting Japan Gib. Res. Assoc., p. 78.
TAKIZAWA Y., KANO S. (1960) Abs. 3rd meeting Japan Gib. Res. Assoc., p. 11.
TINCKER M.A.H., UNWIN C.H. (1939) J. Roy. Hort. Soc., 64, 554-566.
TORREY J.G. (1976) Root hormones and plant growth. Ann. Rev. Plant. Physiol., 27, 435-459.
TSUBOI A., HONDA T. (1971) The relation between the time of treatment and the concentration of α-naphthalene acetate for root formation in hard wood cuttings of mulberry tree. J. Sericult. Sci. Japan, 40(1), 23-31.
WALTON D.C. (1980) Biochemistry and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 453-489.
WAREING P.F., SAUNDERS P.F. (1971) Hormones and dormancy. Ann. Rev. Plant Physiol., 22, 261-288.
WILKINS M.B. (1969) Physiology of Plant Growth and Development. McGraw Hill, Maidenhead (Berkshire, England), p. 695.
YAHIRO M. (1980) Effect of cytokinin treatments on the sprouting of the dormant buds in the mulberry tree, *Morus alba*. Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ., 0(30), 11-16.
YAHIRO M., HAYASHI M. (1971a) Change of the growth inhibitor and promoter extracted with ether from mulberry winter buds during the dormancy and their colour reaction with Ehrilch's reagent. J. Sericult. Sci. Japan, 40(1), 1-4.
YAHIRO M., HAYASHI M. (1971b) Changes of the growth inhibitor and promoter extracted with water from mulberry winter buds during the dormancy. J. Sericult. Sci. Japan, 40(1), 5-7.
YAHIRO M., TASHIRO K. (1989) Confirmation of abscisic acid (ABA) in the mulberry winter buds in its resting period. J. Sericult. Sci. Japan, 58(1), 79-80.
YANAGISAWA Y. SHIOIRI H. (1987) Relationship between the growth of axillary buds and the content of cytokinins in the leaves after cutting mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 56(5), 390-393.

YANAGISAWA Y. SHIOIRI H., ITO K., SUZUKI A., TANAKA K. (1985) Separation and identification of the cytokinins in mulberry, *Morus alba*. J. Sericult. Sci. Japan, 54(6), 439-444.
YANAGISAWA Y., SHIOIRI A., TAKAHASHI M. (1988) Relationship between the growth of axillary buds and the cytokinin content in mulberry branches after pruning. J. Sericult. Sci. Japan, 57(4), 323-327.
YANG S.F., HOFFMAN N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 155-189.
YASUKURA F., OHNISHI T. (1990) Effects of refrigeration period of mulberry calluses on their growth after the storage and pseudo-dormancy induced by the storage. J. Sericult. Sci. Japan, 59(4), 255-258.

Revue

EFFET DES HORMONES SUR LE MURIER - REVUE

S. BISWAS & K. SENGUPTA

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

INTRODUCTION

Le terme "hormone" s'applique aux composés chimiques organiques spécifiques qui, étant produits - la plupart du temps en petites quantités - par des parties données de l'organisme, sont transportés vers d'autres régions où ils induisent des effets physiologiques bien définis et typiques. Il est de plus en plus manifeste que les hormones ont un impact décisif sur la physiologie et la biochimie des végétaux et qu'elles jouent un rôle clé dans la vie des plantes supérieures.

Un grand nombre de revues (Paleg, 1965 ; Key, 1969 ; Pratt et Goeschl, 1969 ; Skoog et Armstrong, 1970 ; Wareing et Saunders, 1971 ; Abeles, 1972 ; Scott, 1972 ; Jones, 1973 ; Evans, 1974 ; Milborrow, 1974 ; Torrey, 1976 ; Walton, 1980 ; Letham et Palni, 1983 ; Yang et Hoffman, 1984 ; Pharis et King, 1985) et de livres (Wilkins, 1969 ; Moore, 1979 ; Purohit, 1983 ; Hoard et coll., 1987), consacrés à la biochimie et à la physiologie du métabolisme ainsi qu'au mode d'action des hormones, ont été publiés. Ces ouvrages discutent les concepts relatifs au contrôle hormonal du développement végétal.

Parmi les hormones connues, les auxines, les gibberellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscisique ont les effets les plus marqués sur la croissance des plantes. La régulation de la croissance chez les végétaux supérieurs est comparable à la musique en contrepoint, chacun des divers régulateurs de croissance jouant de concert sur les instruments de la croissance. Dans certains cas, une hormone spécifique peut constituer le principal facteur limitant la croissance, tandis que l'interaction simultanée de deux ou plus des types d'hormones végétales énumérés plus haut régulant les divers aspects de la croissance et de la différenciation semble être une caractéristique commune à tous les végétaux supérieurs.

Les effets des hormones sur la croissance sont variés et diffèrent souvent d'un organe à l'autre et d'une plante à l'autre. Ceci n'est toutefois pas étonnant car la croissance est en elle-même un phénomène complexe. Par exemple, les organes d'une plante diffèrent pour ce qui concerne le site de la croissance et la façon dont elle se produit. Cette revue vise donc à résumer les travaux relatifs aux effets des hormones sur le mûrier, plus particulièrement sur les applications exogènes de phytohormones sur la croissance et le développement des plants de mûrier.

a) Composés chimiques commerciaux agissant comme auxines : "Poebder", "Rootone", "Rutin", "Seradix BN" 2 et 3.

b) Abréviations utilisées : ABA : acide absicique ; BA/BAP : 6-benzylaminopurine (6-benzyl adénine) ; "ethrel"/"ethephon" : acide 2-chloroétyl phosphonique ; CCC/cycocel : chlorure d'ammonium 2-chloroéthyl triméthyl ; 2,4-D : acide 2,4-dicholorophénoxy acétique ; GA/GAS/GA_3 : gibberellines ; AIA : acide indol-3-acétique ; AIB : acide indol butyrique ; AIP : acide indol propionique ; 2 iP : N^6-2-isopényladénine ; ANA/λ-ANA : acide naphthalène acétique ; β-ANA : β-acide naphthoxyacétique ; PABA : P-aminobenzoate ; 2,4,5-TCP : acide 2,4,5-trichlorophénoxy-acétique ; ATIB : acide 2,3,5-triodobenzoïque.

A. EFFETS DES AUXINES SUR LE MURIER

Sur l'induction et la croissance des racines :

Les auxines ont un effet bénéfique évident sur le racinement des boutures de mûrier. Les substances tant naturelles que synthétiques, y compris les composés commerciaux, qui agissent comme les auxines, induisent de manière très efficace la formation de racines et l'augmentation du nombre et de la longueur de racines chez un grand nombre de variétés de mûriers difficiles à reproduire de manière végétative. Cependant, toutes les auxines n'agissent pas sur toutes les variétés de mûriers. Par exemple, les auxines "Seradix BN" 2[(a)] et 3 agissent sur les variétés de mûriers "Captan" (Inforzato, 1950), l'hormone Seradix "Poebder" sur "Kosen" et "Goshoerami" (Rao et Khan, 1963), "Rootone" sur "Assamese Local", "Portugal", "Gosen, "Assama jatti", "China white", "Kaliakutahi" et "Susanpur" (Anonyme, 1967-68), la "Rutin" sur "Kosen" (Anonyme, 1979-80), l'AIA[(b)] sur "Kosen" (Mukherjee et Sharma, 1971) et sur "Chinese white" (Fotadar et coll., 1990), l'AIB sur une variété non déterminée du Bengale occidental (Sen et Bose, 1964), sur "Kanva-2", "MR-2" (Shanmugavelu, 1975), "Husang" (Ni et coll., 1984), "Kinira" (Aleksandrov, 1988), "Goshoerami", "Rokyaso", "Kairyonezumigaeshi", "Ichinose" et "Kokuso 27" (Fotadar et coll., 1990), l'ANA sur "Kanva 2" (Shanmugauelu, 1975), "S146" (Mukherjee et Sikdar, 1977) et "Kosen" (Anonyme, 1979-80) et 2,4-D sur "S-146" (Anonyme, 1972-73) et sur "Kosen" (Anonyme, 1979-80) permettent d'induire des racines, tandis que les auxines AIA, ANA et 2,4-D sur les variétés "Kokuso", "Morettiana", "China" et "CSRS-1" (Anonyme, 1973-74) et "Rootoone" sur "Kokuso-70", "Morettiana" et *Morus levigata* (Anonyme, 1967-68) n'ont aucun effet.

Un grand nombre de travaux ont également démontré que l'effet des auxines diffère en fonction des genres et des concentrations d'auxines, des feuilles de mûriers, des époques de traitement et de l'âge des pousses de mûriers utilisées pour le bouturage. Mukherjee et Sharma (1971), au cours d'une étude sur le racinement des boutures de mûriers de la variété "Kosen", ont observé que l'augmentation de la concentration d'AIA de 100 à 500 ppm induisait un meilleur racinement et une meilleure croissance, alors que l'inverse a été observé pour l'AIB et l'ANA. Ahmed et Mathew (1978) ont observé que le poids sec de la racine de mûrier (*Morus alba* L.) était inférieur chez les boutures traitées avec la concentration maximale d'AIA et augmentait progressivement lorsque la concentration diminuait. Cependant, les études détaillées de Honda (1970, 1972) et d'Alexandrov et coll. (1983) sur l'effet des substances de croissance sur l'initiation de racines des boutures de bois tendre (nouvelle pousse), de bois semi-tendre et de bois dur ont montré que l'ANA est le plus efficace pour l'induction de racines chez ce type de boutures et que l'ANA et l'AIB sont également efficaces pour l'initiation de racines des boutures de bois dur. De plus, l'effet de l'AIA est médiocre dans tous les cas par rapport à l'ANA et à l'AIB. Honda (1970) a également observé que l'ANA (α-naphthalène acétate) augmentait le pourcentage de racinement et la quantité de racines des boutures de bois semi-tendre lorsqu'elles étaient plongées dans une solution peu concentrée de 10 à 20 ppm de cette substance pendant 24 heures ou dans une solution concentrée de 4 000 ppm pendant 2 à 3 secondes. Cependant, pour le racinement des boutures de bois dur, les concentrations optimales d'ANA sont de 4 000 à 7 000 ppm si l'on utilise la méthode d'immersion et de 150 ppm si l'on utilise la méthode de l'immersion dans la solution à faible concentration qui consiste à maintenir les boutures dans la solution pendant 24 heures. Des études complémentaires (Anonyme, 1977-78) sur la méthode d'immersion dans la solution concentrée d'AIA, d'AIB, d'ANA et de 2,4-D sur le racinement de la variété "Kosen" ont également démontré que l'ANA (2 000 ppm) augmentait aussi bien le poids frais que le poids sec des racines mais que d'autres hormones avaient un effet négatif sur le racinement.

Il est également évident que, dans le cas de l'application d'ANA de longue durée (24 heures), l'effet stimulant sur le racinement diminue lorsque la concentration augmente. Par exemple, Mukherjee et Sikdar (1977), au cours d'une étude sur le racinement des boutures matures de S-146 (variété de mûrier isolée), ont observé que le nombre de racines, la longueur des racines et le poids sec et frais des racines étaient maximaux chez les boutures traitées avec 25 ppm d'ANA et que tous les paramètres diminuaient de manière significative lorsque la concentration augmentait. De plus, la concentration maximale (150 ppm) d'ANA utilisée a des effets inhibiteurs sur tous les aspects du développement des racines. En testant l'effet de différentes concentrations d'acide α-napthalène acétate (ANA) sur la formation de racines chez les boutures de bois dur en fonction de différentes

durées, Tsuboi et Honda (1971) ont découvert une relation entre la durée du traitement et la concentration d'ANA. Ils ont montré que (1) tant dans le cas de l'immersion longue à faible concentration que dans le cas de l'immersion courte dans une concentration élevée, on observait un effet similaire sur la formation de racines pour les concentrations allant de 150 à 7 500 ppm ; (2) la fourchette des durées d'immersion efficaces pour la formation des racines était plus large à faible concentration et plus étroite à forte concentration ; (3) étant donné l'humidité excessive et la faible température du sol, la formation des racines serait initiée, particulièrement dans le cas de l'immersion de courte durée, à forte concentration.

L'addition de sucrose à l'auxine améliore également le racinement des boutures de mûrier. Honda (1970) a observé que l'addition de sucrose (2 à 3 %) dans une solution d'ANA peu concentrée améliorait le racinement des boutures de bois semi-tendre (10 ppm) et de bois dur (100 ppm). Chakraborty et Mukherjee (1980) ont traité des boutures de mûrier avec de l'AIA, de l'AIB ou du 2,4-D utilisés dans des concentrations de 50 et 100 ppm avec du sucrose à 2 % ou en combinaison par la méthode de l'immersion pendant 24 heures et ont observé que la combinaison des substances de croissance n'était pas très efficace, sauf l'AIA additionnée de sucrose à 2 % et le 2,4-D (100 ppm) additionné de sucrose à 2 %. Il est vrai que les auxines et le sucrose entraînent tous deux une augmentation de la quantité de ribosomes. Les auxines, en présence de sucrose, pourraient avoir un effet synergique sur la disponibilité ou l'utilisation de l'ARN messager (Key, 1969).

D'après les études de Mukherjee et Sikdar (1977), l'addition de vitamines, en particulier de thiamine, à l'ANA augmente le taux de survie des boutures matures de S-146. Cependant, l'effet n'est pas très prometteur car la thiamine n'affecte pas directement la formation des racines mais stimule la croissance ultérieure des racines chez les boutures à croissance lente lorsqu'elle est mélangée à des régulateurs de croissance (Tincker et Unwin, 1939 ; Shive, 1940).

Il a été démontré, dans un grand nombre d'études, que les boutures découronnées sont beaucoup plus réceptives aux auxines que les boutures non découronnées (Mishra et Jauhari, 1970 ; Anonyme, 1972-73 ; Mukherjee et Sikdar, 1974 ; Chakraborty et Mukherjee, 1980). Les boutures découronnées de la variété "Kosen", même lorsqu'elles sont étiolées, peuvent présenter une réaction prononcée aux hormones, particulièrement de 2,4-D (Anonyme, 1977-78). Mukherjee et Sikdar (1974) ont observé que le traitement avec 2,4-D à 50 ppm donne les meilleurs résultats chez les boutures découronnées de la variété de mûrier S-146.

L'origine et la formation de racines adventives chez les boutures après plantation dépendent du développement des primordiums radicaux et de la compétition entre chaque primordium. L'auxine permet une formation plus rapide des primordiums et en augmente le nombre. Par exemple, dans une expérience de Honda (1970), lorsque les boutures ont été traitées avec de l'ANA et conservées à une température souterraine de 30 °C, la formation de cal s'est produite 5 jours plus tard et le premier stade du développement des primordiums radicaux a pu être observé le 6e jour. La traversée de l'épiderme par les primordiums radicaux et l'initiation des racines commencent dans les 10 à 12 jours. L'augmentation du nombre de racines ralentit après 18 à 20 jours. Beaucoup d'autres primordiums radicaux restent latents. Dans le cas des boutures non traitées à l'ANA et conservées à la même température, la formation de cal était pratiquement identique à celle observée dans le cas du traitement à l'ANA, mais la formation des primordiums radicaux était plus lente et en nombre inférieur. Ces résultats ont conduit l'auteur à conclure que l'ANA n'avait aucun effet sur la formation du cal.

Sur les bourgeons latéraux :

De nombreux chercheurs ont observé que l'apex de la pousse de mûrier, lorsqu'il est en croissance, inhibe la croissance externe des apex latéraux du même plant. Cette influence inhibitrice est exercée, au moins partiellement, par l'auxine formée à l'apex terminal. Chez les plants étêtés, l'effet inhibiteur peut être obtenu par l'application d'auxine (ANA). Par exemple, dans une expérience de Minamizawa et Matsuhisa (1978), les pousses ont été pincées et les feuilles coupées puis vaporisées avec 500 ppm d'ANA. Dans ce cas, le bourgeonnement latéral a été retardé, sauf pour 2 ou 3 bourgeons apicaux. Lorsque les pousses ont été placées horizontalement et vaporisées avec 500 ppm d'ANA, il n'y a eu aucun bourgeonnement et tous les bourgeons ont eu une croissance retardée. Suzuki et coll. (1988) ont utilisé l'ANA en brumisation pour réduire le nombre de bourgeons latéraux des pousses défoliées et des pousses étêtées des taillis de mûriers (*Morus alba* L. cv. Shinichinose).

Le bourgeonnement latéral peut être accéléré en inhibant le transport de l'auxine (AIA) du sommet de la pousse à l'aide d'une auxine faible, l'acide 2,3,5-triodobenzoïque (ATIB). Ohyama (1967) a observé que la vaporisation d'ATIB permettait d'obtenir un bourgeonnement latéral dans les jours qui suivent le traitement. L'accélération du nombre et de la croissance des bourgeons est encore plus accentuée lorsque la vaporisation est suivie d'un étêtement. Cependant, l'effet de l'ATIB sur le bourgeonnement latéral semble varier selon les variétés de mûriers. Dans les études de Ohyama (1967), il a été observé que les variétés "Tomieso" et "Hosoe" donnent des réactions maximales à l'ATIB, alors que "Kairyo-roso" donnent les réactions minimales. Il a par ailleurs été démontré (Anonyme, 1976-77, 1977-78, 1978-79) que l'ATIB n'avait aucun effet sur l'augmentation de la croissance et du rendement en feuilles chez la variété "Mandalay".

Sur le début de la sénescence foliaire :

Pour ce qui concerne l'effet de l'auxine sur le début de la sénescence foliaire, Ahmed et Mathew (1977) ont observé que, chez le mûrier, le début de la sénescence foliaire était fortement retardé par l'AIA sans qu'il y ait d'effet prononcé sur le nombre de nouvelles feuilles. Ces résultats concordent avec l'hypothèse la plus admise selon laquelle le retardement de la sénescence foliaire par l'auxine est étroitement lié à la régulation de la synthèse des protéines et de l'ARN, l'auxine maintenant l'ADN comme matrice de synthèse de l'ARN (Key, 1969).

Sur l'abscission :

D'après les informations disponibles, il semble que l'auxine retarde l'abscission des feuilles. Suzuki (1986) a observé que l'abscission des pétioles défoliés de mûriers (*Morus alba* L. cv. Ichinose) diminuait lorsqu'on laissait une partie du pétiole (1 cm de long) et lorsque les surfaces sectionnées étaient traitées avec de la pâte à la lanoline contenant 500 ppm d'auxine (AIA). D'autres aspects de cette question sont abordés en détail dans le chapitre "Ethylène".

Sur l'expression/l'inversion des sexes :

L'expression sexuelle chez les végétaux est influencée par les hormones (Frankel et Galun, 1977) et, dans la plupart des cas, l'équilibre endogène relatif entre le GA et l'éthylène est impliqué dans les différenciations des sexes (Mohan Ram et Jaiswal, 1974). Cependant, il arrive qu'on observe l'implication d'autres hormones. L'implication interactive de l'auxine et de la cytokinine dans la différenciation des sexes a été décrite par Durand et coll. (1972). Chez le mûrier, l'induction d'une expression sexuelle localisée par modification transitionnelle après traitement à l'ANA lorsque la pousse est en milieu de croissance (Minamizawa, 1974) ainsi que le fait que la vaporisation d'AIA (1 000 ppm) est très efficace pour l'induction de femelles chez la variété de mûrier "Kosen" (Anonyme, 1976-77) suggèrent fortement que les auxines pourraient jouer un rôle, au moins partiel, dans l'expression du sexe femelle. Cependant, dans ce contexte, on dispose également d'informations démontrant que les auxines, sauf une auxine faible, n'exercent aucune influence sensible sur l'inversion des sexes ; l'ATIB favorise rarement la productions d'inflorescences mixtes chez un clone mâle (RFS-135) du CSRTI de Mysore (Anonyme, 1986-87). A quelques exceptions près, l'hypothèse de l'effet positif de l'auxine sur l'expression du sexe femelle est appuyée par le développement *in vitro* d'organes sexuels femelles. Seki et coll. (1972) ont observé que les organes de la fleur femelle de mûrier se développaient bien dans le milieu de Nitsch qui contient de l'AIA (2,0 ppm). Ils ont également observé que la floraison des plants cultivés n'était pas synchrone. La maturation et la division des fleurs cultivées se produisent naturellement.

Sur la culture des tissus :

1) Sur la culture des tissus somatiques :

La culture tissulaire constitue l'une des méthodes utiles dans l'étude des problèmes physiologiques des plants ligneux, comme la floraison, la dormance et la croissance des bourgeons car des corrélations entre tissus ou organes peuvent être éliminées dans des conditions déterminées par des systèmes de culture tissulaire. Les composants organiques les plus importants des milieux de culture tissulaire sont l'auxine et la cytokinine. L'interaction entre les deux substances hormonales régule l'initiation des racines et des pousses. Seki et coll. (1971) ont réalisé une étude fondamentale

sur la culture du mûrier. Ils ont observé que l'AIA et l'ANA sont tous deux efficaces pour la prolifération du cal dans le milieu de Murashige et Skoog (MS) additionné de kinétine. Pour la multiplication du cal, l'AIA est efficace en l'absence de kinétine. Cependant, on obtient la multiplication optimale en présence de 0,2 ppm d'AIA dans le milieur MS basal additionné de 0,02 ppm de kinétine. Dans une autre étude (Anonyme, 1988-89a), il a été observé qu'une quantité élevée d'ANA dans le milieu MS additionné d'ABP (AB) induisait une prolifération du cal mais inhibait complètement l'induction des bourgeons de tiges. Oka et Ohyama (1973) ont mis au point une technique de culture permettant d'induire du cal à partir de segments de tiges de jeunes pousses de mûrier (var. Ichinose), utilisant le milieu MS contenant 2,4-D à 10^{-5} M comme milieu de base. Pour ce qui concerne l'effet des auxines, 2,4-D donne de meilleurs résultats pour la formation de cal que l'AIA et l'ANA mais contrarie fortement l'organogenèse (Murashige, 1974). Au cours des sous-cultures, les auxines n'ont aucun effet sur la prolifération du cal en l'absence de kinétine. Oka et Ohyama (1976) ont observé que, au cours du premier passage en sous-culture, le cal se développe sur un milieu additionné d'ANA et d'AB mais pas sur un milieu contenant de l'ANA seulement. Pour ce qui concerne le type d'auxine, l'ANA est plus approprié à la sous-culture que l'AIA ou le 2,4-D et les concentrations les plus efficaces d'ANA et d'AB sont respectivement de 10^{-5} M et 10^{-6} M.

Il est évident que la formation *in vitro* de racines ne se produit que grâce à l'effet synergique des auxines et des cytokinines. Cependant, les auxines présentent des différences significatives en matière de stabilité, d'efficacité et pour ce qui concerne leur influence sur l'organogenèse. Ghugale et coll. (1971) ont réalisé un test avec plusieurs auxines et ont observé que l'AIA, l'AIB, l'AIP, l'α-ANA et le β-ANA favorisent la formation de racines, tandis que le 2,4-D et 2,4,5-TCP sont inefficaces. Seki et coll. (1971) ont observé que 0,2 ppm d'AIA ou d'ANA constitue la concentration la plus efficace pour la formation de racines dans le milieu MS additionné de 0,1 ppm de kinétine. De plus, on a démontré que la différenciation des cellules et des groupes cellulaires et l'organogenèse doivent être contrôlées par ajustement des conditions du milieu. Par exemple, Ohyama et Oka (1976) ont utilisé du MS + ANA (1 mg/l) pour la formation de racines après développement des pousses dans un milieu MS additionné d'AB seul. Ivanicka (1978) a utilisé un milieu MS + 0,2 mgl^{-1} ANA + 0,2 mgl^{-1} AIB pour la formation de racines à partir de la pousse préalablement développée *in vitro*. De plus, on a suggéré qu'une concentration élevée d'auxine dans le milieu annule l'efficacité de la cytokinine. Par exemple, dans les travaux de Kim et coll. (1985), on a induit la formation de pousses adventives à partir d'explants de cotylédons, de feuilles, d'hypocotyles et d'extrémités de tiges de mûriers (*M. alba* L.) issus d'embryons cultivés avec de l'AB dans des milieux contenant une forte concentration d'AB avec ou sans ANA à faible concentration. Les pousses adventives se sont formées aux extrémités basales coupées des cotylédons et des feuilles. L'analyse histopathologique des explants fait apparaître un cambium enroulé à la base des primordiums des bourgeons. Outre les bourgeons adventifs, les explants d'extrémités de tiges produisent également des bourgeons axillaires. Dans ce cas, les quantités supérieures d'ANA dans le milieu annulent complètement l'efficacité de l'AB.

Prenant en compte le rôle des auxines sur le développement *in vitro* des pousses à partir des bourgeons axillaires, Oka et Ohyama (1975) et Oka (1985) ont suggéré qu'il fallait ajouter et l'auxine et la cytokinine au milieu de base pour obtenir un bourgeonnement bien que la cytokinine soit efficace plus longtemps que l'auxine. Au cours d'une expérience, Oka (1985) a observé que, lorsqu'un bourgeon axillaire comportant une tige de 10 à 15 mm de long était placé dans un milieu MS additionné d'ANA, le bourgeon donnait une pousse, mais que, lorsque la longueur de la tige est réduite à 3 ou 5 mm, l'AB et l'ANA étaient tous deux nécessaires à la croissance du bourgeon. Le développement des pousses à partir de bourgeons axillaires s'accompagne toujours d'un racinement à la base de la tige. L'auteur a donc conclu que le bourgeon axillaire répondait à l'ANA plutôt qu'à l'AB en raison du racinement à la base de la racine et à l'application ultérieure de cytokinine par le système radiculaire. Cependant, il faut souligner que l'auxine n'a aucun effet sur le bourgeonnement d'hiver bien qu'elle induise un cal à la base du bourgeon (Oka e Ohyama, 1974).

2) Sur la culture des embryons et des endospermes :

L'effet des auxines sur la culture des embryons de graines de mûrier est influencé par la photopériode. Par exemple, Seki et coll. (1974) ont observé que, lorsque 2,00 ppm d'auxine (soit

2,4-D ou AIA ou ANA) étaient ajoutés au milieu, le taux de croissance du cal induit à partir de l'embryon était maximal avec 2,4-D, puis AIA et ANA à la lumière (550, 1500 lux) et avec AIA puis ANA et 2,4-D dans l'obscurité. De plus, le taux de croissance diminue considérablement lorsque l'on ajoute 1,0 ppm 2,4-D et 1,0 % d'hydrolysat de caséine sous une lumière constante. Par ailleurs, lorsque l'on ajoute 2,0 ppm d'auxine (2,4-D, AIA ou ANA) au milieu, le taux de croissance induit à partir de l'endosperme est pratiquement identique à la lumière et dans l'obscurité et reste très faible.

3) Sur la culture des anthères :

Il faut rappeler que le mûrier est représenté par un seul sexe chez la plupart des cultivars, il n'est donc pas possible de faire une culture consanguine pour obtenir une lignée homozygote, sauf pour quelques variétés monoïques. Des chercheurs se sont récemment intéressés à la régénération de l'haploïdie par culture des anthères. On a pu démontré que, suivant les conditions de culture, l'anthère au stade mononucléaire peut se différencier en cal. Les anthères au stade mononucléaire cultivées sur des milieux MS et Nitsch additionnés d'auxines (ANA, 2,4-D) et de cytokinines (ABP, kinétine) réagissent de deux façons : soit en produisant des cals qui émergent des loges d'anthères ou en formant une structure à 4 cellules à partir de la microspore mononucléée (Anonyme, 1989-90). Pour ce qui concerne le rôle des auxines sur la formation de cal à partir des loges d'anthères, on a observé que le 2,4-D produisait un cal friable et que l'ANA et l'AIA produisaient séparément des cals compacts, mais que le 2,4-D réagissait mieux en présence de cytokinine (Anonyme, 1988-89a). Katagiri (1989) a observé que l'AIB permettait d'induire du cal dans les cultures de pollen de mûrier. Dans son expérience, la culture pour la division des pollens a été faite à l'aide du milieu B_5 dilué à 50 % avec 1 ppm d'AB et d'AIB, 20 mM myoinositol, 5 mM glutamine, 2 % sucrose et 0,4 M mannitol, pH 5,6, après un traitement de jeûne forcé.

4) Sur la culture des protoplastes :

Dans le cas de la culture de protoplastes, l'addition d'auxine dans la solution enzymatique augmente le rendement en protoplastes. Ohnishi et Kiyama (1987) ont ajouté du 2,4-D et de l'AB (cytokinine) à la solution enzymatique pour augmenter le nombre de protoplastes à partir de feuilles et de cals de mûriers. Ils ont observé que les concentrations les plus appropriées de 2,4-D et d'AB à l'isolement de protoplastes à partir de feuilles de mûriers étaient respectivement de 0,02 et 0,2 ppm. Lorsque l'on utilise du cal de mûrier, le rendement en protoplastes augmente après addition de 2,4-D à la concentration de 2,0 ppm.

B. EFFETS DE L'ACIDE GIBBERELLIQUE (GA)

Sur la germination des graines :

Le traitement à l'acide gibberellique (GA), dans des fourchettes de concentrations très larges, donne une accélération de la germination des graines de mûriers. Rao et coll. (1963) ont observé que la concentration la plus efficace de GA_3 sur la germination des graines était de 50 ppm mais, dans des études plus récentes (Anonyme, 1987-88, 1988-89b), on a observé que le GA_3 à 100 ppm était le plus efficace avec un taux de germination très élevé dans la période minimale de 5 jours. Le rôle positif du GA dans la germination des graines est en outre confirmé par les travaux sur le phytochrome qui ont démontré que la germination des graines de mûriers était accélérée par une exposition de courte durée aux rayons rouges (Saito et Morahashi, 1981 ; Anonyme, 1988-89b). La lumière rouge entraîne une augmentation de la synthèse de GA et une diminution de l'auxine endogène.

Sur le racinement :

Bien que le GA joue un rôle majeur dans la germination des graines, il n'a aucun effet positif sur l'induction des racines de boutures ni même sur la différenciation des racines du cal (Ghugale et coll., 1971). De plus, le GA a un effet inhibiteur sur la croissance des racines (Cazmolwiski, 1966). Ahmed et Mathew (1978) ont découvert que l'effet positif de l'AIA dans l'induction du racinement de boutures de mûriers est ralenti par le GA_3. Cependant, dans ce contexte, les travaux de Bindroo et coll. (1983) ont permis d'apporter la preuve que le GA_3 augmentait le pourcentage de survie des boutures de mûriers. Ils ont observé que les boutures de bois semi-tendre comportant deux feuilles

supérieures intactes donnaient le pourcentage de survie maximal avec 5 ppm de GA_3, pourcentage encore plus élevé que celui obtenu chez les boutures traitées à l'AIA et à l'AIB.

Sur la croissance des pousses :

Pour ce qui concerne l'effet du GA sur la croissance des pousses de mûrier, plusieurs chercheurs (Takizawa et Kano, 1958, 1960 ; Pylnov, 1961 ; Abdullaev et Aliev, 1965 ; Czarnolowiski, 1966 ; Ahmed et Mathew, 1977) ont suggéré que le GA avait un effet stimulateur sur la croissance de la tige, du pétiole et du limbe. Pylnov (1961) a observé une multiplication par 2 ou 3 du rendement en feuilles après traitement au GA (solution à 2:1000). Abdullaev et Aliev (1965) ont démontré qu'une solution aqueuse faiblement concentrée de GA (25 mg/l) avait un effet favorable sur la croissance et le développement des pousses et des feuilles de mûriers. Cependant, l'effet stimulateur du GA sur l'augmentation du rendement en feuilles et de la surface foliaire est réfuté dans un grand nombre de travaux. Les comptes rendus de trois années de recherches au CSRTI de Berhampore (Bengale occidental) (Anonyme, 1972-73 ; 1973-74 ; 1974-75) indiquent que le GA n'a aucun effet notoire sur l'augmentation du rendement en feuilles chez le mûrier. Suzuki et Kitano (1989a) ont observé que le GA_3 stimulait l'allongement de la pousse mais diminuait la surface foliaire. De plus, les travaux réalisés avec le CCC (cycocel), qui inhibe la biosynthèse de GA au-delà de la formation de kaurène, indiquent que la vaporisation des feuilles avec du cycocel entraîne une augmentation du rendement en feuilles (Anonyme, 1979-80) mais provoque une diminution de la hauteur du plant et de la distance internodale (Okabe, 1984).

Bien qu'il y ait des désaccords concernant l'effet stimulateur du GA sur la croissance de la feuille de mûrier, il a été démontré que le GA constituait l'un des facteurs favorables à l'émergence des feuilles et à la croissance des pousses et que l'action du GA était influencée par le contenu en humidité et la température du sol. Dans une série d'expériences, Ohnishi (1986a, 1986b) a observé que l'effet du traitement au GA était plus prononcé lorsque le sol était soumis à un stress de manque d'eau et à une basse température que dans des conditions de contenus en eau adéquats et de température élevée du sol. Il a également observé que le contenu en eau des feuilles augmente après traitement au GA et, en particulier, que le contenu en eau des feuilles après le traitement au GA, lorsque le sol est soumis à un stress de manque d'eau, est comparable à celui des feuilles cultivées dans des conditions normales, ce qui suggère que le GA constitue l'un des facteurs favorables à l'émergence des feuilles et de la croissance des racines. On a également suggéré que l'effet du traitement au GA est plus prononcé dans des conditions suboptimales pour la croissance et que le GA semblait compenser ce type de conditions défavorables. Le GA modifie les composants inorganiques des feuilles de mûriers et on a observé une relation assez nette entre le traitement au GA et le contenu en potassium des feuilles. Dans une série d'expériences, Ohnishi et Aoki (1966a, 1966b) ont observé que le contenu en K_2O des feuilles traitées au GA était plus élevé que celui des feuilles non traitées, tandis que le traitement au GA se traduisait par une diminution des contenus des feuilles en CaO et en MgO. Ils ont également observé que, même dans le cas d'une augmentation substantielle de l'application de potassium, le contenu en K_2O des feuilles traitées au GA était plus élevé que celui des feuilles non traitées, tandis la diminution des contenus en CaO et en MgO était inférieure dans le cas du traitement au GA. De plus, l'estimation des ratios (K + Ca)/mg et de MgO/K_2O permet de dire que les feuilles sont susceptibles d'entrer dans un état de déficience en Mg dû au traitement GA.

Sur l'expression/l'inversion des sexes :

Comme tous les processus morphogénétiques, le développement des fleurs des deux sexes, soit sur les mêmes individus, soit sur des individus différents, est influencé par les hormones (Frankel et Galun, 1977). On a suggéré qu'un équilibre endogène relatif entre l'éthylène et les GA (Mohan Ram et Jaiswal, 1974) ainsi que l'implication interactive du GA et des cytokinines (Chailakhyan et Khyranin, 1979) contrôlaient l'expression sexuelle chez de nombreux végétaux. Chez le mûrier, la production de fleurs mâles sur des plants femelles par application exogène de GA suggère fortement que les GA endogènes ont un rôle possible dans l'expression du sexe mâle. Jaiswal et Kumar (1980) ont observé que le traitement au GA_3 des plants femelles de *M. nigra* à 100 et 300 ppm permettait d'obtenir des inflorescences présentant des fleurs intersexuées et mâles et divers degrés de transformation de fleurs femelles en fleurs mâles. Ogure et coll. (1980) ont démontré que, après

application de solutions de 250 à 800 ppm de GA_3, respectivement en juin et juillet, "Ostiemasa", un cultivar monoïque, ne produisait que des grappes de fleurs mâles. Cependant, il faut noter que l'effet du GA exogène pour ce qui concerne la modification du sexe n'est pas probant. Par exemple, Jaiswal et Kumar (1980) ont observé que les pollens formés sur les fleurs mâles induites sont plus petits en taille que les pollens normaux et ne germent pas. Ogure et coll. (1980) ont observé que, avec l'application de GA_3, "Kenmochi", cultivar femelle, donnait un nombre considérable de grappes de fleurs anormales, parmi lesquels certaines petites fleurs du sommet ne se développaient pas et ne produisaient pas de fruits. Dans une étude du CSRTI de Mysore (Karnataka) (Anonyme, 1985-86), cinq clones femelles, 130, 145, 146, 156 et 162, ont été vaporisés avec du GA_3 (1 000 ppm) pour modifier le sexe ; le GA_3 a permis de produire des fleurs mâles rudimentaires chez seulement deux clones : 130 et 156.

Par ailleurs, on a démontré que la diminution du GA endogène par vaporisation de cycocel, un inhibiteur de la biosynthèse de GA, permettait d'induire des femelles chez une variété mâle. D'après les résultats obtenus (Anonyme, 1976-77), il semble que le cycocel à une concentration de 500 ppm est tout à fait efficace pour l'induction de femelles chez "Kosen", une variété de mûriers mâles. Cependant, l'effet du cycocel dans l'induction de femelles chez les cultivars mâles est également fonction des variétés de mûriers, le cycocel étant efficace sur RFS 135 mais n'exerçant aucun effet sensible sur le clone 119 au CSRTI de Mysore (Anonyme, 1986-87).

Sur la culture des tissus :

L'addition de GA au milieu de culture permet de résoudre le problème de la pseudodormance du cal de mûrier réfrigéré. Yasukura et Ohnishi (1990) ont observé une pseudodormance du cal de mûrier après 3 semaines de réfrigération, pseudodormance tout à fait visible après 8 semaines. Cette pseudodormance n'apparaît pas lorsque l'on additionne du GA à une concentration optimale de 3 ppm au milieu de culture. En outre, le GA_3 dans un milieu MS additionné de ANA ou d'AB permet d'augmenter la production de feuilles et la distance internodale des pousses (Ohyama et Oka, 1976).

Interaction du GA avec d'autres hormones :

Il est évident que le GA neutralise parfois les effets de l'AAB chez le mûrier. Par exemple, Ohyama et Oka (1975) ont observé que l'inhibition de la croissance des bourgeons traités à l'AAB est partiellement neutralisée par une quantité égale (10 ppm) de GA_3 et ils ont émis l'hypothèse que l'AAB pourrait spécifiquement contrebalancer la gibberelline chez le bourgeon. Suzuki et Kitano (1989b) ont observé que l'effet inhibiteur de l'AAB sur l'éclosion des bourgeons et la croissance des pousses des segments de tige post-dormants peut être inversé par l'application de GA_3. Cependant, les conditions décrites plus haut ne sont évidemment pas réunies dans tous les cas, par exemple l'effet inhibiteur de l'AAB sur les bourgeons d'hiver isolés de mûriers n'est pas neutralisé par l'addition de GA_3 (Oka, 1985). La raison en est probablement que, chez les bourgeons d'hiver, l'activité du GA est inhibée du fait de la présence d'un promoteur de la résistance au froid, le promoteur de la résistance au froid étant une substance qui retarde la croissance, comme l'AAB inhibe l'activité du GA (Irving et Lampen, 1968 ; Irving, 1969) ; chez le mûrier, plusieurs substances inhibitrices de la croissance ont été observées au moment de la dormance des bourgeons d'hiver (Yahiro et Hayashi, 1971b).

Il est intéressant de noter que l'effet synergique du GA et de l'éthylène provoque une inhibition de la croissance apicale au cours de la période de croissance active et une accélération du développement des bourgeons latéraux. Ceci a été mis en évidence par les travaux de Iwata et Nakagawa (1972a, 1972b), dans lesquels de l'éthrel (un composant libérant l'éthylène), vaporisé pour accélérer la défoliation de la partie inférieure des ramifications au cours de la période de croissance active, a inhibé la croissance apicale et le GA, vaporisé ensuite sur la partie apicale, a permis de diminuer l'effet inhibiteur de l'éthrel. L'effet de l'éthrel et du GA combinés entraîne une accélération du développment des bourgeons latéraux dont la croissance est maximale après traitement aux concentrations de 3 000 ppm d'éthrel et de 100 ppm de GA.

De plus, Ahmed et Mathew (1990) ont démontré que l'effet synergique du GA et de l'auxine (AIA) induisait un pourcentage élevé de lenticelles chez les boutures dépourvues de bourgeons végétatifs.

C. EFFETS DE LA CYTOKININE

Sur la croissance des racines :

La cytokinine, en particulier la kinétine, stimule la croissance des racines des plants de mûriers et on a suggéré que ce mécanisme était dû principalement à l'hétérotrophie de la cellule. Lee (1984) a observé que l'effet de la vaporisation des feuilles avec de la kinétine sur la croissance des feuilles est tout à fait remarquable lorsque le sol des plants traités est enrichi avec de l'azote (N) ou de l'azote, du phosphate et de la potasse (NPK).

Sur la croissance des pousses :

Bien que très peu de travaux aient été réalisés sur l'effet de la cytokinine exogène sur la croissance des pousses de mûrier en milieu naturel, on a montré que la vaporisation des feuilles avec de la kinétine favorisait la croissance des arbres et que le niveau adapté de kinétine pour une croissance optimale était de 100 ppm (Lee, 1984). De plus, une quantité considérable d'études sur les contenus en cytokinine endogène a mis en évidence des relations entre la croissance des bourgeons axillaires et les contenus en cytokinine des bourgeons axillaires, des feuilles et des branches restant après la taille, ce qui indique que les cytokinines (zéatine et riboside zéatine) pourraient affecter la croissance des bourgeons axillaires. La preuve du rôle possible des cytokinines endogènes a été apportée par les études de Yanagisawa et coll. (1985, 1988) et de Yanagisawa et Shiioiri (1987) qui ont observé que la teneur en cytokinine des bourgeons axillaires augmentait au moment du bourgeonnement et qu'elle était plus élevée chez les bourgeons des branches allongées que chez les bourgeons des chicots d'arbres formés après la taille. Les contenus en zéatine des branches laissées après la taille présentent une tendance à l'augmentation avec la régénération des bourgeons axillaires. Cependant, les contenus en zéatine des bourgeons axillaires des branches restantes sont faibles 3 jours après la taille ; alors que les contenus en riboside zéatine dans les bourgeons axillaires des branches restantes diminue après régénération des bourgeons axillaires et que le degré de diminution est maximal 7 jours après la taille ; 14 jours après la taille, les contenus présentent une tendance inverse. Les contenus en riboside zéatine dans les bourgeons axillaires des branches restantes augmentent après régénération des bourgeons axillaires et l'augmentation est maximale 10 jours après la taille. Le contenu en zéatine des feuilles restantes présente une tendance à la diminution après reprise de la fonction physiologique des feuilles, tandis que les contenus en zéatine riboside des feuilles augmente avec la croissance des feuilles à partir du moment de la régénération des bourgeons axillaires aux stades "Dappo" et "Enko". Les modifications des contenus en riboside zéatine présentent une tendance inverse à ceux de la zéatine.

Sur la dormance :

La cytokinine favorise le bourgeonnement des bourgeons dormants mais n'a pas d'effet notoire sur l'accélération du bourgeonnement pendant la période de quiescence et sur la levée de la dormance apicale. Yahiro (1980) a observé que le bourgeonnement des bourgeons dormants est favorisé par le traitement à la benzyladénine (BA) à 50 ppm et 100 ppm. Cependant, le traitement à 10 ppm de BA n'a pas d'effet sur les bourgeons dormants. Le traitement à la kinétine à 50 ppm accélère légèrement le bourgeonnement des bourgeons dormants par rapport au témoin. La BA est généralement beaucoup plus efficace que la kinétine pour lever la dormance mais ni la BA ni la kinétine n'accélèrent le bourgeonnement des bourgeons dormants au stade quiescence.

Sur la floraison et la fructification :

La vaporisation de kinétine au moment de la floraison maximale améliore la capacité de croisement des diploïdes avec les tétraploïdes. Le traitement augmente le rendement en fruits et les concentrations efficaces de kinétine pour les plants de mûrier diploïdes et tétraploïdes sont respectivement de 0,003 % et 0,005 % (Aliev, 1980).

Sur la culture des tissus :

L'importance de la kinétine dans la culture des tissus a été partiellement discutée plus haut. On a observé que les composants organiques les plus importants dans un milieu de culture tissulaire

étaient la cytokinine et l'auxine et que l'interaction entre les deux substances hormonales régulait l'initiation des racines et des pousses. Cependant, ces éléments d'information ne sont pas suffisants pour déterminer l'efficacité de la cytokinine sur les divers aspects de la culture des tissus de mûriers. Dans ce chapitre, on a pris en compte les résultats des travaux concernant principalement le rôle spécifique des cytokinines.

D'après les informations disponibles, il semble que, au cours de la culture des tissus, en l'absence de cytokinine, la sous-culture soit impossible. Par exemple, Oka et Ohyama (1976) ont observé que, au moment des sous-cultures successives, le cal conservé dans le milieu MS se nécrosait et mourait. Cependant, la cytokinine est surtout responsable de l'initiation des pousses sur les cals et de la croissance des pousses. Les résultats présentés par Ohyama et Oka (1976) indiquent que l'addition de BA au milieu MS entraîne une formation de pousses mais n'induit jamais de formation de racines. Nino (1990) a observé que les extrémités de pousses de mûriers cultivées *in vitro* et réfrigérées dans de l'azote liquide peuvent reprendre leur croissance après avoir été transférées dans un milieu MS modifié (NH_4NO_3, 825 mg/l), comme on l'a détecté avec la croissance apicale organisée des extrémités de pousses cryoconservées lorsque le milieu est additionné de BA (1,0 mg/l).

Pour ce qui concerne le genre de cytokinine, la BA (parfois appelée BAP, soit 6-benzylaminopurine au lieu de 6-benzyladénine) est la plus efficace pour le développement *in vitro* des pousses. Dans les résultats les plus indiscutables, Oka (1985) a observé que le développement *in vitro* des pousses hivernales, des bourgeons terminaux et des bourgeons axillaires verdâtres isolés est optimal lorsque la BA est incorporée dans le milieu MS à une concentration de 1 mg/l. La zéatine permet également le développement des pousses mais son efficacité est plus faible que celle de la BA. Cependant, la kinétine ne permet pas le développement des pousses issues de bourgeons bien que l'efficacité de la kinétine pour la multiplication des cals de tiges de mûriers soit bien établie (Seki et coll., 1971). Une concentration plus forte de BA (10 ppm) est efficace pour l'induction de gros bourgeons adventifs chez les feuilles isolées à partir de bourgeons hivernaux de mûriers. Cependant, la N^6-2-isopénényladénine (2-iP) ne permet pas l'induction de bourgeons adventifs bien qu'elle maintienne les feuilles fraîches sur une longue période (Saito et Katagiri, 1989).

On a également démontré que la BA permettait la formation de pousses à partir de cultures de bourgeons hivernaux dans le milieu SDS. Par exemple, dans une étude de Oka et Ohyama (1978), les bourgeons hivernaux ont été conservés au froid (2,5 °C). Après stérilisation de leur surface et élimination des écailles, les bourgeons ont été cultivés dans un milieu SDS contenant de la BA à une concentration de 1 mg/l. Les cultures ont été conservées pendant 4 à 6 semaines à 28 °C sous une photopériode quotidienne de 12 hr. La formation de pousses a été obtenue dans une fourchette de pH faible de 4 à 5.

Katagiri (1989) a observé que la BA permettait d'induire le cal dans une culture de pollens de mûriers. Il a utilisé les milieux MS et B_5. Cependant, les résultats obtenus indiquent qu'un milieu B_5 dilué à 50 % contenant 1 ppm de BA, 1 ppm d'AIB, 20 M myoinositol, 5 mM glutamine, 2 % sucrose et 0,4 M mannitol est tout à fait efficace pour l'induction de cal à pH 5,6 après jeûne forcé.

D. EFFETS DE L'ETHYLENE

Sur le racinement :

Il est bien établi que l'éthylène stimule la formation de racines adventives mais inhibe la croissance des racines. Cependant, les informations concernant les effets, chez le mûrier, de l'éthylène sur la croissance des racines et la formation de racines adventives ne sont pas suffisantes, bien qu'il ait été démontré, dans une étude de Suzuki (1987), que l'application du composant libérant de l'éthylène, qui se décompose spontanément dans une solution aqueuse pour libérer l'éthylène, induit le racinement des boutures de mûrier. Dans cette étude, il a observé que l'éthéphon à des concentrations optimales (0,1 ; 1 ppm) favorisait le racinement des primodiums obtenus à partir de boutures de bois dur de *Morus alba* cv. Minamisakari.

Sur la croissance des pousses :

L'éthylène inhibe la croissance apicale des mûriers mais stimule l'initiation de l'allongement des nouvelles pousses. Iwata et Nakagawa (1972a, 1972b) ont observé que la vaporisation des feuilles

avec de l'éthrel inhibait la croissance apicale au cours de la période de croissance active et qu'une concentration élevée d'éthrel vaporisée sur la partie supérieure de l'arbre entraînait un flétrissement de la partie apicale. Les résultats présentés par Suzuki (1987) démontrent que l'éthylène à faible concentration stimule l'allongement de nouvelles pousses. Cependant, des applications basales continues d'éthéphon dans une solution aqueuse diminuent légèrement l'allongement des pousses des segments de tiges post-dormants (Suzuki et Kitano, 1989a).

Sur l'abscission :

Des informations provenant de diverses sources (Iwata et Nakagawa, 1972a ; Suzuki, 1987 ; Suzuki et Kitano, 1989a) indiquent que l'éthylène stimule fortement la défoliation de la partie inférieure des branches de mûriers. Dans ces expériences, l'éthrel a été vaporisé sur les feuilles pour accélérer la défoliation et, pour cela, la concentration optimale est de 10 ppm. Cependant, vaporisé en forte concentration, l'éthrel entraîne une défoliation complète du mûrier (Iwata et Nakagawa, 1962b). Il est néanmoins évident que la sénescence et l'abscission des feuilles de mûrier sont régulées par un système de contrôle éthylène auxine. Suzuki (1986a), dans son expérience la plus concluante, a observé que l'application de 1 000 ppm d'éthrel sur des pétioles défoliés de mûriers (*Morus alba* L. cv. Shinichinose) trois jours après la défoliation stimulait l'abscission des feuilles de manière plus significative que lorsque l'application était concomitante de la défoliation. L'abscission des pétioles défoliés de mûriers diminue lorsqu'une partie du pétiole (1 cm de long) est laissée et que les surfaces coupées sont traitées avec une pâte à la lanoline contenant 500 ppm d'auxine (AIA). L'incubation des extrémités de pousses détachées dans l'éthrel à 500 ppm accélère la défoliation et l'abscission des pétioles défoliés par rapport à l'incubation dans l'acide abscisique (AAB) à 500 ppm.

Sur l'épinastie du pétiole foliaire :

L'éthylène semble néanmoins jouer un rôle dans l'épinastie du pétiole foliaire. Ceci a été révélé dans une expérience montrant que l'application d'éthrel sur la feuille et sur le pétiole provoquait l'épinastie (Suzuki, 1986). Dans ce cas d'épinastie, on a observé que la quantité minimale d'éthrel nécessaire se situait entre 1 ppm, lorsqu'elle était appliquée sur la feuille, et 10 ppm, lorsqu'elle était appliquée sur le pétiole. La courbure du pétiole est maximale 2 jours après l'application d'éthrel, les pétioles reprennent un aspect proche de la normale lorsque la feuille est traitée avec 1 à 10 ppm d'éthrel ou lorsque le pétiole est traité avec 10 à 100 ppm d'éthrel. L'application d'éthrel à 500 ppm à la partie supérieure des pétioles entraîne une courbure beaucoup plus accentuée que l'application à la partie interne. Parmi les portions inférieure, moyenne et supérieure du pétiole, la partie inférieure (basale) est la plus sensible au traitement à 500 ppm d'éthrel. De plus, la réaction des pétioles à l'éthrel dépend de leur stade de développement, la courbure dans ce cas, est dans l'ordre suivant : feuille moyenne > feuille supérieure > feuille inférieure.

Sur l'expression/l'inversion des sexes :

Un certain nombre d'études (Ogure, 1976 et les références données plus bas) indiquent que l'application exogène d'éthylène sour la forme d'éthrel permet d'induire des femelles chez le mûrier. Ogure et coll. (1980a, 1980b) ont suggéré que l'application d'une solution d'éthrel à 400 ppm en août, plus précisément entre la fin juillet et la fin août, était la plus efficace pour la féminisation de cultivars de mûriers à prédominance mâle. Dans leurs expériences, ils ont observé un grand nombre de trochets de fleurs femelles dans la partie de la pousse développée après août lorsque la croissance de la pousse commence à ralentir. Jaiswal et Kumar (1980b) ont observé que le traitement des plants mâles de *M. nigra* L. à l'éthéphen (éthrel) dans des fourchettes de concentrations de 960 à 3 840 ppm induisait le production de fleurs femelles et de fleurs intersexuées présentant divers degrés de transformation en femelle et, plus tard, des fruits chez les inflorescences comportant des fleurs intersexuées et/ou femelles. De plus, on a suggéré que l'éthylène se libérait à l'intérieur des pousses sur lesquelles l'éthrel est appliqué, qu'il se déplacait vers les pousses non traitées du même lot et pouvait induire des fleurs femelles (Ogure et coll., 1981). Cependant, l'effet de l'éthrel sur l'expression sexuelle chez le mûrier varie en fonction des cultivars. Par exemple, Ogure et coll. (1980a) a observé que le taux d'expression sexuelle était maximal chez "KNG" suivi des types mâles de "Shiromekeiso", "Shinichinose", "Atsubamidori" et "Akameroze", mais aucune modification n'a été relevée chez "Tsukasaro". En

outre, dans une autre étude du CSRTI de Mysore (Anonyme, 1985-86), trois clones mâles (119, 144 et 214) ont été vaporisés avec de l'éthrel (9 600 ppm) afin de modifier le sexe et les résultats obtenus ont révélé que l'éthrel supprimait l'incidence des fleurs mâles chez deux clones uniquement (214 et 119).

E. EFFETS DE L'ACIDE ABSCISIQUE (AAB)

Sur la germination des graines :

L'équilibre hormonal entre l'AAB et le GA dans les graines joue un rôle régulateur dans la germination et cet équilibre peut être modifié soit en diminuant l'inhibiteur (AAB) ou en augmentant le promoteur (GA). Ohyama et Oka (1978) ont démontré que la germination des graines de mûriers était inhibée par l'application exogène d'AAB. Au cours de leurs expériences, ils ont observé un léger retardement de la germination lorsque les graines étaient traitées avec 0,1 ppm d'AAB et une inhibition complète de la germination lorsqu'elles étaient traitées avec une concentration de 2,0 ppm. Le pourcentage de germination est élevé (99 %) lorsque les graines sans enveloppe sont traitées avec une solution d'AAB à 2,0 ppm pendant 60 heures, puis par des buvardages successifs et mouillés après 8 jours. Cependant, le résultat présentant un pourcentage élevé de germination des graines sans enveloppe traitées à l'AAB n'est pas une exception, étant donné que, dans ce type de graines, la résistance mécanique de l'enveloppe de graines et l'AAB endogène, qui est produit dans l'enveloppe des graines, sont éliminés, ce qui modifie l'équilibre des hormones endogènes par diminution de l'inhibiteur (AAB). De plus, l'effet de l'AAB dans l'inhibition de la germination des graines est relativement temporaire et la germination recommence peu après le rinçage de la solution inhibitrice (Sumner et Lyon, 1967).

Sur le racinement :

On a observé que l'AAB a un effet inhibiteur sur la croissance et le développement des racines. Cependant, un résultat présenté par Suzuki (1987) indique que l'AAB dans des concentrations optimales (0,1 ; 1 ppm) favorise le racinement des primordiums obtenus sur des boutures de tiges de bois dur de *M. alba* L. cv. Minamisakari.

Sur la dormance et l'éclosion des bourgeons :

La plupart, sinon toutes les plantes pérennes forment des bourgeons dormants à un stade ou l'autre du cycle annuel de croissance qui semble être contrôlé par la longueur du jour, les conditions extérieures défavorables et les hormones endogènes. Le contrôle hormonal de la dormance des bourgeons a été étudié de manière extensive par Yahiro et Hayashi (1971a, 1971b) et Yahiro et Tashiro (1989) et leurs résultats indiquent que l'AAB et une autre substance inhibitrice chimique non déterminée servent d'inhibiteurs pendant la période de quiescence des bourgeons d'hiver. Au cours de leurs études, ils ont observé que, chez les bourgeons de mûrier hivernaux, pendant la dormance, le contenu en inhibiteurs était élevé au moment de la dormance profonde mais diminuait à la fin de la période de repos. Leurs résultats suggèrent également que l'AAB endogène, au moins partiellement, est impliqué dans la régulation de la dormance des bourgeons hivernaux, hypothèse qui a été étayée par des travaux en culture tissulaire. Par exemple, Oka (1985) a observé que l'AAB inhibait complètement la croissance des bourgeons hivernaux isolés *in vitro* à 10 mg/l et partiellement à 1 mg/l. De plus, un nombre considérable de résultats suggère que l'AAB inhibe à la fois la levée de la dormance des bourgeons post-dormants et non dormants. Suzuki et Kitano (1989a, 1989b) ont observé que l'application basale continue d'AAB en solution aqueuse inhibait l'éclosion des bourgeons post-dormants issus de segments de tiges. Ohyama et Oka (1975) ont démontré que lorsque des segments de tiges de 5 cm de long sont plongés dans une solution d'AAB à 100 ppm pendant 24 heures, l'éclosion des bourgeons est retardée considérablement bien que des concentrations plus faibles d'AAB de 0,1 à 1 ppm n'aient aucun effet sur le moment d'éclosion des bourgeons. Suzuki (1987) a observé que l'AAB à 50 ppm inhibait complètement l'éclosion des bourgeons de boutures de tiges de *M. alba* L. cv. Minamisakari.

Sur l'allongement des pousses et la défoliation :

D'après les informations disponibles, il semble que l'AAB inhibe l'allongement de la pousse et la défoliation des plants de mûriers. D'après les travaux de Suzuki (1987), une solution d'AAB à 10 ppm diminue fortement l'allongement des nouvelles pousses et la défoliation. Suzuki et Kitano (1989a) ont observé qu'une application basale continue d'AAB inhibait sensiblement la croissance des pousses des coupes de tiges post-dormantes ainsi que la défoliation des nouvelles pousses.

Sur la culture des tissus :

L'utilisation de l'acide abscisique (AAB) dans la culture des tissus est limitée car l'AAB arrête le métabolisme du cal (Ohinishi et coll., 1986) et, au-delà d'une certaine quantité, il inhibe le développement des racines adventives et la différenciation des bourgeons adventifs (Oshigue, 1989). Cependant, il a pu être utilisé de manière efficace pour la conservation du cal de mûrier qui est capitale car elle permet de réduire le nombre de remplacements du milieu. La méthode de conservation a été améliorée par l'addition d'AAB et de p-aminobenzoate (APAB) en provoquant l'arrêt du métabolisme du cal par l'AAB et la conservation de la fraîcheur du cal par l'APAB. Lors de la mise au point de cette méthode, Ohnishi et coll. (1986) ont observé que le cal brunissait après 8 semaines seulement de conservation à basse température et 8 semaines également après addition d'AAB seul. En outre, l'addition d'APAB seul favorise la prolifération de la partie blanche du cal compact et l'inhibition de la partie brune après 8 semaines. Cependant, l'addition d'AAB et de APAB entraîne l'arrêt de la prolifération du cal qui peut être conservé pendant 20 semaines sans perdre sa fraîcheur dans l'obscurité à 28 °C. A basse température et sur une longue durée, le cal est vivant mais la croissance est retardée lorque le cal est exposé aux conditions ambiantes.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les résultats présentés dans cette revue suggèrent fortement que pratiquement tous les stades de la croissance et du développement des plants de mûriers, comme la germination des graines, l'induction et la croissance de racines adventives, la dormance, le bourgeonnement et la croissance des bourgeons, l'émergence et la croissance des feuilles, la fructification, l'épinastie des pétioles foliaires et la sénescence et l'abscission des feuilles, sont affectés par les hormones. Il est évident que les études sur les effets des hormones et de leur application offrent de nombreux avantages pour la régulation de la croissance chez les plants de mûriers.

La multiplication des plants de mûriers par l'induction de racines chez les boutures sous l'influence des hormones est l'aspect le plus important et a été étudiée de manière approfondie, plus particulièrement pour ce qui concerne les auxines. Les composés chimiques, y compris les composés commerciaux chimiques, agissant comme des auxines et les auxines naturelles sont tout à fait efficaces pour l'induction de racines sur les boutures de nombreuses variétés de mûriers, difficiles à reproduire de manière végétative. Hormis les auxines, l'éthylène et l'acide abscisique induisent également des racines adventives sur les boutures. Cependant, les informations sur leurs effets sont peu nombreuses et cet aspect devrait être étudié de manière approfondie, surtout pour ce qui concerne l'effet de l'éthylène étant donné que l'effet stimulateur de l'éthylène sur la formation de racines adventives est reconnu.

Le fait que le GA soit l'un des facteurs promoteurs de l'émergence de la feuilles et de la croissance des racines et que l'effet du GA soit plus prononcé lorsque le sol est soumis au stress du manque d'eau et à basse température peut ouvrir de nouvelles perspectives dans la culture du mûrier en régime pluvial dans les régions à faible pluviosité et dans les régions tempérées.

La connaissance du fait que le GA favorise - et que l'AAB inhibe - la germination des graines, que l'ATIB accélère le bourgeonnement latéral, que l'éthrel combiné au GA accélère le développement des bourgeons latéraux et que les cytokinines permettent de lever la dormance et favorisent la croissance des bourgeons axillaires pourrait être appliquée dans la régulation de la germination des graines et de la croissance des plants de mûriers à différents moments.

Les concepts de contrôle de l'expression sexuelle chez le mûrier par des hormones endogènes et de modification du sexe par l'application d'hormones exogènes sont très utiles pour les travaux de

sélection. Malheureusement, la progression des connaissances dans ce domaine est ralentie car l'expression sexuelle n'est pas prometteuse chez un grand nombre de variétés.

Des progrès significatifs ont été accomplis dans la connaissance des effets des hormones dans les cultures tissulaires et on commence à comprendre l'implication interactive de l'auxine et de la cytokinine dans la régulation de l'induction des racines et des pousses dans le cal, la conservation du cal à température normale sur une longue durée à l'aide d'AAB combiné à l'APAB et à résoudre le problème de la pseudodormance du cal conservé à l'aide de GA.

Bien que l'on dispose de beaucoup de renseignements sur les effets des hormones sur les plants de mûriers et dans les cultures tissulaires, notre connaissance des effets hormonaux comporte beaucoup de lacunes : on ne sait presque rien de la biochimie des effets hormonaux. De plus, certains de ces effets sont encore obscurs. Par exemple, le fait que la vaporisation de GA donne de meilleurs résultats que les auxines dans le cas de l'augmentation du pourcentage de survie des boutures qui ont deux feuilles supérieures intactes et que l'AAB favorise la formation des primordiums de boutures de mûriers ne peut pas s'expliquer par le mode d'action connu de ces hormones. Il reste, à l'évidence, encore beaucoup de chemin à parcourir avant de parvenir à comprendre les événements métaboliques qui se produisent chez les plants de mûriers après exposition aux hormones exogènes.

KINETIC PARAMETERS OF LEUCINE TRANSPORT ACROSS THE BRUSH BORDER MEMBRANE OF MIDGUT COLUMNAR CELLS IN DIFFERENT STRAINS OF *BOMBYX MORI* LARVAE

M. TASCA[1], P. IANNE[2], S. CAPPELLOZZA[3], L. CAPPELLOZZA[3], R. ZANCHI[2]*, P. PARENTI[4] & B. GIORDANA[1]**

1. Department of Biology, University of Milan, via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

2. ENEA-Ratti Research Laboratory, via Madonna 30, 22070 Guanzate, Italy.

3. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura, Brusegana, 35100 Padova, Italy.

4. Department of General Physiology and Biochemistry, University of Milan, via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

The absorption of neutral amino acids across the midgut of lepidopteran larvae is a secondary active process due to the presence of K^+/amino acid cotransporters in the brush border membrane of columnar cells, which couple the intracellularly directed K^+ flux along its electrochemical gradient to the amino acid flux. Recently, it has been found that two different kinds of these cotransporters, distinguishable by their kinetic behaviour, are expressed in the anterior-middle and posterior tracts of the midgut of **Bombyx mori** *larvae, two regions with well-defined morphological differentiations.*

The kinetic parameters of the K^+-dependent transport of leucine into brush border membrane vesicles from the two midgut tracts were measured, in different strains of **Bombyx mori** *larvae, in order to show possible variabilities in amino acid absorption capacity. Marked differences were evident as regards the amino acid transport ability of the two midgut portions, since in all the strains tested V_{max} value for leucine in the posterior portion was from five to elevenfold higher than in the anterior-middle tract. Moreover, V_{max} values varied appreciably in the different strains of* **B. mori** *tested.*

In all strains, the two midgut portions responded differently to alkalinization of the extravesicular fluid. The activity of the K^+/leucine cotransporters of the posterior tract, the more specifically midgut region responsible for the absorption of amino acids, was strongly influenced by the extracellular luminal pH, since the affinity of the transport proteins for the amino acid increased from five to tenfold, depending on the strain, in an alkaline environment.

Keywords : Amino acid absorption, *Bombyx mori* larval midgut, midgut anterior-middle and posterior portions, brush border membrane vesicles, *B. mori* strains.

* Permanent address : Department of Food Science and Microbiology, University of Milan, via Celoria, 20133 Milan, Italy.

** To whom correspondence should be addressed.

INTRODUCTION

The knowledge concerning nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*, is essential for the preparation of suitable artificial diets. While the ability of the silkworm midgut to perform digestion of ingested food has been extensively studied through an accurate characterisation of the different classes of digestive enzymes (Kuriyama and Eguchi, 1985 ; Azuma and Yamashita, 1985 ; Azuma and Eguchi, 1989, Chatterjee *et al.*, 1992), less is known about the role of midgut entrocytes in the absorption of the nutrients released.

It is well known that along its length the midgut epithelium of lepidopteran larvae, *B. mori* included, shows two different cell types : the columnar cells and the goblet cells (Akai, 1969 ; Kobayashi, 1971 ; Waku and Sumimoto, 1971), whose fine structure was carefully described in *Manduca sexta* by Cioffi (1979). While goblet cells are involved in ion regulation (Harvey, 1992 ; Moffett and Koch, 1992 ; Wieckzorek, 1992), columnar cells are responsible for the secretion of digestive enzymes (Santos and Terra, 1984 ; Azuma and Eguchi, 1989) and the absorption of nutrients from the gut lumen.

Although the ability of enterocyte luminal membrane to translocate small peptides from the lumen to the cell, as suggested by Horie *et al.* (1982) has not yet been confirmed, it has been clearly established that in the brush border membrane transport proteins are present which are able to bind single amino acids and to transfer them very efficiently from lumen to cell cytoplasm (Giordana *et al.*, 1989). These transport proteins belong to the class of cotransporters, which in addition contain a binding site for a cation, thus coupling the amino acid to the cation flux. At variance with the amino acid cotransporters expressed in Vertebrate epithelial brush border membranes, which are characterized by their strict dependence on Na^+ ions, lepidopteran midgut amino acid cotransporters are able to bind K^+ ions. A general model for the transepithelial absorption of amino acids in the midgut of lepidopteran larvae was proposed in 1982 by Giordana *et al.* The model is reported in Fig. 1, and includes all recent advances in the knowledge of the molecular and functional properties of the goblet cell (Wieczorek *et al.*, 1991 ; Klein, 1992), which cooperates with the columnar cell to provide the driving force for active amino acid absorption (see legend to fig. 1).

The K^+/amino acid cotransporters were identified only when a preparation of purified brush border membrane vesicles (BBMV) was developed, by removing intracellular and basolateral membranes by Ca^{++}-precipitation followed by differential centrifugation (Hanozet *et al.*, 1980). Purified brush border membrane fragments form vesicles spontaneously with the proper right-side out orientation. In these vesicles transport proteins retain the functional properties present in the organ, since in all cases tested the characteristics of amino acid uptake determined in BBMV were confirmed by the experiments performed in the isolated midgut. Moreover, BBMV offer the added opportunity of studying the role of intra- and extracellular factors without the interference of cellular metabolism.

Recent studies with *Bombyx mori* larvae (Parenti *et al.*, 1993) have shown that two different kinds of cotransporters for neutral amino acids, distinguishable by their kinetic behaviour, are expressed in the anterior-middle and posterior tracts of the midgut, two regions macroscopically identifiable which correspond in other lepidoptera to well-defined morphological, enzymatic and functional differentiations (Cioffi, 1979 ; Santos *et al.*, 1984, 1986 ; Chamberlin, 1990 ; Dow, 1992).

The kinetic parameters of the K^+-dependent transport of leucine, an amino acid that is readily transported by the system for neutral amino acids (Parenti *et al.*, 1992), were measured in the anterior-middle and posterior tracts of the larval midgut of different strains of *Bombyx mori* in order to evidence possible variations in amino acid absorption capacity.

MATERIALS AND METHODS

Fifth instar larvae of *Bombyx mori* were fed on mulberry leaves or artificial diets (Yakult Co., Japan, or ENEA-Ratti Research Laboratory, Italy) as indicated in the Tables. Two Japanese and one Italian polyhybrids and three Italian pure races were used. Larvae were in their fifth day of the last instar, when their average weight had reached 3.6 ± 0.1 g.

The silkworms were kept in crushed ice for 15-20 min. and then cut immediately behind the last pair of thoracic legs and the fourth pair of abdominal appendages, to exclude the foregut and the

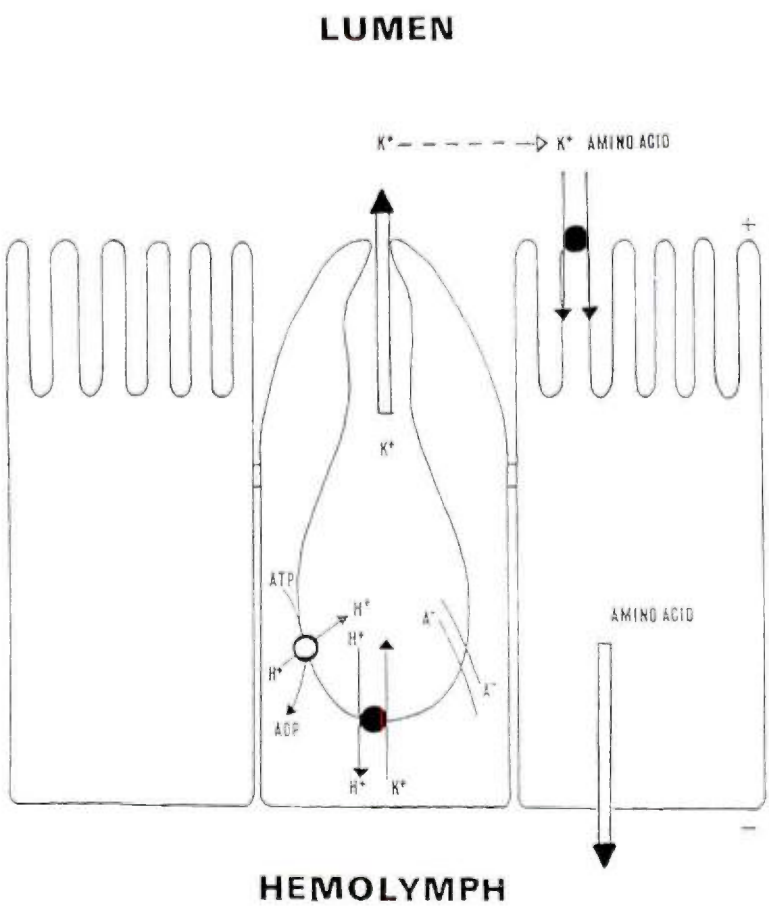


Fig. 1 : Model for amino acid absorption in the midgut of lepidopteran larvae.

Two columnar cells and a goblet cell are represented. On the apical membrane lining the goblet cavity a vacuolar-type proton pump is located, which is associated to a K^+/nH^+ antiporter (Wieckzorek *et al.*, 1991) and responsible for the net electrogenic K^+ secretion into the lumen indicated by the white arrow. The K^+-ions are followed by anions (A^-), which cross the goblet membrane through anion channels. The transepithelial, lumen-positive electrical potential difference thus generated provides the driving force for the secondary active amino acid translocation across the brush border membrane of columnar cells through the K^+/amino acid cotransporters. Ultimately, a net absorption of the amino acid (white arrow) occurs across the columnar cell (redrawn from Giordana *et al.*, 1982).

Fig. 1 : Modèle d'absorption des acides aminés dans l'intestin des larves lépidoptères.

Deux cellules en colonne et une cellule caliciforme sont représentées. Sur la membrane apicale qui tapisse la cavité calciforme se trouve une pompe à protons associée à un antiporteur K^+/nH^+ (Wieczorek et coll., 1991) et responsable de la sécrétion électrogénique nette de K^+ dans la lumière indiqué par une flèche blanche. Les ions K^+ sont suivis par des anions (A^-) qui traversent la membrane caliciforme par les canaux anions. La différence de potentiel électrique transépithélial et positif au niveau de la lumière ainsi générée crée une force conductrice pour la translocation seondaire active des acides aminés à travers la membrane microvilleuse des cellules en colonne par l'intermédiaire des cotransporteurs K^+/acides aminés. Ceci entraîne une absorption nette des acides aminés (flèche blanche) à travers la cellule en colonne (redessiné d'après Giordana et coll., 1982).

hindgut. The integument was cut away and the exposed midgut, deprived of the peritrophic membrane and the Malpighian tubules, was dissected longitudinally and rinsed thoroughly with ice-cold 210 mM sucrose, 45 mM KCl, 10 mM Tris-HCl at pH 7. The two macroscopically discernible anterior-middle and posterior tracts were separated, blotted on filter paper, weighed, placed in cryotubes and frozen by immersing the vial in liquid nitrogen. The cryotubes were then stored in liquid nitrogen.

Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) :

BBMV were prepared from the two midgut portions, which had been rapidly thawed by immersing the cryotube in a 37 °C water bath, using the differential calcium precipitation method as described by Giordana *et al.* (1982). The final pellet was resuspended in a buffer suitable for the transport experiment (whose composition is indicated in the legends to tables) by 10 passes through a 22 gauge needle. The protein concentration was assessed using the BioRad (Richmond, CA) protein assay, with bovine serum albumin as standard, and adjusted to a final concentration of 2-5 mg/ml.

Transport experiments were performed in quadruplicate at 22 °C by rapid filtration of the vesicle suspension through a pre-wetted cellulose nitrate filter (Hanozet *et al.*, 1980). For the determination of the kinetic parameters of L-leucine transport, short-time incubations (7 s) were performed with an automated device for the automatic control of the incubation time. Leucine uptakes at an external pH (pH_o) of 7.2 were initiated by mixing 10 µl of the vesicle suspension (protein concentration 2 mg/ml) to 10 µl of the radiolabelled incubation solution. Uptakes at pH_o 8.7 were obtained by mixing 10 µl of the vesicle suspension (protein concentration 5 mg/ml) to 40 µl of the radiolabelled incubation medium.

The composition of the intra- and extravesicular solutions are indicated in the legends to the tables. For uptakes at pH_o 8.7, the concentration of the intravesicular buffer was enhanced to increase buffering capacity. Mannitol was consequently omitted, to keep osmolarity constant. In the same experiments, the ionophore FCCP (carbonyl cyanide *p*-triafluorometoxyphenyl-hydrazone) was added to the extravesicular solution to increase the proton permeability of the vesicle membrane, so that a transmembrane electrical potential difference of about 90 mV (inside negative) was generated by proton diffusion along their electrochemical gradient. The impermeant anion SO_4^{2-} was substituted for the highly permeable SCN^- to avoid interference in the generation of the membrane potential.

L-[4,5-^{3}H]leucine was purchased from Radiochemical Centre (Amersham International, Amersham, UK).

RESULTS AND DISCUSSION

Tables I and II report the kinetic parameters of leucine uptake into BBMV from the anterior-middle and posterior tracts of *B. mori* midgut, respectively. Leucine kinetics as a function of the external amino acid concentration was measured with saturating external potassium (100 mM) and in the presence of a transmembrane electrical potential difference, conditions which provide adequate uptake values (Giordana *et al.*, 1989 ; Parenti *et al.*, 1992). The experimental data for amino acid uptake in the two midgut tracts, reported in Fig. 2 for the polyhybrid (CCSG × BC 20/II) × (BG 40 × BG2), do not fit a typical Michaelis-Menten equation (panel A), as demonstrated by the curvilinear relationship in the data plot according to Eadie-Hofstee (panel B). For the anterior-middle portion, the experimental data are compatible with a Michaelis-Menten equation plus a nonsaturable component :

$$V_0 = [V_{max}S/(K_m+S)] + K_dS$$

where : V_0 = initial velocity of leucine transport ; V_{max} = maximum velocity ; K_m = Michaelis constant ; K_d = constant of the nonsaturable component of leucine transport ; S = leucine extravesicular concentration.

Table I. Kinetic parameters of leucine transport into BBMV prepared from the anterior-middle portion of the larval midgut of different strains of *B. mori* on their fourth day of the last instar.*

Tableau I. Paramètres cinétiques du transport de la leucine dans les vésicules de membrane microvilleuse préparées à partir de la portion médio-antérieure de l'intestin moyen larvaire de différentes souches de* B. mori *au 4e jour du 5e âge.

Strains *Souches*	Diet *Aliment*	K_m mmol/l	V_{max} nmol/7 s/mg	K_d µl/7 s/mg
Polyhybrids / *Polyhybrides* :				
Shunrei × Shogetsu	Y	0.34 ± 0.04	0.94 ± 0.01	0.12 ± 0.01
(CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2)	L	0.14 ± 0.03	1.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01
Pure races / *Races pures* :				
Bg 36	Y	0.31 ± 0.06	1.13 ± 0.07	0.06 ± 0.01
	ER	0.32 ± 0.04	1.18 ± 0.05	0.07 ± 0.04
Brianza	ER	0.38 ± 0.05	2.00 ± 0.08	0.06 ± 0.01
BC20	Y	0.24 ± 0.03	0.91 ± 0.07	0.05 ± 0.02

* Larvae were either fed with mulberry leaves (L) or Yakult (Y) or ENEA-Ratti (ER) artificial diet.
* *Les larves ont été nourries soit avec des feuilles de mûrier (L) ou sur aliment artificiel Yakult (Y) ou aliment artificiel ENEA-Ratti (ER).*
BBMV were resuspended in (mmol/l):100 mannitol, 10 Hepes-Tris at pH 7.2 and incubated for 7 s in a solution of the following final composition (mmol/l):100 mannitol, 10 Hepes-Tris at pH 7.2, 100 KSCN, 0.15-8 leucine, 1.48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine.
V_{max}, K_m and K_d values are means ± SD, obtained through an iterative computer analysis program (Sigma plot, Jandel) by fitting the experimental data to a Michaelis-Menten equation plus a nonsaturable component.
Les vésicules de membrane microvilleuse ont été resuspendues dans (mmol/l) : 100 mannitol, 10 Hepes-Tris à un pH de 7,2 et incubées pendant 7 secondes dans une solution dont la composition finale est (mmol/l) : 100 mannitol, 10 Hepes-Tris à un pH de 7,2, 100 KSCN, 0,15-8 leucine, 1,48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine.
Les valeurs V_{max}, K_m et K_d correspondent aux moyennes ± l'écart type obtenues à l'aide d'un programme d'analyse sur ordinateur itératif (Sigma plot, Jandel) en insérant les données expérimentales dans une équation Michaelis-Menten avec un composant non saturable.
mg : mg of BBMV proteins / *mg de protéines de vésicules de membrane microvilleuse.*

The kinetic parameters, K_m, V_{max} and K_d, are reported in Table I. The presence of a nonsaturable component indicates that part of the leucine flux, albeit small within the concentration ranges tested, crosses the brush border membrane through a pathway different from that mediated by the cotransporter.

Conversely, the experimental data determined in the posterior tract best fitted to the Hill equation (n = Hill coefficient) :

$$V_0 = V_{max}S^n/(K_m^n+S^n)$$

The best fit to different mathematicals models (the Michaelis-Menten equation, the same equation plus a nonsaturable component, the Michaelis-Menten equation for two membrane carriers, the Hill equation) of the experimental data reported in Fig. 2 was determined on a statistical basis using MIR II computer program (Bianchi *et al.*, 1988). The values of the applied significance tests (the goodness of fit, GOF, and the agreement factors, R and R_w) were lowest for the Hill equation,

excluding all the other models as candidate models. This kinetic feature is typical of the K^+-dependent neutral amino acid uptake into BBMV of *Bombyx mori* at a nearly neutral extravesicular pH and is compatible with a random two substrate (bi-bi) transport process, with a preferred pathway to the formation of the ternary complex K^+/leucine/cotransporter (Giordana *et al.*, in preparation).

Table II. Kinetic parameters of leucine transport into BBMV prepared from the posterior portion of the larval midgut of different strains of *B. mori* on their fourth day of the last instar.*

Tableau II. Paramètres cinétiques du transport de la leucine dans les vésicules de membrane microvilleuse préparées à partir de la portion postérieure de l'intestin moyen larvaire de différentes souches de* B. mori *au 4e jour du 5e âge.

Strains *Souches*	Diet *Aliment*	K_m *mmol/l*	V_{max} *nmol/7 s/mg*	*n*
Polyhybrids / *Polyhybrides* :				
Kinshu × Showa	Y	0.55 ± 0.08	4.24 ± 0.17	0.72 ± 0.05
Shunrei × Shogetsu	Y	0.47 ± 0.05	5.04 ± 0.01	0.81 ± 0.05
	ER	0.56 ± 0.10	4.68 ± 0.13	0.65 ± 0.04
(CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2)	L	1.07 ± 0.26	10.32 ± 1.27	0.67 ± 0.03
Pure races / *Races pures* :				
Bg 36	Y	0.91 ± 0.02	4.64 ± 0.03	0.62 ± 0.06
	ER	0.82 ± 0.16	4.22 ± 0.02	0.69 ± 0.04
Brianza	ER	2.35 ± 0.52	8.67 ± 0.54	0.66 ± 0.04
BC20	Y	0.87 ± 0.21	10.16 ± 0.89	0.93 ± 0.09

* Larvae were either fed with mulberry leaves (L) or Yakult (Y) or ENEA-Ratti (ER) artificial diet.
* *Les larves ont été nourries avec des feuilles de mûrier (L) ou sur aliment artificiel Yakult (Y) ou aliment artificiel ENEA-Ratti (ER).*
BBMV were resuspended in (mmol/l):100 mannitol, 10 Hepes-Tris at pH 7.2 and incubated for 7 s in a solution of the following final composition (mmol/l):100 mannitol, 10 Hepes-Tris at pH 7.2, 100 KSCN, 0.15-8 leucine, 1.48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine.
V_{max}, K_m and K_d values (means ± SD) were routinely obtained through an iterative computer analysis program (Sigma plot, Jandel) by fitting the experimental data to the Hill equation.
Les vésicules de membrane microvilleuse ont été resuspendues dans (mmol/l) : 100 mannitol, 10 Hepes-Tris à un pH de 7,2 et incubées pendant 7 secondes dans une solution dont la composition finale est (mmol/l) : 100 mannitol, 10 Hepes-Tris à un pH de 7,2, 100 KSCN, 0,15-8 leucine, 1,48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine.
Les valeurs V_{max}, K_m et K_d (moyennes ± écart type) ont été obtenues à l'aide d'un programme d'analyse sur ordinateur itératif (Sigma plot, Jandel) en insérant les données expérimentales dans l'équation de Hill.
n : Hill coefficient / *Coefficient de Hill.*
mg : mg of BBMV proteins / *mg de protéines de vésicules de membrane microvilleuse.*

Marked differences are evident as regards the amino acid transport ability of the two midgut portions, since in all the strains tested the V_{max} value for leucine in the posterior portion is from five to elevenfold higher than in the anterior-middle tract. V_{max} value depends on the number of cotransporters present per unit of brush border membrane and on the rate by which the translocation

of the substrates occurs. This parameter varied appreciably in the different strains of *B. mori* tested, though not in the same way in the two midgut tracts.

The kinetic parameter K_m expresses the affinity of the cotransporter for leucine when the external concentration of potassium is saturating (100 mM). It is worth noting that K^+ concentration in the midgut lumen of the feeding larva exceeds 100 mM (Giordana and Sacchi, 1978), so the cotransporter *in vivo* is fully saturated. At an external pH of 7.2, the cotransporters located in the brush border membrane of the anterior-middle tract showed an affinity for leucine which is higher than those of the posterior portion. K_m values varied comparatively less within the anterior-middle tract, whereas the posterior one displayed a greater variability among the different strains, with values ranging between 0.47 and 2.35 mM.

The larvae of the polyhybrid strain Shunrei × Shogetsu and of the pure line BG 36 were reared on two different artificial diets, a commercial Yakult diet for pure races and diet no. 27 set up in the ENEA-Ratti Research Laboratory. The latter also warrant excellent growth of the larvae and perfect timing of the instars. Accordingly, very similar kinetic parameters for leucine uptake were found for the strains reared on the two different diets (Tables I and II). However, work is in progress for a better understanding of the correlations between diet (mulberry leaves and artificial diets) and amino acid absorption.

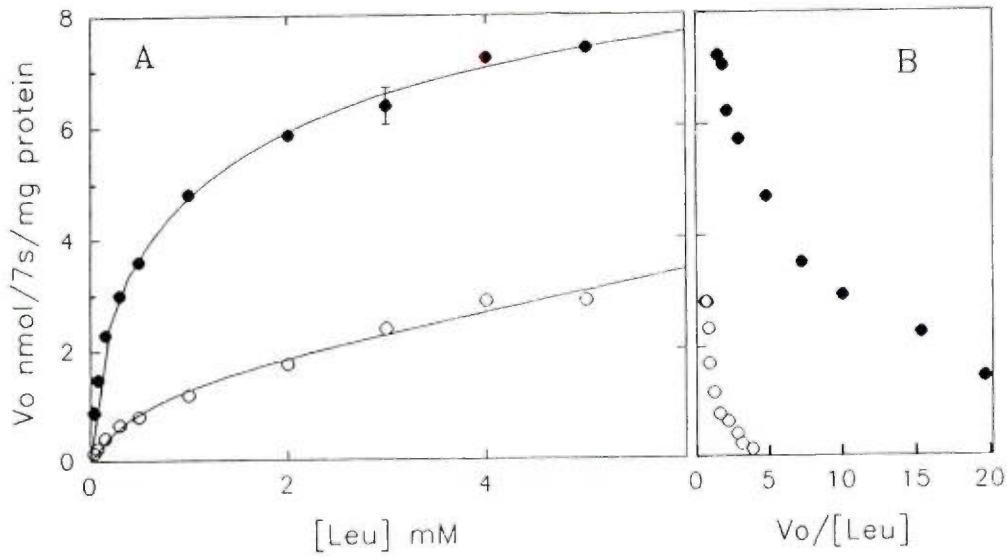


Fig. 2 : Kinetics of leucine uptake.

Panel A : Kinetics of leucine uptake into BBMV prepared from the anterior-middle (open symbols) and posterior (closed symbols) tracts of *B. mori* (polyhybrid (CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2) larval midgut.
Panel B : Eadie-Hofstee plot of the data. The experimental conditions for uptake and kinetic parameters are given in Tables I and II.

Fig. 2 : Cinétique d'entrée de la leucine.

Planche A : *Cinétique d'entrée de la leucine dans les vésicules de membranes microvilleuses préparées à partir des régions médio-antérieure (symboles ouverts) et postérieure (symboles fermés) de l'intestin larvaire de B. mori (polyhybride (CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2).*
Planche B : *Tracé des données selon Eadie-Hofstee. Les conditions expérimentales d'ingestion et les paramètres cinétiques sont donnés dans les tableaux I et II.*

Table III. Effect of the extravesicular pH values on the kinetic parameters of leucine transport into BBMV from the anterior-middle and posterior portions of the larval midgut of different strains of *B. mori* on the fourth day of the last instar.*

Tableau III. Effet des valeurs de pH extravésiculaires sur les paramètres cinétiques du transport de la leucine dans les vésicules de membrane microvilleuse issues des portions médio-antérieure et postérieure de l'intestin moyen larvaire de différentes souches de* B. mori *au quatrième jour du dernier âge.*

Strains *Souches*	Diet *Aliment*	K_m (mmol/l)		V_{max} (nmol/7 s/mg)	
		pH_o 7.2	pH_o 8.7	pH_o 7.2	pH_o 8.7
Anterior-middle tract / *Voie moyenne-antérieure*					
Polyhybrids / *Polyhybrides* :					
Shunrei × Shogetsu	ER	0.34 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.94 ± 0.04	1.97 ± 0.09
(CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2)	L	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.87 ± 0.06	0.93 ± 0.08
Pure race / *Race pure* :					
BC20	Y	0.24 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.91 ± 0.07	1.16 ± 0.06
Posterior tract / *Voie postérieure*					
Polyhybrids / *Polyhybrides* :					
Shunrei × Shogetsu	ER	0.56 ± 0.10	0.12 ± 0.01	4.68 ± 0.21	4.62 ± 0.09
(CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2)	L	1.27 ± 0.41	0.12 ± 0.01	11.55 ± 0.78	11.80 ± 1.00
Pure race / *Race pure* :					
BC20	Y	0.87 ± 0.21	0.10 ± 0.01	10.16 ± 0.89	8.39 ± 0.17

* Larvae were either fed with mulberry leaves (L) or Yakult (Y) or ENEA-Ratti (ER) artificial diet.
* *Les larves ont été nourries avec des feuilles de mûrier (L) ou sur aliment artificiel Yakult (Y) ou aliment artificiel ENEA-Ratti (ER).*
Experimental conditions for uptakes at pH_{out} 7.2 as reported in Tables I and II. For uptakes at pH_{out} 8.7, BBMV were resuspended in (mmol/l): 90 Hepes, 34 Tris at pH 7.2 and incubated for 7 s in a solution of the following final composition (mmol/l): 48 Tris-OH, 50 K_2SO_4, 0.15-3 leucine, 0.55-1.48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine, 100 µM FCCP, at pH_o 8.7. Kinetic parameters were calculated as indicated in Tables I and II for the experiments at pH_o 7.2 and V_{max} and K_m values (mean ± SD) only are reported. The data for the posterior tract at pH_o 8.7 fitted to a typical Michaelis-Menten equation.
Les conditions expérimentales pour les entrées au pH_{out} de 7,2 sont décrites dans les tableaux I et II. Pour les ingestions à pH_{out} 8,7, les vésicules de membrane microvilleuse ont été resuspendues dans (mmol/l) : 90 Hepes, 34 Tris à pH 7,2 et incubées pendant 7 secondes dans une solution dont la composition finale est la suivante (mmol/l) : 48 Tris-OH, 50 K_2SO_4, 0,15-3 leucine, 0,55-1,48 MBq/ml L-[4,5-^{3}H]leucine, 100 µM FCCP, pH_o 8,7. Les paramètres cinétiques ont été calculés selon la méthode décrite dans les tableaux I et II pour les expériences à pH_o 7,2. Seules, les valeurs V_{max} et K_m (moyenne ± écart type) sont précisées. Les données portant sur la partie postérieure à pH_o 8,7 ont été insérées dans une équation de Michaelis-Menten ordinaire.

A remarkable characteristic of the gut of all species of lepidopteran larvae is represented by the extremely high pH (over 12) of the midgut lumen content. This high pH is generated and maintained by the midgut at the expense of metabolic energy (Dow, 1992). Larval digestive enzymes in general (Santos *et al.*, 1984, 1986) and of *B. mori* in particular (Kuriyama and Eguchi, 1985 ; Azuma and Eguchi, 1989) are adapted to such an environment, so that they exhibit their highest activity in alkaline media. We have therefore measured leucine uptake into BBMV from three strains, incubated in an

extravesicular solution of suitable composition at pH 7.2 or 8.7. In the latter condition, the pH gradient generated across the vesicle membrane reproduces the condition effectively occurring *in vivo* (Dow, 1992). Leucine kinetic parameters calculated from the experimental results for the anterior-middle and posterior tracts are reported in Table III. Leucine uptake as a function of its external concentration in the posterior midgut followed a typical Michaelis-Menten kinetics at pH_o 8.7. It is apparent that the external pH value only slightly affects leucine kinetics in the anterior-middle portion of the midgut. Conversely, the activity of the K^+/leucine cotransporters of the posterior tract, the more specifically midgut region responsible for the absorption of amino acids, is strongly influenced by extracellular luminal pH, since the affinity of the transport proteins for the amino acid increases from five to tenfold in an alkaline environment, depending on the strain. On the other hand, the translocation step is not affected, since V_{max} values do not vary significantly.

It has been recently observed (Karowe and Martin, 1993) that total larval weight gain, relative growth rate and net growth efficiency decrease in *Manduca sexta* larvae fed diets with a higher buffer concentration or buffering capacity. Diet pH itself (ranging between 4.4-5.5) had minor effects on growth parameters, and, according to authors, larval performance is reduced through effects on ingestion and assimilation. As a matter of fact, a more acidic lumen pH not only hinders the digestion of the ingested food by diminished activity of the alkaline hydrolases (Kuryiyama and Eguchi, 1985 ; Azuma and Eguchi, 1989 ; Chatterjee *et al.*, 1992), but, as is apparent from the data reported in Table III, it also hampers amino acid absorption.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from ENEA-Ratti and by a MURST 60 % Research Grant.

REFERENCES

AKAI H. (1969) Ultrastructural localization of phosphatases in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 14, 1623-1628.

AZUMA M., YAMASHITA O. (1985) Cellular localization and proposed function of midgut trehalase in the silkworm larva, *Bombyx mori*. Tissue and Cell, 17, 539-551.

AZUMA M., EGUCHI M. (1989) Discrete localization of distinct alkaline phosphatase isoenzymes in the cell surface of silkworm midgut epithelium. J. Exp. Zool., 251, 108-112.

BIANCHI R., HANOZET G.M., SENECI A., PILONE SIMONETTA M. (1988) A new implemented version of program MIR (MIR II) : analysis and identification of mathematical models in enzyme and transport kinetic studies. Comput. Meth. Progr. Biomed., 27, 189-196.

CHAMBERLIN M.E. (1990) Ion transport across the midgut of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). J. Exp. Biol., 150, 425-442.

CHATTERJEE S.N., RAO C.G.P., CHATTERJEE G.K., ASWATH S.K. (1992) Genetic variability of amylase activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., and its significance. Sericologia, 32(4), 681-683.

CIOFFI M. (1979) The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. Tissue and Cell, 11, 467-479.

DOW J.A.T. (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. J. Exp. Biol., 172, 355-375.

GIORDANA B., SACCHI V.F. (1978) Cellular ionic concentrations in the midgut of two larvae of Lepidoptera *in vivo* and *in vitro*. Comp. Biochem. Physiol., 59A, 17-20.

GIORDANA B., SACCHI V.F., HANOZET G.M. (1982) Intestinal amino acid absorption in lepidopteran larvae. Biochim. Biophys. Acta, 692, 81-88.

GIORDANA G., SACCHI V.F., PARENTI P., HANOZET G.M. (1989) Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes from lepidopteran larvae. Am. J. Physiol., 257, R494-R500.

HARVEY W.R. (1992) Physiology of V-ATPases. J. Exp. Biol., 172, 1-17.

HANOZET G.M., GIORDANA B., SACCHI V.F. (1980) K^+-dependent phenylalanine uptake in membrane vesicles isolated from the midgut of *Philosamia cynthia* larvae. Biochim. Biophys. Acta, 596, 481-486.

HORIE Y., WATANABE K., SAKAMOTO E. (1982) Evidence of stepwise digestion of protein in the digestive system of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 14, 359-363.
KAROWE D.N., MARTIN M.M. (1993) Determinants of diet quality : the effects of diet pH, buffer concentration and buffering capacity on growth and food utilization by larvae of *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). J. Insect Physiol., 39, 47-52.
KLEIN U. (1992) The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport : immunological evidence for the occurrence of a V-ATPase in insect ion-transporting epithelia. J. Exp. Biol., 172, 345-354.
KOBAYASHI M. (1971) Fine structure of the basal granular cell in the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 40, 101-106.
KURIYAMA K., EGUCHI M. (1985) Conversion of the molecular form by alkaline treatment of gut protease from the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol., 82B, 575-579.
MOFFETT D.F., KOCH A. (1992) Driving forces and pathways of H^+ and K^+ transport in insect midgut goblet cells. J. Exp. Biol., 172, 403-416.
PARENTI P., VILLA M., HANOZET G.M. (1992) Kinetics of leucine transport in brush border membrane vesicles from lepidopteran larvae midgut. J. Biol. Chem., 267,15391-15397.
PARENTI P., TASCA M., HANOZET G.M., GIORDANA B. (1993) Properties of the K^+/neutral amino acid cotransporters expressed along lepidopteran larval midgut. Abstract SEB Canterbury Meeting, 29 March-2 April.
SANTOS C.D., RIBEIRO A.F., FERREIRA C., TERRA W.R. (1984) The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnys ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and secretory activity in relation to the organization of digestion. Cell Tissue Res., 237, 565-574.
SANTOS C.D., RIBEIRO A.F., TERRA W.R. (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnys ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. Can. J. Zool., 64, 490-500.
WAKU J., SUMIMOTO K. (1971) Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with regard to the calcium deposits in the cytoplasm. I. Light microscopy. Tissue and Cell, 3, 127-136.
WIECZOREK H., PUTZENLECHNER M., ZEISKE W., KLEIN U. (1991) A vacuolar-type proton pump energizes H^+/K^+-antiport in an animal plasma membrane. J. Biol. Chem., 266, 15340-15347.
WIECZOREK H. (1992) The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport : molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. J. Exp. Biol., 172, 335-343.

PARAMETRES CINETIQUES DU TRANSPORT DE LA LEUCINE A TRAVERS LA MEMBRANE MICROVILLEUSE DES CELLULES EN COLONNE DE L'INTESTIN MOYEN CHEZ DES LARVES DE DIFFERENTES SOUCHES DE *BOMBYX MORI*

M. TASCA[1], P. IANNE[2], S. CAPPELLOZZA[3], L. CAPPELLOZZA[3], R. ZANCHI[2]*, P. PARENTI[4] & B. GIORDANA1**

1. Department of Biology, University of Milan, via Celoria 26, 20133 Milan, Italie.

2. ENEA-Ratti Research Laboratory, via Madonna 30, 22070 Guanzate, Italie.

3. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura, Brusegana, 35100 Padova, Italie.

4. Department of General Physiology and Biochemistry, University of Milan, via Celoria 26, 20133 Milan, Italie.

L'absorption des acides aminés neutres par l'intestin moyen des larves de lépidoptères est un processus actif secondaire dû à la présence de cotransporteurs K^+/acides aminés dans la membrane microvilleuse des cellules en colonne qui couplent le flux K^+ à l'intérieur des cellules dirigé selon son gradient électrochimique au flux d'acides aminés. On a récemment observé que deux types différents de ces cotransporteurs, distinguables par leur comportement cinétique, s'exprimaient dans les parties médio-antérieure et postérieure de l'intestin moyen des larves de **Bombyx mori**, *deux régions qui présentent des différentiations morphologiques bien définies.*

On a mesuré les paramètres cinétiques du transport de la leucine dépendant du K^+ dans les vésicules de la membrane microvilleuse des deux régions intestinales chez des larves de différentes souches de **Bombyx mori** *afin de déterminer les variations éventuelles de la capacité d'absorption des acides aminés. Des différences prononcées sont observées pour ce qui concerne la capacité de transport des acides aminés dans les deux parties intestinales étant donné que, chez toutes les souches testées, la valeur V_{max} pour la leucine dans la partie postérieure est de 5 à 11 fois supérieure à celle obtenue pour la partie médio-antérieure. De plus, les valeurs V_{max} varient sensiblement entre les différentes souches de* **B. mori** *testées.*

Chez toutes les souches, les deux parties intestinales répondent différemment à l'alcalinisation du liquide extravésiculaire. L'activité des cotransporteurs K^+/leucine de la région postérieure, la région intestinale plus spéficiquement responsable de l'absorption des acides aminés, est fortement influencée par le pH de la lumière extracellulaire étant donné que l'affinité des protéines de transport pour l'acide aminé augmente de 5 à 10 fois, selon la souche, en milieu alcalin.

---

* Adresse permanente : Department of Food Science and Microbiology, University of Milan, via Celoria, 20133 Milan, Italie.

** Auteur à contacter pour toute correspondance.

INTRODUCTION

Il est essentiel de connaître la nutrition du ver à soie *Bombyx mori* pour préparer des aliments artificiels qui lui soient adaptés. Bien que la capacité de l'intestin du ver à soie à digérer la nourriture ingérée ait été étudiée de manière extensive par une caractérisation précise des différentes classes d'enzymes digestives (Kuriyama et Eguchi, 1985 ; Azuma et Yamashita, 1985 ; Azuma et Eguchi, 1989 ; Chatterjee et coll., 1992), on connaît moins le rôle des entérocytes intestinaux dans l'absorption des éléments nutritifs libérés.

On sait que, sur toute sa longueur, l'épithélium de l'intestin moyen des larves de lépidoptères, y compris celles de *Bombyx mori*, présente deux types différents de cellules : les cellules en colonne et les cellules caliciformes (Akai, 1969 ; Kobayashi, 1971 ; Waku et Sumito, 1971) dont la structure fine a été décrite avec précision chez *Manduca sexta* par Cioffi (1979). Les cellules caliciformes sont impliquées dans la régulation ionique (Harvey, 1992 ; Moffet et Koch, 1992 ; Wieczorek, 1992) tandis que les cellules en colonne sont responsables de la sécrétion des enzymes digestives (Santos et Terra, 1984 ; Azuma et Eguchi, 1989) et de l'absorption des éléments nutritifs de la lumière intestinale.

Bien que la capacité de la membrane des entérocytes à transloquer les petits peptides de la lumière à la cellule, comme l'ont suggéré Horie et coll. (1982), n'ait pas encore été confirmée, on a clairement établi que la membrane microvilleuse contient des protéines de transport qui sont capables de lier des acides aminés simples et de les tranférer de manière très efficace de la lumière au cytoplasme cellulaire (Giordana et coll., 1989). Ces protéines de transport appartiennent à la classe des cotransporteurs, qui contiennent, en outre, un site de liaison de cation, couplant ainsi l'acide aminé au flux cationique. Contrairement aux cotransporteurs d'acides aminés exprimés dans les membranes microvilleuses de l'épithélium chez les vertébrés, qui se caractérisent par leur dépendence exclusive aux ions Na^+, les cotransporteurs d'acides aminés dans l'intestin moyen chez les lépidoptères sont capables de lier les ions K^+. On a proposé un modèle global d'absorption transépithéliale des acides aminés dans l'intestin moyen des larves de lépidoptères en 1982 (Giordana et coll.). Ce modèle est représenté dans la figure 1 et tient compte de tous les progrès récents dans la connaissance des propriétés moléculaires et fonctionnelles de la cellule caliciforme (Wieczorek et coll., 1991 ; Klein, 1992) qui s'associe à la cellule en colonne pour fournir la force motrice nécessaire à l'absorption active des acides aminés (voir légende de la fig. 1).

Les cotransporteurs K^+/acides aminés ont pu être identifiés seulement après qu'une préparation de vésicules de membrane microvilleuse purifiées (BBMV) ait été mise au point en éliminant les membranes intracellulaires et basales par précipitation au Ca^{++} puis par centrifugation différencielle (Hanozet et coll., 1980). Les fragments de membrane microvilleuse purifiés forment spontanément des vésicules orientées correctement. Dans ces vésicules, les protéines de transport conservent les propriétés fonctionnelles présentes dans l'organe puisque, dans tous les cas étudiés, les caractéristiques de l'ingestion des acides aminés dans les BBMV ont été confirmées par les expériences réalisées sur l'intestin isolé. De plus, les BBMV permettent d'étudier le rôle des facteurs intra- et extracellulaires sans qu'il y ait interférence du métabolisme cellulaire.

Des études récentes sur des larves de *Bombyx mori* (Parenti et coll., 1993) ont montré que deux types différents de cotransporteurs pour les acides aminés neutres, reconnaissables à leurs caractéristiques cinétiques, s'expriment dans les parties médio-antérieure et postérieure de l'intestin, deux régions identifiables à l'oeil nu qui correspondent, chez d'autres lépidoptères, à des différenciations morphologiques, enzymatiques et fonctionnelles bien définies (Cioffi, 1979 ; Santos et coll., 1984 ; 1986 ; Chamberlin, 1990 ; Dow, 1992).

Les paramètres cinétiques du transport de la leucine dépendant du K^+, un acide aminé qui est transporté facilement par le système des acides aminés neutres (Parenti et coll., 1992), ont été mesurés dans les régions médio-antérieure et postérieure de l'intestin larvaire chez différentes souches de *Bombyx mori* afin de mettre en évidence les variations éventuelles de la capacité d'absorption des acides aminés.

MATERIELS ET METHODES

Des larves du cinquième âge de *Bombyx mori* ont été nourries avec des feuilles de mûrier ou des aliments artificiels (Yakult Co., Japon, ou Laboratoire de Recherches ENEA-Ratti, Italie) suivant la méthode indiquée dans les tableaux. On a utilisé deux polyhybrides japonais et un polyhybride italien ainsi que trois races pures italiennes au cinquième jour du dernier âge larvaire, lorsque leur poids atteignait 3,6 ± 0,1 g.

Les vers à soie ont été conservés dans de la glace pilée pendant 15-20 minutes puis sectionnées juste derrière la dernière paire de pattes thoraciques et la quatrième paire d'appendices abdominaux pour éliminer les intestins antérieur et postérieur. Le tégument a été détaché et l'intestin moyen ainsi exposé, après élimination de la membrane péritrophique et des tubes de Malpighi, a été disséqué sur sa longueur et rinsé entièrement dans une solution réfrigérée dans la glace fondante de 210 mM sucrose, 45 mM KCl, 10 mM Tris-HCl à pH 7. Les deux parties médio-antérieure et postérieure, visibles à l'oeil nu, ont été séparées, séchées sur un filtre, pesées, placées dans des cryotubes et congelées par immersion du tube dans de l'azote liquide. Les cryotubes ont ensuite été stockés dans de l'azote liquide.

Préparation des vésicules de membrane microvilleuse (BBMV) :

Les BBMV ont été préparées à partir des deux parties de l'intestin moyen décongelées rapidement par immersion du cryotube dans un bain d'eau à 37 °C, suivant la méthode de précipation différentielle au calcium décrite par Giordana et coll. (1982). Le culot final a été resuspendu dans un tampon adapté à l'expérience sur le transport (composition indiquée dans les légendes des tableaux) en le faisant passer 10 fois à travers une aiguille de calibre 22. La concentration en protéines a été évaluée par dosage protéique BioRad (Richmond, CA), en utilisant de la sérumalbumine bovine comme standard, et ajustée à une concentration finale de 2 à 5 mg/ml.

Les expériences sur le transport ont été répétées quatre fois à 22 °C par filtration rapide de la suspension de vésicules à travers un filtre de nitrate de cellulose humidifié (Hanozet et coll., 1980). Pour la détermination des paramètres cinétiques du transport de la L-leucine, des incubations de courte durée (7 secondes) ont été réalisées à l'aide d'un appareil contrôlant automatiquement la durée d'incubation. Les ingestions de leucines à un pH externe (pH_o) de 7,2 ont été initiées en mélangeant 10 µl de suspension vésiculaire (concentration en protéines : 2 mg/ml) à 10 µl de la solution d'incubation radiomarquée. Les ingestions à pH_o 8,7 ont été obtenues en mélangeant 10 µl de la suspension vésiculaire (concentration en protéines : 5 mg/ml) à 40 µl du milieu d'incubation radiomarqué.

Les compositions des solutions intra- et extravésiculaire sont indiquées dans les légendes des figures. Pour les ingestions à pH_o 8,7, la concentration du tampon intravésiculaire a été augmentée afin d'accroître la capacité tampon. On n'a donc pas utilisé de mannitol pour maintenir l'osmolarité constante. Dans les mêmes expériences, on a ajouté du ionophore FCCP (cyanure de carbonyl *p*-trifluorométoxyphényl-hydrazone) à la solution extravésiculaire afin d'augmenter la perméabilité aux protons de la membrane vésiculaire, permettant ainsi de générer une différence de potentiel électrique à travers la membrane de l'ordre de 90 mV (négative à l'intérieur) par diffusion des protons le long de leur gradient électrochimique. L'anion non perméant SO_4^{2-} a été remplacé par l'anion fortement perméant SCN^- pour éviter toute interférence dans la génération du potentiel de membrane.

La L[4,5-^{3}H] leucine a été achetée chez Radiochemical Centre (Amersham International, Amersham, Royaume Uni).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les tableaux I et II décrivent respectivement les paramètres cinétiques de l'ingestion de leucine dans les BBMV préparées à partir des régions médio-antérieure et postérieure de l'intestin moyen de *B. mori*. La cinétique de la leucine en fonction de la concentration en acides aminés externes a été mesurée avec le potassium externe à saturation (100 mM) et en présence d'une différence de potentiel électrique transmembranaire, conditions qui permettent d'obtenir des valeurs d'ingestion adéquates

(Giordana et coll., 1989 ; Parenti et coll., 1992). Les données expérimentales concernant l'entrée d'acides aminés dans les deux parties intestinales, décrites dans la figure 2 pour le polyhybride (CC SG × BC 20/II) × (BG 40 × BG 2), ne s'ajustent pas à une équation de type Michaelis-Menten (planche A), comme le montre la relation curvilinéaire du tracé des données selon Eadie-Hofstee (planche B). Pour la partie médio-antérieure, les données expérimentales sont compatibles avec une équation de type Michaelis-Menten additionnée d'un composant non saturable :

$$V_0 = [V_{max}S/(K_m+S)] + K_dS$$

où : V_0 = vitesse initiale du transport de la leucine ; V_{max} = vitesse maximale ; K_m = constante de Michaelis ; K_d = constante du composant non saturable du transport de la leucine ; S = concentration extravésiculaire en leucine.

Les paramètres cinétiques K_m, V_{max} et K_d sont présentés dans le tableau I. La présence d'un composant non saturable indique qu'une partie du flux de leucine, bien qu'infime en regard des fourchettes de concentrations testées, traverse la membrane microvilleuse par une trajectoire différente de celle empruntée par le cotransporteur.

A l'inverse, les données expérimentales définies pour la région postérieure de l'intestin suivent mieux l'équation de Hill (*n* = coefficient de Hill) :

$$V_0 = V_{max}S^n/(K_m{}^n+S^n)$$

L'adaptation optimale aux différents modèles mathématiques (équation de Michaelis-Menten, même équation plus un composant non saturable, équation de Michaelis-Menten pour deux porteurs de membrane, équation de Hill) pour les données expérimentales décrites dans la figure 2 a été déterminée à partir de calculs statistiques effectués à l'aide d'un programme informatique MIR II (Bianchi et coll., 1988). Les valeurs des tests de signification appliqués (bonne adaptation, GOF, et facteurs de concordance, R et R_w) sont minimales pour l'équation de Hill, invalidant tous les autres modèles. Ce trait cinétique est typique de l'ingestion des acides aminés neutres liée au K^+ dans les BBMV de *Bombyx mori* à un pH extravésiculaire presque neutre et est compatible avec un processus aléatoire de transport de deux substrats (bi-bi), avec une préférence pour la formation d'un complexe ternaire K^+/leucine/cotransporteur (Giordana et coll., en préparation).

Des différences prononcées sont évidentes pour ce qui concerne la capacité de transport des acides aminés des deux parties intestinales étant donné que, chez toutes les souches testées, la valeur V_{max} pour la leucine dans la partie postérieure est de 5 à 11 fois supérieure à celle observée pour la région médio-antérieure. La valeur V_{max} dépend du nombre de cotransporteurs présents par unité de membrane microvilleuse et de la vitesse de translocation des substrats. Ce paramètre varie sensiblement entre les différentes souches de *B. mori* testées, bien que différemment selon la région intestinale.

Le paramètre cinétique K_m exprime l'affinité du cotransporteur pour la leucine lorsque la concentration externe en potassium est saturante (100 mM). Il est intéressant de noter que la concentration en K^+ dans la lumière intestinale de la larve en période d'alimentation dépasse 100 mM (Giordana et Sacchi, 1978), le cotransporteur *in vivo* est donc complètement saturé. A un pH externe de 7,2, les cotransporteurs situés dans la membrane microvilleuse de la partie médio-antérieure présentent une affinité pour la leucine qui est supérieure à celle observée pour la partie postérieure. Les valeurs K_m varient comparativement moins à l'intérieur de la région médio-antérieure alors que la région postérieure fait apparaître une forte variabilité entre les différentes souches, avec des valeurs variant de 0,47 à 2,35 mM.

Les larves de la souche polyhybride Shunrei × Shogetsu et celles de la lignée pure BG 36 ont été élevées sur deux aliments artificiels différents : l'aliment commercial Yakult pour races pures et l'aliment n° 27 mis au point par le laboratoire de recherches ENEA-Ratti. Ce dernier garantit également une excellente croissance des larves et une synchronisation parfaite des âges larvaires. On a relevé des paramètres cinétiques tout à fait similaires pour l'ingestion de la leucine chez les souches élevées sur les deux aliments (Tableaux I et II). Cependant, des travaux visant à mieux comprendre

les corrélations entre aliment (feuilles de mûrier et aliments artificiels) et absorption d'acides aminés sont en cours.

Le fait que le pH du contenu de l'intestin soit extrêmement élevé (supérieur à 12) constitue une caractéristique typique de l'intestin de toutes les espèces de lépidoptères. Ce pH très élevé est généré et conservé par l'intestin moyen aux dépens de l'énergie métabolique (Dow, 1992). Les enzymes digestives larvaires en général (Santos et coll., 1984, 1986) et celles de *B. mori* en particulier (Kuriyama et Eguchi, 1985 ; Azuma et Eguchi, 1989) sont adaptées à un tel milieu et elles ont une activité maximale en milieu alcalin. Nous avons donc mesuré l'entrée de la leucine dans les BBMV de trois souches incubées dans une solution extravésiculaire d'une composition appropriée à un pH de 7,2 ou de 8,7. Dans le deuxième cas, le gradient du pH généré à travers la membrane vésiculaire reproduit exactement la condition *in vivo* (Dow, 1992). Les paramètres cinétiques de la leucine calculés d'après les résultats expérimentaux pour les parties médio-antérieure et postérieure sont décrits dans le tableau III. L'ingestion de la leucine en fonction de sa concentration externe dans l'intestin postérieur suit une cinétique typique de Michaelis-Menten à pH_o 8,7. Il est évident que la valeur du pH externe n'affecte que légèrement la cinétique de la leucine dans la région médio-antérieure de l'intestin moyen. A l'inverse, l'activité des cotransporteurs K^+/leucine de la partie postérieure, la région de l'intestin plus spécifiquement responsable de l'absorption des acides aminés, est fortement influencée par le pH extracellulaire puisque l'affinité des protéines de transport pour l'acide aminé augmente, suivant la souche, de 5 à 10 fois en milieu alcalin. Par ailleurs, la phase de translocation n'est pas affectée puisque les valeurs V_{max} ne varient pas de manière significative.

On a récemment observé (Karowe et Martin, 1993) que le gain total de poids larvaire, le taux de croissance relatif et l'efficacité de croissance nette diminuent chez les larves de *Manduca sexta* nourries avec des aliments contenant une forte concentration tampon ou une forte capacité tampon. Le pH de l'aliment lui-même (dans une fourchette de 4,4 à 5,5) a des effets mineurs sur les paramètres de croissance et, d'après les auteurs, la performance larvaire diminue en raison des effets de l'ingestion et de l'assimilation. En fait, le pH de la lumière de l'intestin, lorsqu'il est acide, non seulement ralentit la digestion de la nourriture ingérée en raison d'une diminution de l'activité des hydrolases alcalines (Kuriyama et Eguchi, 1985 ; Azuma et Eguchi, 1989 ; Chatterjee et coll., 1992) mais il est également évident, d'après les données décrites dans le tableau III, qu'il retarde l'absorption des acides aminés.

EFFECT OF MINERALS ON THE BIOENERGETICS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

K.M. SUBBU RATHINAM[1]*, M. KRISHNAN[1] & J. SULOCHANA CHETTY[2]

1. Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli - 620 024, India.

2. Department of Zoology, Thiagarajar College, Madurai - 625 009, India

The effect of supplementation of a biosalt mixture containing five phosphorus compounds was studied on the bioenergetics of the silkworm, ***Bombyx mori****. Quantity of feeding, assimilation, conversion, rates and efficiencies of conversion increased significantly ($P < 0.001$) in the larvae fed on mulberry leaves supplemented with the biosalt mixture.*

Keywords : *B. mori* larvae, bioenergetics, biosalt mixture.

INTRODUCTION

In recent times, sericulture has undergone a sea change and has started wearing a new look (Krishnaswami *et al.*, 1978). Fortification of mulberry leaves by supplementary nutrient and using them for feeding the silkworm is another useful modern technique to increase their economic value (Kumararaj *et al.*, 1972).

Rearing of the larvae of the silkworm on artificial feed (Ito, 1981) and application of chemically synthesised hormones (Horie and Watanabe, 1980) for improvement of cocoon production and cocoon characters are a breakthrough in sericultural research and now a regular practice among Japanese rearers (Hugues, 1981). Owing to the high cost of artificial feed and hormones, introduction of these techniques in India is very limited (Anonymous, 1980). Hence an economically cheaper technique which could still improve cocoon characters and production is needed (Mathavan *et al.*, 1984).

Inorganic part of the food is composed of different minerals and its balance in the diet plays an important role for successful development of insects (House, 1965). Magnesium, calcium, phosphorus, potassium, iron, manganese and zinc are essential salt elements required by silkworms (House, 1974). Recent literature revealed that silkworm larvae, when fed on phosphorus deficient leaves, were affected by flacherie disease and dropped off without making cocoon (Radha *et al.*, 1988).

Perusal of literature showed that the mineral supplementation has much effect on larval growth and cocoon quality which depends on the utilization of food by *B. mori* larvae. However, the focussing lights on these aspects are scanty. Therefore the present study aims to reveal the effect of supplementation of a biosalt mixture containing five phosphorus compounds on the food utilization pattern of the silkworm, *Bombyx mori* L.

* Off print requests to K.M. Subbu Rathinam.

MATERIALS AND METHODS

The mineral mixture used as a supplementary nutrient for the present study was a biosalt mixture containing *Calcium phos.* (phosphate of lime), *Magnesium phos.* (phosphate of magnesium), *Kali phos.* (phosphate of potash), *Ferrum phos.* (phosphate of iron) and *Natrium phos.* (phosphate of soda) in an equal composition reported by Boericke and Dewey (1963).

For bioenergetic study, newly molted fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, (cross breed : TW, multivoltine × NB_4D_2, bivoltine) obtained from the State Sericulture Department, Madurai, were weighed and maintained individually in 250 ml plastic containers. The weighed silkworms were divided into four groups, each group contained 10 replicates. One was treated as control fed four times a day with normal mulberry leaves. The remaining three groups were fed once a day with leaves soaked in 1, 2 and 3 per cent solutions of a biosalt mixture and the other three times with normal leaves.

Larvae, faeces and unfed food were collected and dried to a constant weight of 60 °C. All the materials were weighed to an accuracy of 0.01 mg in monopan balance. The scheme of energy budget was calculated using the slightly modified IBP formula (Petrusewicz and MacFadyen, 1970),

$$C = P + R + F + U$$

where,
C = consumption
P = production,
R & F + U = energy loss via respiration and faeces production, respectively.

Food assimilation (A) was calculated by subtracting the amount of faeces defaecated from that of C. Food energy at the expense of body functions (M = metabolism) was deduced as the difference between A and P. Assimilation efficiency (AD) was calculated relating A to C and expressed in percentage. Gross and net conversion efficiencies (ECI and ECD) were calculated relating P to C and A separately and expressed in percentage (see also Mathavan *et al.*, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Table I shows the changes in the bioenergetic parameters of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, fed with a biosalt mixture. The consumption rate increased with the increase in the concentration of the biosalt mixture in the diet. The rate of consumption increased to 7.14, 25.22 and 43.91 % over the control, when the larvae fed on 1, 2 and 3 % mineral supplementation, respectively. A significant relationship was observed when the concentration of the biosalt mixture was plotted against consumption rate (Fig. 1). Mathavan *et al.* (1984) reported an increase in food intake in *Bombyx mori* larvae when fed with the diet supplemented with nutrients.

Similar to the consumption, total assimilation was also increased with the increase in the concentration of the biosalt mixture in the diet. Weight specific assimilation was increased from the control (491.9) to treatment III (1046 mg/g live larval wt/day). A significant positive correlation was obtained when the assimilation rate plotted against the concentration of a biosalt mixture (Fig. 1). The increase in assimilation may be due to an increase of minerals in the diet which in turn induced the intake of diet by the gut tissue (Chapman, 1982).

The increase in growth was noted to be more (382 mg dry wt/larva) in the larvae fed with the diet supplemented by 3 % of the biosalt mixture when compared to that of the control (109 mg dry wt/larva). In the present study, the growth rate also increased significantly ($P < 0.001$ for 3 %) with the increase of minerals in the diet. For instance, the rate of production was 8.31, 9.62, 16.14 and 21 mg/g live larval wt/day, when the larvae fed with 0, 1, 2 and 3 % of the biosalt mixture, respectively. The increase in growth by mineral supplementation was reported in *Bombyx mori* larvae by Ito and Niimura (1966a, 1966b), Horie *et al.* (1967), Vishwanath and Krishnamurthy (1982), Loknath and Shivashankar (1986), Subbu Rathinam *et al.* (1990) and Subbu Rathinam and Sulochana Chetty (1991).

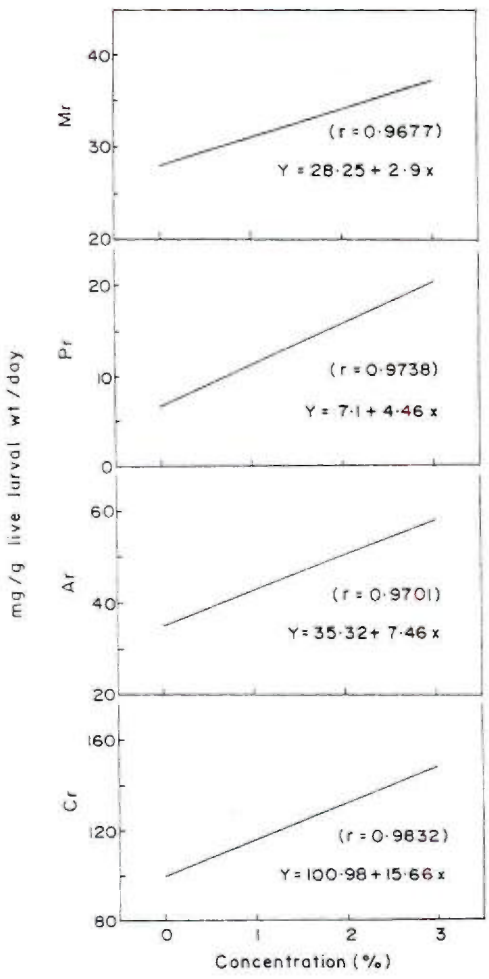


Fig. 1 :

Regression lines show the relationship between different concentrations of the biosalt mixture and rates of consumption, production, assimilation and metabolism.

Fig. 1 :

Les droites de régression indiquent la relation entre les différentes concentrations du mélange de sels, d'une part, et les taux de consommation, la production, l'assimilation et le métabolisme, d'autre part.

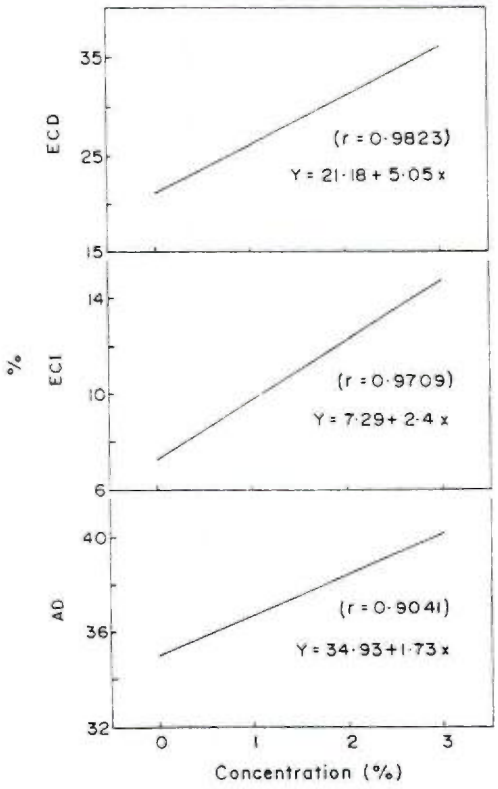


Fig. 2 :

Regression lines show the relationship between different concentrations of the biosalt mixture and the efficiencies of assimilation (AD), conversion of ingested food (ECI) and conversion of digested food (ECD).

Fig. 2 :

Les droites de régression indiquent la relation entre les différentes concentrations du mélange de sels, d'une part, et les efficacités d'assimilation (AD), de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et de conversion de la nourriture digérée (ECD), d'autre part.

In the present study, the assimilation efficiency of *B. mori* larvae was increased by 12.82 % over that of the control (35.85 %) when larvae fed on 3 % of the biosalt mixture. The increase in assimilation efficiency may be due to the increase in digestibility by consuming a higher amount of minerals (Horie and Watanabe, 1980). Woodland *et al.* (1968) reported that assimilation efficiency depends upon the type of food the insect takes. However, White (1978) reported that assimilation efficiency relatively remained unaffected in the grasshopper due to qualitative change in the diet.

Table I. Food utilization indices of *Bombyx mori* larvae fed on a biosalt mixture supplementation.

Tableau I. Indices d'utilisation de la nourriture chez des larves de* Bombyx mori *nourries avec des feuilles de mûriers additionnées d'un mélange de sels.

Parameters	Control	Biosalt mixture		
		1 %	2 %	3 %
Paramètres	*Témoin*	*Mélange de sels*		
		1 %	*2 %*	*3 %*
C^1	1372 ± 2.13	1746.35 ± 4.08	1981 ± 1.63	2686 ± 3.92
A^1	491.9 ± 4.95	613.3 ± 2.61	766 ± 3.27	1046 ± 0.82
P^1	109 ± 3.28	150 ± 2.531	244.2 ± 3.40	382 ± 3.68
M^1	382.9 ± 4.95	463.3 ± 3.76	521.8 ± 1.31	664 ± 2.61
Cr^2	104.54 ± 2.15	112 ± 0.39	130.9 ± 5.12	150.44 ± 2.90
Ar^2	37.48 ± 1.30	39.33 ± 1.70	50.62 ± 2.40	58.59 ± 1.30
Pr^2	8.31 ± 0.12	9.62 ± 1.31	16.14 ± 1.03	21 ± 2.20
Mr^2	29 ± 2.51	29.71 ± 0.92	34.48 ± 1.15	37.19 ± 1.80
AD %	35.85 ± 3.15	35.13 ± 3.88	38.67 ± 1.60	40.45 ± 1.86
ECI %	7.94 ± 0.30	8.59 ± 1.20	12.33 ± 2.26	14.71 ± 1.70
ECD %	22.16 ± 2.90	24.46 ± 0.73	31.88 ± 3.14	36.52 ± 2.10

Each value (mean ± SD) represents an average performance of ten estimations.
Chaque valeur (moyenne ± écart type) correspond à la performance moyenne de 10 estimations.
1 : mg dry wt/larva / *mg poids sec des larves.*
2 : mg/g live larval wt/day / *mg/g de poids vif des larves/jour.*
C : Consommation. **A** : Food assimilation. **P** : Production **M** : Metabolism. **Cr** : Consumption rate. **Ar** : Assimilation rate. **Pr** : Production rate. **Mr** : Metabolism rate. **AD** : Assimilation efficiency. **ECI** : Gross conversion efficiency. **ECD** : Net conversion efficiency.
***C** : Consommation. **A** : Assimilation de la nourriture. **P** : Production **M** : Métabolisme. **Cr** : Taux de consommation. **Ar** : Taux d'assimilation. **Pr** : Taux de production. **Mr** : Taux de métabolisme. **AD** : Efficacité d'assimilation. **ECI** : Efficacité de conversion brute. **ECD** : Efficacité de conversion nette.*

The efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food admitted a positive relation with the concentration of the biosalt mixture (Fig. 2). From Table I it is obvious that the assimilation efficiency increased by 12.82 % when the larvae fed on the diet supplemented by minerals (3 %), however, the ECI and ECD increased to 85.26 % and 64.80 % over that of the control in the

same concentration. It showed that when the larvae fed with the diet containing more minerals divert minimum energy for maintenance by which the larvae can channel maximum energy for seed and silk production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our thanks to Prof. S. Chockalingam, Principal, Thiagarajar College (Madurai, Tamilnadu, India), for encouragement. We (MK and KMS) thank the World Bank and Central Silk Board (Bangalore) for providing a grant under National Sericulture Project.

REFERENCES

ANONYMOUS (1980) Textbook of Tropical Sericulture. Japan Overseas Co-operative Volunteers, (2nd printing) Sibuyaku, Tokyo, p. 392.

BOERICKE M.B., DEWEY M.D. (1963) The Twelve Tissue Remedies of Schussler. Pratap Medical Publishers, New Delhi, 308-108.

CHAPMAN R.F. (1982) The Insect Structure and Function. (Third edition), ELBS Eds., Hong Kong, 79-80.

HORIE Y., WATANABE K., ITO T. (1967) Nutrition of silkworm, *Bombyx mori*. XVIII. Quantitative requirements for potassium, phosphorus, magnesium and zinc. Bull. Sericult. Exp. Sta., 22, 181-193.

HORIE Y., WATANABE H. (1980) Recent advance in sericulture. Ann. Rev. Entomol., 25, 49-71.

HOUSE H.L. (1965) Nutrition. *In* The Physiology of Insecta. M. Rockstein Ed., Vol. 2 (second edition), Academic Press, New York, 648.

HOUSE H.L. (1974) Insect nutrition *In* The Physiology of Insecta. M. Rockstein Ed., Vol. 5 (second edition), Academic Press, New York, 3-4.

HUGUES J.-C. (1981) Sericulture, Japan National Report. Sericologia, 21 (2-3), 50-68.

ITO T. (1981) Development of artificial diets and their application in sericulture, Sericologia, 21(4), 298-306.

ITO T., NIIMURA M. (1966a) Nutrition of the silkworm, *B. mori* L. Its specific requirements and its nutrition in relation to the mineral nutrition of its host plant mulberry, *Morus indica* L. Indian J. Exp. Biol., 4, 31-36.

ITO T., NIIMURA M. (1966b) Nutrition of the silkworm, *B. mori* L. XII. Nutritive effects of minerals. Bull. Sericult. Exp. Sta., 20, 373.

KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANAN S.K., KUMARAJ S. (1978) Sericulture Manual. II. Silkworm rearing. FAO Agricultural Services Bull., 11-43.

KUMARAJ S., VIJAYARAGHAVAN S., KRISHNASWAMI S. (1972) Studies on fortification of mulberry leaves for feeding silkworms. Indian J. Seric., 11, 68-72.

LOKNATH R., SHIVASHANKAR K. (1986) Effect of foliar application of magnesium and micro-nutrients to mulberry on the quality and production of cocoons. Indian J. Seric., 21, 40-41.

MATHAVAN S., BASKARAN K., SIRONMANI A., PANDIAN T.J. (1984) Studies on the utilisation of single cell protein by the silkworm, *Bombyx mori*. Entomol. Exp. Appl., 36, 61-68.

MATHAVAN S., SANTHI G., NAGARAJA SETHURAMAN B. (1987) Effects of feeding regime on energy allocation to reproduction in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Indian Acad. Sci. (Animal Sci.), 96(3), 333-340.

PETRUSEWICZ K., MACFADYEN A. (1970) Productivity of Terrestrial Animals. Backwell Scientific Publications, Oxford, IBP Handbook No. 13, 190.

RADHA N.V., NAGARAJAN P., JAYARAJ S. (1988) Mineral deficiency in mulberry plants, *Morus alba* L., and its effect on economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. Madras Agric. J., 75(11-12), 384-390.

SUBBU RATHINAM K.M., KABILA V., SULOCHANA CHETTY J. (1990) Mineral spray can increase cocoon quality. Indian Silk, 28(12), 35-36.

SUBBU RATHINAM K.M., SULOCHANA CHETTY J. (1991) Effect of fortification of mulberry leaves with minerals to silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 30(2), 121-123.

VISWANATH A.P., KRISHNAMURTHY K. (1982) Effect of foliar spray of micronutrients on the larval development and cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 21, 1-6.
WHITE E.G. (1978) Energetics and consumption rates of alpine grasshoppers (Orthoptera : Acrididae) in New Zealand. Oecologia (Berl.), 33, 17-44.
WOODLAND D.J., HALL B.K., CALDER J. (1968) Gross bioenergetics of *Blatella germanica.* Physiol. Zool., 41, 424-431.

EFFET DES MINERAUX SUR LA BIOENERGETIQUE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

K.M. SUBBU RATHINAM[1]*, M. KRISHNAN[1] & J. SULOCHANA CHETTY[2]

1. Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli - 620 024, Inde.

2. Department of Zoology, Thiagarajar College, Madurai - 625 009, Inde.

On a étudié l'effet de l'addition d'un mélange de sels contenant cinq composés phosphorés sur la bioénergétique du ver à soie **Bombyx mori**. *Les taux de nourrissage, d'assimilation, de conversion et d'efficacité de conversion augmentent de manière significative ($P < 0,001$) chez les larves nourries de feuilles de mûrier additionées du mélange de sels.*

INTRODUCTION

Ces dernières années, la sériciculture a connu de profonds changements et est maintenant perçue différemment (Krishnaswami et coll., 1978). L'enrichissement des feuilles de mûrier par addition d'éléments nutritifs données ensuite comme aliment aux vers à soie constitue l'une des techniques modernes permettant d'accroître leur valeur économique (Kumararaj et coll., 1972).

L'élevage des larves de vers à soie sur un aliment artificiel (Ito, 1981) et l'application d'hormones synthétisées chimiquement (Horie et Watanabe, 1980) en vue d'améliorer la production et les caractères du cocon constituent une avancée capitale en sériciculture et sont des méthodes couramment utilisées chez les éleveurs japonais (Hugues, 1981). En raison du coût élevé de l'aliment artificiel et des hormones synthétiques, l'introduction de ces techniques en Inde reste limitée (Anonyme, 1980). Il est donc nécessaire de mettre au point une technique moins onéreuse qui permettrait quand même d'améliorer les caractères et la production de cocons (Mathavan et coll., 1984).

La partie inorganique de la nourriture est composée de différents minéraux dont l'équilibre dans le régime alimentaire joue un rôle important dans le développement des insectes (House, 1965). Le magnésium, le calcium, le phosphore, le potassium, le fer, le manganèse et le zinc sont des sels indispensables au ver à soie (House, 1974). Des études récentes ont établi que les larves de vers à soie sont plus sensibles à la flacherie et meurent sans filer de cocons lorsqu'elles sont nourries avec des feuilles de mûrier à teneur insuffisante en phosphore (Radha et coll., 1988).

La lecture de la documentation existante indique que l'addition de minéraux affecte fortement la croissance larvaire et la qualité des cocons qui dépend de l'utilisation de la nourriture par les larves de *Bombyx mori*. Cependant, les recherches approfondies sur ce sujet sont peu nombreuses. Cette étude vise donc à mettre en évidence l'effet de l'addition d'un mélange de sels contenant cinq composés phosphorés sur le mode d'utilisation de la nourriture du ver à soie *Bombyx mori* L.

* Demandes de tirés-à-part à adresser à K.M. Subbu Rathinam.

MATERIELS ET METHODES

Le mélange minéral utilisé en apport nutritionnel dans cette étude est un mélange de sels contenant *Calcium phos.* (phosphate de calcium), *Magnesium phos.* (phosphate de magnésium), *Kali phos.* (phostate de potassium), *Ferrum phos.* (phosphate de fer) et *Natrium phos.* (phosphate de sodium) en quantités égales selon la méthode de Boericke et Dewey (1963).

Pour l'étude bioénergétique, des larves du ver à soie *Bombyx mori* du cinquième âge en sortie de mue (croisement TW, polyvoltin × NB_4D_2, bivoltin) fournies par le State Sericulture Department (Madurai) ont été pesées et conservées individuellement dans des récipients en plastique de 250 ml. Une fois pesés, les vers à soie ont été divisés en quatre groupes contenant 10 répliquats. L'un, nourri quatre fois par jour avec des feuilles de mûriers normales, a servi de témoin. Les trois autres groupes ont été nourris une fois par jour avec des feuilles trempées dans des solutions à 1, 2 et 3 % du mélange de sels et trois fois avec des feuilles normales.

Les larves, les matières fécales et la nourriture non ingérée ont été prélevées et séchées à 60 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Tous les matériels ont été pesés sur une balance à un seul plateau d'une précision de 0,01 mg. Le budget énergétique a été calculé d'après la formule IBP légèrement modifiée (Petrusewicz et MacFadyen, 1970) :

$$C = P + R + F + U$$

où :
C = consommation
P = production,
R & F + U = perte d'énergie due à la respiration et la production de matière fécale, respectivement.

L'assimilation de la nourriture (A) a été calculée par soustraction de la quantité de matières fécales produite de celle de C. L'énergie alimentaire dépensée pour les fonctions corporels (M = métabolisme) a été déduite sur la base de la différence entre A et P. L'efficacité d'assimilation (AD) a été calculée en liant A à C et est exprimée sous forme de pourcentage. Les efficacités de conversion brute et nette (ECI et ECD) ont été calculées en liant P à C et à A séparément et sont exprimées sous forme de pourcentage (voir également Mathavan et coll., 1987).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau I présente les modifications des paramètres bioénergétiques des larves du ver à soie *Bombyx mori* nourries avec le mélange de sels. Le taux de consommation augmente en même temps que la concentration du mélange et est supérieur de 7,14, 25,22 et 43,91 % chez les larves traitées respectivement avec les concentrations de 1, 2 et 3 % par rapport au témoin. On note une relation significative entre la concentration du mélange de sels et le taux de consommation (Fig. 1). Mathavan et coll. (1984) ont observé que l'ingestion de nourriture chez les larves de *Bombyx mori* augmentait lorsqu'elles étaient nourries avec un aliment enrichi en éléments nutritifs.

De même que la consommation, l'assimilation totale augmente lorsque la concentration du mélange de sels augmente dans l'aliment. L'assimilation spécifique du poids augmente également par rapport au témoin (491,9) jusqu'au traitement III (1046 mg/g de poids larvaire vif/jour). On obtient une corrélation positive et significative entre le taux d'assimilation et la concentration du mélange de sels (Fig. 1). L'augmentation de l'assimilation pourrait être due à une augmentation des minéraux dans l'aliment qui stimulerait l'absorption de l'aliment dans le tissu intestinal (Chapman, 1982).

L'augmentation de la croissance est plus forte (382 mg de poids sec/larve) chez les larves nourries avec l'aliment enrichi avec le mélange de sels à 3 % que chez le témoin (109 mg de poids sec/larve). Dans cette étude, la vitesse de croissance augmente également de manière significative ($P < 0,001$ pour 3 %) en même temps que la concentration de minéraux dans l'aliment. Par exemple, le taux de production est de 8,31, 9,62, 16,14 et 21 mg/g de poids larvaire vif/jour lorsque les larves sont "traitées" respectivement avec le mélange de sels à des concentrations de 0, 1, 2 et 3 %. L'augmentation de la croissance après addition de minéraux a été observée chez les larves de *Bombyx mori* par Ito et

Niimura (1966a, 1966b), Horie et coll. (1967), Vishwanath et Krishnamurthy (1982), Loknath et Shivashankar (1986), Subbu Rathinam et coll. (1990) et Subbu Rathinam et Sulochana Chetty (1991).

L'efficacité d'assimilation des larves de *B. mori* augmente ici de 12,82 % par rapport au témoin (38,85 %) lorsque les larves sont nourries avec le mélange de sels à 3 %. L'augmentation de l'efficacité d'assimilation peut être due à l'augmentation de la digestibilité, les larves consommant une plus grande quantité de minéraux (Horie et Watanabe, 1980). Woodland et coll. (1968) ont observé que l'efficacité d'assimilation dépend du type de nourriture ingérée par l'insecte. Cependant, White (1978) a établi que la modification de la qualité de la nourriture affectait relativement peu l'efficacité d'assimilation chez la sauterelle.

Les efficacités de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) sont corrélées positivement avec la concentration du mélange de sels (Fig. 2). Le tableau I montre clairement que l'efficacité d'assimilation augmente de 12 % lorsque les larves sont nourries avec un aliment enrichi en minéraux (3 %). Cependant, à la même concentration, l'ECI et l'ECD augmentent de 85,26 % et de 64,80 % par rapport au témoin. Ceci prouve que les larves nourries avec l'aliment enrichi en minéraux utilisent un minimum d'énergie pour leur survie propre, ce qui leur permet de canaliser un maximum d'énergie pour la production d'oeufs et de soie.

EFFECT OF MULTISTAR MARKINGS ON THE METRIC TRAITS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

K.P. JAYASWAL*, SUDIP KR. SEN & G. SUBBA RAO

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

When 6-10 types of multistar parents were inbred and the progeny was found to have a varying number of star spots, the manifestation of a higher number of star spots on the larval body segments from 6th to 10th reduced fecundity, larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length significantly ($P < 0.05$) but no decline could be observed in hatching percentage, effective rate of rearing (ERR) and shell ratio percentage. Positive correlations between larval weight and cocoon weight, cocoon weight and shell weight, shell weight and filament length were observed. The interaction effect between marking pattern and seasons was found to be significant ($P < 0.05$) for fecundity, hatching percentage, ERR, shell weight, shell ratio percentage and filament length.

Keywords : *Bombyx mori*, multistar, metric traits, pleiotropic nature.

INTRODUCTION

In the silkworm, *Bombyx mori* L., the normal marking is represented by three types of spots, i.e. eye spot on the 2nd segment, crescents or lunules on the 5th segment and star spots on the 8th segment. In the case of multistar form, star spots, when well developed on the larval integument, are seen in each segment dorsally from the 6th to 10th segments (Tanaka, 1958). This marking is a simple recessive to the normal (Tanaka, 1927). However, the number of spots depends on the genetic background and incubation temperature (Chikushi, 1972 ; Doira, 1978 ; Gamo, 1973). Similarly, the number and location of the multilunar patterns are influenced by the incubation temperature and genes (Yokoyama, 1959). Murakami (1989) has observed that an excess or reduced number of abdominal legs has a strong relationship to the embryonic lethality on the basis of the existing patterns of crescent marking and star spot marking.

As no information is available regarding the effect of manifestation of star spots on the metric traits of the silkworm, *Bombyx mori* L., the present study has been undertaken to understand the same during some rearing seasons in AB5, which is an evolved multivoltine breed with normal marked larvae and golden yellow oval cocoons.

MATERIALS AND METHODS

The silkworm breed AB5 was selected as an experimental tool. When reared in May-June 1988 along with other multivoltine germplasm stocks at CSRTI, Berhampore, some larvae of the 6-10 type (spots from the 6th to 10th segments) of multistar (Gamo, 1973) were found along with other varying numbers of star spots from the 6th to 10th segments in the population. Resultant moths of the 6-10 type

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

were inbred to have the next generation. Larvae were classified into 5 types on the basis of the number of pairs of star spots irrespective of the location from the 6th to 10th segments (Fig. 1).
1) The normal type (1-star spot type) had one pair of star spots on the 8th segment.
2) The 2-star spot type had one pair of star spots on any one segment from the 6th to the 10th in addition to one pair on the 8th.
3) The 3-star spot type showed 2 pairs of star spots on any two segments from the 6th to the 10th apart from one pair on the 8th.
4) The 4-star spot type exhibited 3 pairs of star spots on any 3 segments from the 6th to the 10th besides one pair on the 8th.
5) The 5-star spot type (6-10 type) displayed 4 pairs of star spots on 4 segments from the 6th to the 10th besides one pair on the 8th.

Fig. 1 : Larvae showing various types of multistar markings.

Fig. 1 : Larves présentant divers types de marquages en stars.

The numbers of 3-star spot and 5-star spot types were few in the population and hence 2-star spot and 3-star spot types were considered collectively for the study and likewise 4-star spot and 5-star spot types collectively, too. As a result, star spot types were grouped into 3, i.e 1st group with 1-star spot type (normal type), 2nd group with 2-star spot and 3-star spot types and 3rd group with 4-star spot and 5-star spot types. The resultant female and male moths of 5-star spot type were inbred every time to perpetuate the next generation. Ten disease-free layings (dfls) were brushed *en masse*. The rearing was carried out according to Krishnaswami (1978). On the 2nd day in the 5th instar larvae with the relevant marking patterns of each group were selected from the population of larvae with

varying numbers of star spot markings from the 6th to 10th segments. Each of the 3 groups had 3 replications with an equal number of of larvae which varied from 70-100 in the different rearing seasons studied. The remaining larvae including those with no star spot marking on either side of the segment (Fig. 2) were rejected. The experiment was repeated from the 1st to 4th generations during four rearing seasons, i.e. July-August 1988, September-October 1988, November-December 1988 and February 1989. The data were collected on fecundity, hatchability, larval period, larval weight, effective rate of rearing (ERR), cocoon weight, shell weight, shell ratio percentage and filament length, and subjected to an analysis of variance.

Fig. 2 : Larvae showing incomplete pairs of multistar markings.

Fig. 2 : Larves présentant des paires incomplètes de marquages multistars.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of various parameters in Table I revealed that when the mean data of larval marking patterns were considered, the normal marking was found to be significantly higher ($P < 0.05$) in respect of fecundity, larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length than the 4-5 star spot markings, however, it also showed signicantly higher ($P < 0.05$) values for cocoon weight and filament length than the 2-3 star markings. And when seasonwise data of the traits were taken into consideration, the normal marking was found to have significantly higher values ($P < 0.05$) for fecundity, shell weight and filament length than the 4-5 star spot markings in most of the seasons tested.

The present investigation indicated that when parents of 5-star spot type were inbred and the progeny was found to have varying numbers of star spots, the manifestation of a higher number of star spots on the larval body segments from the 6th to the 10th significantly reduced ($P < 0.05$) fecundity, larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length, while no decline could be observed in hatching percentage, ERR and shell ratio percentage. However, hatching percentage and

Table I. Data on various parameters of multistar marking patterns of larvae of *Bombyx mori* L.

Tableau I. Données sur divers paramètres en fonction du nombre de stars larvaires chez* Bombyx mori *L.

Character / *Caractère*	Marking pattern / *Type de marquage*	Jul.-Aug. 88 / *Juil.-août 88*	Sept.-Oct. 88 / *Sept.-oct. 88*	Nov.-Dec. 88 / *Nov.-déc. 88*	Jan.-Feb. 89 / *Janv.-fév. 89*	Mean of marking pattern / *Moyenne du type de marquage*	CD at 5 % / *CD à 5 %*
Fecundity (no.)	N	367	508	472	596	486	19*
Fécondité (nombre)	2-3	365	439	325	543	418	38+
	4-5	354	444	334	551	421	
Hatching %	N	88.12	87.08	95.43	96.97	92.50	1.79*
Eclosion (%)		(69.84)	(68.94)	(77.65)	(79.98)	(74.10)	
	2-3	95.37	90.52	96.44	96.87	95.05	
		(77.57)	(72.06)	(79.13)	(79.81)	(75.14)	3.58+
	4-5	96.64	76.63	94.62	96.85	92.61	
		(79.44)	(61.09)	(76.58)	(79.78)	(74.22)	
Larval period (days)	N	19.3	19.7	22.7	26.0	21.9	NS*
Durée larvaire (jours)	2-3	20.3	20.0	22.7	26.0	22.2	NS+
	4-5	19.7	19.7	23.0	26.0	22.1	
Weight of 10 mature	N	27.0	26.0	30.0	31.0	28.5	1.1*
larvae (g) / *Poids de*	2-3	24.5	24.0	30.7	31.2	27.67	NS+
10 larves matures (g)	4-5	25.5	25.0	28.7	28.0	26.8	26.8
ERR (%)	N	87.43	48.19	87.99	98.53	84.09	2.09*
Taux effectif		(69.27)	(43.96)	(69.72)	(83.03)	(66.49)	
d'élevage (%)	2-3	75.07	63.98	86.21	87.62	78.95	4.18+
		(60.04)	(53.12)	(68.20)	(69.40)	(62.69)	
	4-5	81.47	58.88	91.42	96.45	84.33	
		(64.51)	(50.12)	(72.96)	(79.14)	(66.68)	
Single cocoon	N	1.314	1.080	1.327	1.360	1.270	0.060*
weight (g) / *Poids*	2-3	1.164	1.020	1.313	1.240	1.184	NS+
d'un cocon (g)	4-5	1.100	0.841	1.260	1.243	1.111	
Single shell weight (g)	N	0.166	0.140	0.194	0.176	0.169	0.007*
Poids d'une coque (g)	2-3	0.161	0.133	0.190	0.173	0.164	0.013+
	4-5	0.161	0.098	0.176	0.157	0.148	
Shell ratio (%)	N	12.63	12.95	14.62	12.97	13.28	0.33*
Richesse soyeuse (%)		(20.82)	(21.09)	(22.48)	(21.11)	21.37)	
	2-3	13.83	13.02	14.44	13.95	13.80	0.66+
		(21.83)	(21.15)	(22.33)	(21.93)	(21.81)	
	4-5	14.60	11.69	14.00	12.69	13.22	
		(22.46)	(20.00)	(21.97)	(20.86)	(21.32)	
Filament length (m)	N	607	520	580	683	597	18*
Longueur du	2-3	510	498	554	480	510	36+
filament (m)	4-5	474	471	566	472	494	

N : Normal — **2-3** : 2-3 star spots / *2 à 3 marquages en stars.*
NS : Not significant / *Non significatif.* — **4-5** : 4-5 star spots / *4 à 5 marquages en stars.*
***** : CD at 5 % level between marking patterns / *Intervalle de confiance entre les marquages.*
+ : CD at 5 % level between season × marking patterns / *Intervalle de confiance entre saison × marquages.*
Figures in parentheses indicate arch sin transformed values.
Les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs transformées arc sin.

shell ratio percentage of the 2-3 star spot markings were significantly higher ($P < 0.05$) than those of normal and 4-5 star spot markings.

On the basis of the results obtained it seemed logical to assume that the characteristic of the manifestation of star spot markings appeared to be pleiotropic in nature, affecting metabolic activities which in turn influenced the said metric traits in the silkworm as patterns of the star spot marking had a relationship with physiological developmental disorders (Tazima, 1964).

The present investigation also revealed positive correlations between larval weight and cocoon weight, cocoon weight and shell weight, shell weight and filament length which were in conformity with the report of Jayaswal *et al.* (1990). It was also observed that the interaction effect between marking pattern and seasons was found to be significant ($P < 0.05$) for fecundity, hatching percentage, ERR, shell weight, shell ratio percentage and filament length, while Jayaswal *et al.* (1990) noted an insignificant difference with respect to shell weight, shell ratio percentage and filament length in some multivoltine hybrids and Sengupta (1969) reported an insignificant difference for shell ratio percentage in some bivoltine breeds.

ACKNOWLEDGEMENTS

Help rendered by Sri S. Das, SRA (Statistics), in analysing the data statistically is thankfully acknowledged.

REFERENCES

CHIKUSHI H. (1972) Genes and genetical stocks of the silkworm. Keigaka Publishing Company, Tokyo, Japan, p. 92.

DOIRA H. (1978) Genetic stocks of the silkworm. *In* The Silkworm : an Important Laboratory Tool. Ed. Y. Tazima, Kodansha Ltd., Tokyo, pp. 53-81.

GAMO T. (1973) Effects of incubation temperature during embryonic development upon the manifestation of multistar markings in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan. J. Genetics, 48(2), 137-145.

JAYASWAL K.P., DASH B.D., SEN S.K., SUBBA RAO G. (1990) Genotype × environment interaction for economic traits in hybrid combinations of silkworm, *Bombyx mori* L. Recent Trends in Sericulture, Dept. of Zoology, S.V. University, Tirupathi, pp. 103-116.

JAYASWAL .K.P., SINGH T., SEN S.K. (1990) Correlations between economic parameters and their application in silkworm breeding. Indian Silk, 29(2), 25-27.

KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSRTI Mysore Bull. no. 2, pp 23.

MURAKAMI A. (1989) Developmental genetics of E-pseudoallelic domain in *Bombyx mori*. 2. Developmental characteristics. Ann. Rep. Nat. Inst. Gen. Japan, 44, 60-62.

SENGUPTA K. (1969) An analysis of genotype-environment interaction in some races of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 8(1), 4-10.

TANAKA Y. (1927) Some remarks on symbols, multiple allelomorphism, crossing over and linkage groups in the silkworm. J. Dept. Agric., Kyushu Univ., 1, 275-279.

TANAKA Y. (1953) Genetics of the silkworm, *Bombyx mori*. *In* Advances in Genetics. Ed. M. Demirec, Academic Press. Inc. Publishers, New York, 5, 239-317.

TAZIMA Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logos Press. London, pp. 23-26.

YOKOYAMA T. (1959) Silkworm genetics illustrated. Japan Society for Promotion of Science, Tokyo, pp. 75-76.

EFFET DU NOMBRE DE STARS SUR LES CARACTERES QUANTITATIFS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

K.P. JAYASWAL, SUDIP KR. SEN & G. SUBBA RAO

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

Chez les descendants de parents consanguins ayant de 6 à 10 stars pour lesquels on observe un nombre variable de ces marquages larvaires, l'apparition d'un nombre élevé de marquages du 6e au 10e segment larvaire s'accompagne d'une diminution significative ($P < 0,05$) de la fécondité, du poids larvaire, du poids du cocon, du poids de la coque et de la longueur du filament mais n'affecte pas le taux d'éclosion, le taux effectif d'élevage et la richesse soyeuse. On observe des corrélations positives entre le poids larvaire et le poids du cocon, entre le poids du cocon et le poids de la coque, entre le poids de la coque et la longueur du filament. L'interaction entre la fréquence des marquages et les saisons est significative ($P < 0,05$) pour la fécondité, le taux d'éclosion, le taux effectif d'élevage, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament.

INTRODUCTION

Chez le ver à soie *Bombyx mori*, le marquage normal comporte trois types de taches : le masque sur le deuxième segment, les croissants ou lunules sur le 5e segment et les stars sur le 8e segment. On peut voir des stars multiformes, lorsqu'elles sont bien développées sur le tégument larvaire, sur chaque segment dorsal du 6e au 10e segment (Tanaka, 1958). Ce marquage est un caractère récessif simple par rapport au marquage normal (Tanaka, 1927). Cependant, le nombre de taches dépend de l'origine génétique et de la température d'incubation (Chikushi, 1972 ; Doira, 1978 ; Gamo, 1973). De même, le nombre et la position des lunules sont affectés par la température d'incubation et les gènes (Yokoyama, 1959). Murakami (1989) a observé une relation significative entre un nombre excessif ou trop faible de pattes abdominales et la mortalité embryonnaire sur la base de l'arrangement des stars et des lunules.

Aucune information n'étant disponible pour ce qui concerne l'effet de la présence de stars sur les caractères quantitatifs du ver à soie *Bombyx mori* L., cette étude a été entreprise afin de comprendre ce phénomène au cours de certaines saisons d'élevage chez AB5, souche polyvoltine isolée donnant des larves marquées normales et des cocons ovales jaune d'or.

MATERIELS ET METHODES

La souche de vers à soie AB5 a été choisie comme outil expérimental. Au cours de l'élevage de mai à juin 1988 qui comprenait d'autres souches polyvoltines de la banque génétique du Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore, on a observé certaines larves du type de marquage 6 à 10 (taches du 6e au 10e segment) (Gamo, 1973) dans la population. Les papillons issus de ces larves ont été accouplés afin d'obtenir une deuxième génération. Les larves ont été classées en 5 types sur la base du nombre de paires de stars quelle que soit leur position entre le 6e et le 10e segment (Fig. 1) :

1) le type normal (type 1) présente une paire de stars sur le 8e segment ;

2) le type 2 présente une paire de stars sur l'un des segments 6 à 10 en plus de la paire de stars sur le 8e segment ;

3) le type 3 présente 2 paires de stars sur deux des segments 6 à 10 en plus de la paire de stars sur le 8e segment ;

4) le type 4 présente 3 paires de stars sur 3 des segments 6 à 10 en plus de la paire sur le 8e segment ;

5) le type à 5 marquages (type 6 à 10) présente 4 paires de stars sur 4 des segments 6 à 10 en plus de la paire sur le 8e segment.

Il y a peu de larves des types 3 et 5 dans la population, les types 2 et 3 ont donc été considérés collectivement pour cette étude ainsi que les types 4 et 5. Les types de marquages ont été répartis en 3 groupes : 1er groupe avec un seul marquage (type normal), 2e groupe avec 2 et 3 paires de stars et 3e groupe avec 4 et 5 paires de stars. Les papillons mâles et femelles consanguins du type à 5 paires de stars ont été accouplés à chaque fois pour obtenir une nouvelle génération. Dix pontes saines ont été levées en masse. L'élevage a été réalisé d'après Krishnaswami (1978). Au 2e jour du 5e âge, les larves présentant le marquage approprié à chacun des groupes ont été séparées (marquages entre 6e et 10e segment). Chacun des 3 groupes comporte 3 réplicats composés d'un nombre égal de larves variant de 70 à 100 selon la saison d'élevage considérée. Les autres larves, y compris celles qui ne présentent aucun marquage en stars sur aucun des segments (Fig. 2), ont été éliminées. L'expérience a été répétée de la 1ère à la 4e génération pendant 4 saisons d'élevage : juillet-août 1988, septembre-octobre 1988, novembre-décembre 1988 et février 1989. Les données relevées portent sur la fécondité, le taux d'éclosion, la durée larvaire, le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament ; elles ont été soumises à une analyse de variance.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résulats concernant les différents paramètres présentés dans le tableau I montrent que, lorsque l'on considère la moyenne des données des marquages larvaires, le marquage normal est significativement supérieur ($P < 0,05$) pour ce qui concerne la fécondité, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur du filament aux marquages des types 4 et 5 ; il présente également des valeurs significativement supérieures ($P < 0,05$) pour le poids du cocon et la longueur du filament à celles des marquages des types 2 et 3. Du point de vue des saisons, le marquage normal donne des valeurs significativement supérieures ($P < 0,05$) pour la fécondité, le poids de la coque et la longueur du filament à celles des marquages des types 4 et 5 pour la plupart des saisons étudiées.

Cette étude indique que, chez la descendance de parents consanguins du type 5, lorsqu'elle présente des nombres variables de stars, la présence d'un nombre élevé de marquages en stars entre le 6e et le 10e segment larvaire entraîne un diminution significative ($P < 0,05$) de la fécondité, du poids larvaire, du poids du cocon, du poids de la coque et de la longueur du filament, mais n'affecte pas le taux d'éclosion, le taux effectif d'élevage et la richesse soyeuse. Cependant, le taux d'éclosion et la richesse soyeuse pour les marquages des types 2 et 3 sont signicativement supérieurs ($P < 0,05$) à ceux des marquages normal et des types 4 et 5.

Sur la base des résultats obtenus, il semble logique de penser que l'apparition de marquages en stars soit de nature pléiotrope, affectant les activités métaboliques qui, à leur tour, influent sur les caractères métriques considérés, les différents marquages étant en corrélés à des troubles du développement physiologique (Tazima, 1964).

Cette étude fait également apparaître des corrélations positives entre le poids larvaire et le poids du cocon, le poids du cocon et le poids de la coque, le poids de la coque et la longueur du filament, corrélations qui confirment les observations de Jayaswal et coll. (1990). On a également observé que l'interaction entre le marquage et la saison était significative ($P < 0,05$) pour la fécondité, le taux d'éclosion, le taux effectif d'élevage, la richesse soyeuse et la longueur du filament, contrairement à Jayaswal et coll. (1990) qui ont relevé une différence non significative pour ce qui concerne le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament chez certains hybrides polyvoltins et à Sengupta (1969) qui a observé une différence non significative pour la richesse soyeuse chez certaines souches bivoltines.

A MICROSPORIDIAN (*NOSEMA* SP.) INFECTING *THEOPHILA RELIGIOSAE* HELF. IS INFECTIOUS FOR THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

P. KUMAR & M.M. AHSAN

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, India.

Theophila religiosae *Helf. (Lepidoptera : Bombycidae), a pest of the mulberry, was found carrying microsporidian (Nosema sp.) infection by the authors. The present study was aimed to see whether the microsporidian of* ***T. religiosae*** *is infectious to the silkworm,* ***Bombyx mori*** *L. The results revealed that peroral contamination was successful and that the pathogen was transmitted by silkworms transovarially. The intensity of infection was observed to 91 % in the eggs laid by infected female moths. The morphological features of infected moths with the microsporidian of* ***T. religiosae*** *were found similar to that of* ***Nosema bombycis*** *Naegeli infected moths.*

Keywords : Microsporidian, *Theophila religiosae* Helf., *Bombyx mori* L., cross infection.

INTRODUCTION

Theophila religiosae Helf. (Lepidoptera : Bombycidae) inhabits the temperate Himalayan belts ranging from north-west Himalaya to Assam (Chowdhury, 1984 ; Hampson, 1892 ; Mukherjee, 1919). It is a pest of the mulberry in the hill region of Kalimpong (District Darjeeling), India. Though this pest is visible in mulberry fields from February to mid-December every year, it rapidly increases in number during February to April. *T. religiosae* have been found carrying microsporidian (*Nosema* sp.) infection by the authors. A number of other lepidopteran insects have been reported to be infected with microsporidian infection (Gaugler and Brook, 1975 ; Kudo, 1954 ; Steinhaus, 1967 ; Yokoyama, 1962). The *Nosema* sp. infecting *Hermorphila atrilineata* Butler and *Barathra brassicae* L. are also infective to *Bombyx mori* L. (Jolly, 1986). The microsporidian (*Nosema bombycis* Naegeli) infection of the silkworm, *B. mori*, is contagious to *Diacresia obliqua* West., a pest of the mulberry (Singh, 1978). Machay (1957) in his study undertaken in silk farms in Hungary has shown that 20 different lepidopterans were infected by *N. bombycis* without transovarial transmission. However, among several silk-producing lepidopteran insects, microsporidian infections have generally been found to be species-specific. The *Nosema* sp. infecting *Antheraea mylitta* D. has been found to be host-specific without cross-infecting other species of silkworm like *B. mori* and *Philosamia ricini* H., the reverse being also true (Sengupta, 1986). However, no studies have been made towards the cross-infectivity of microsporidian (*Nosema* sp.) infecting *T. religiosae* against *B. mori* and *N. bombycis* against *T. religiosae*.

Since both the species *T. religiosae* and *B. mori* are silk-producing insects belonging to a common lepidopteran family, i.e. Bombycidae, with certain morphological resemblances in their life cycle (Mukherjee, 1919) and common food, it was felt imperative to study the cross-infectivity of microsporidian in these two species. In this study, infectivity of *Nosema* sp. harbouring *T. religiosae* against *B. mori* has been ascertained.

MATERIALS AND METHODS

In the first experimental trial, the cocoons of *T. religiosae* were collected from the experimental mulberry field of Regional Sericultural Research Station, Kalimpong (West Bengal, India), and were kept in laboratory conditions (temperature 25 °C ± 1 °C and relative humidity 70-80 %). Ten cocoons of either sex in equal numbers were kept in a glass jar of 14.5 cm × 11.5 cm size. The glass jar was covered with a thin cotton net. After emergence, both male and female moths were examined microscopically at 600× magnification. The heads and wings of microsporidian moths were clipped and the remaining portions were crushed in a small quantity of distilled water and 0.5 % KOH and, after removal of the suspending macromaterial, centrifuged at 6000 rpm for two minutes. After centrifugal sedimentation, the supernatant was discarded. The residual portion was centrifuged twice more with fresh distilled water at 3000 rpm for two minutes and the suspension was prepared in distilled water. Since the life cycle of *N. bombycis* completes in 4-7 days (Steinhaus, 1963), it was felt imperative here to subject 5th stage disease-free layings of *B. mori* to the treatment. The suspension was thus smeared on fresh leaves of *Morus alba* L. and fed to first day larvae of 5th stage of *B. mori*. Treatment was replicated three times and 25 larvae were used in three replications. A parallel untreated control batch of 25 larvae in three replicates was also reared simultaneously which was fed on leaves of *Morus alba* sprayed with distilled water only. Rearing of both treated and untreated larvae was conducted as per the new technology of silkworm rearing (Krishnaswami, 1979). After the emergence, both male and female moths were examined microscopically for the detection of microsporidian infection.

Further, in order to study the transovarial transmission of microsporidian five sets of infected and mated female moths of treated lots and healthy female moths of control lots were kept for oviposition till 24 hrs. Egg laying behaviour was recorded in each female moth and all fertilized and unfertilized eggs were examined by applying the corrective test method (Jolly, 1986) for determining the intensity of microsporidian infection.

RESULTS AND DISCUSSION

It was observed that all the treated larvae spun cocoons and pupated. Similarly, Jolly (1986) also observed that larvae of *Bombyx mori*, when subjected to late stage contamination with *Nosema bombycis*, spun normal cocoons but deposited transovarially infested eggs. The microscopic examination of the treated batches revealed that the spores were somewhat oval in shape with a high refractive index and easily recognized at 600× magnification. The spores measure 4.13 ± 0.01 micron in length and 2.08 ± 0.01 micron in breadth with thicker spore wall and polar filament. All the emerged moths were infected with microsporidian and the intensity of infection was observed to the tune of 91 % in the eggs laid by infected female moths, which indicates the possibility of transovarial transmission. Further, in comparison to healthy moths of control lots, the infected female moths were deformed in shape with crumpled wings. Discoloration of scales on the abdomen, shedding of scales from the wings and body were also observed and the moths appeared dull (Fig. 1). Infected female moths also laid piled up eggs in comparison to normal eggs laid by healthy ones. These observations are very much in accordance with the observations made towards the pathogenicity of *Nosema pyraustae* Paillot against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hb. (Windels *et al.*, 1976) and *N. bombycis* against *B. mori* (Jolly, 1986).

From the above observations, it is very clear that *T. religiosae* being a mulberry pest also acts as a vector of microsporidian disease which is infectious to the silkworm, *B. mori*, like other insect pests which besides feeding on leaves act as vectors of disease-causing pathogens (Atwal *et al.*, 1970). But this microsporidian did not appear harmful against its primary host, i.e. *T. religiosae*. It may be due to the wild state of pest and host-parasite relationship as reported by Jameson (1922). Since wild insects are very resistant to their pathogens (Steinhaus, 1967), *T. religiosae* being a wild silk-producing insect may also acquire some sort of resistance against its microsporidian infection. Further, like other parasites the microsporidian of *T. religiosae* does not kill completely its primary host and thus maintains the host-parasite relationship.

Table I. Effect of feeding microsporidian spores (*Nosema* sp.) of *Theophila religiosae* Helf. to the silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau I. Effet du nourrissage du ver à soie Bombyx mori *L. avec des spores microsporidiennes (*Nosema *sp.) de* Theophila religiosae *Helf.*

Treatment	Replication	Number of *B. mori* larvae in 5th instar	Intensity of microsporidian infection in moths (%)	Intensity of microsporidian infection in eggs (%)
Traitement	*Réplicat*	*Nombre de larves de* B. mori *au 5e âge*	*Intensité de l'infestation microsporidienne chez les papillons (%)*	*Intensité de l'infestation microsporidienne chez les oeufs (%)*
Bombyx mori L.*	R_1	25	100.00	90.00
	R_2	25	100.00	92.00
	R_3	25	100.00	91.00
	Mean / *Moyenne*		100.00	91.00
Untreated control *Témoin non traité*	R_1 R_2 R_3	25	0.00	0.00

* *B. mori* larvae fed with microsporidian (*Nosema* sp.) of *Theophila religiosae* Helf.
* *Larves de B. mori nourries avec des microsporidies (*Nosema *sp.) de* Theophila religiosae *Helf.*

Fig. 1.

A. Moth of *Bombyx mori* L. infected with *Nosema* sp. of *Theophila religiosae* Helf.
B. Healthy moth of *Bombyx mori* L.

Fig. 1.

A. Papillon de Bombyx mori *L. infesté par* Nosema *sp., parasite de* Theophila religiosae *Helf.*
B. Papillon de Bombyx mori *L. sain.*

Cross-infectivity studies (Jolly, 1986 ; Sengupta, 1986) reveal that microsporidians infecting wild silkworms do not cross-infect domesticated silkworms. But in the present study, the microsporidian infecting the wild silkworm, *T. religiosae*, has been found to be infectious to the domesticated mulberry silkworm, *B. mori*. This may be due to the fact that both species belong to a common lepidopteran family, i.e. Bombycidae, with certain morphological resemblances to each other and feed on mulberry leaves. Further, relatively few lepidopteran insects have been found to transmit microsporidians of other lepidopteran insects transovarially (Windels *et al.*, 1976). The present findings reveal that *B. mori* transmits the microsporidian of *T. religiosae* both perorally and transovarially.

As this transmission is associated to abnormalities in the size and shape of infected moths and in egg laying behaviour, care should be taken to avoid the chance of mulberry field infestation with pests like *T. religiosae*. Studies on the cross-infectivity of *N. bombycis* of *B. mori* to *T. religiosae* are in progress at Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, to find out the relation, if any, between the microsporidians of *B. mori* and *T. religiosae*.

REFERENCES

AIWAL A.S., SINGH B. (1990) Pest population and assessment of crop losses. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, p. 81.

CHOWDHURY S.N. (1984) Mulberry silk industry. Shillong, India, pp. 34-36 and 124.

GAUGLER R.R., BROOK W.M. (1975) Sub-lethal effects of *Nosema heliothidis* in the corn earworm, *Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol., 26, 56-63.

HAMPSON G.F. (1892) The fauna of British India including Ceylon and Burma, Moths. Dr W. Junk b.b; Publishers, The Hague, 1, 37.

JAMESON A.P. (1922) Report on the diseases of silkworm in India. Superintendent Government Printing, Calcutta, India, p. 181.

JOLLY M.S. (1986) Pebrine and its control. Bull. no. 5, CSRTI, Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 2-4 and 10.

KRISHNASWAMI S. (1979) New technology of silkworm rearing. Bulletin no. 2, CSRTI Mysore, India.

KUDO R.R. (1954) Protozoology. 4th ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, p. 670.

MACHAY M.L. (1957) Occurrence of *Nosema bombycis* Naegeli among wild lepidopterans. Folin Entomol. Hungarica, 10, 359-363.

MUKHERJEE N.G. (1919) Handbook of Sericulture. Publ. Bengal Secretariate Book Depot, Calcutta, India, pp. 153-155.

SENGUPTA K. (1986) Lectures on Sericulture. Suramya Publishers, Bangalore, India, p. 181.

SINGH K. (1978) Some preliminary observations on the cross infectivity of polyhedrosis (Borrelina virus) and microsporidiosis (*Nosema bombycis* Naeg.) between silkworm, *Bombyx mori* L., and Bihar hairy caterpillar, *Diacresia obliquo* W. Indian J. Seric., 17, 66-68.

STEINHAUS E.A. (1963) Insect pathology, an advanced treatise. Academic Press Inc., New York and London, p. 395.

STEINHAUS E.A. (1967) Principles of insect pathology. Facsimile edition of 1st ed., McGraw Hill Book Company Inc., USA, pp. 447, 449, 599.

WINDELS B.M., CHIANG H.C., FURGALA B. (1976) Effects of *Nosema pyrausta* on pupal and adult stages of the European corn borer, *Ostrinia nublialis*. J. Invertebr. Pathol., 27, 239-242.

YOKOYAMA T. (1962) Synthesized Science of Sericulture. Published by Central Silk Board, Bombay, India, p. 194.

UN MICROSPORIDIEN (*NOSEMA* SP.) PARASITE DE *THEOPHILA RELIGIOSAE* HELF. INFESTE LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

P. KUMAR & M.M. AHSAN

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, Inde.

Les auteurs ont observé que ***Theophila religiosae*** *Helf. (Lepidoptera : Bombycidae), parasite du mûrier, était atteint d'une infestation microsporidienne (****Nosema*** *sp.). Cette étude vise à déterminer si le microsporidien de* ***T. religiosae*** *infeste le ver à soie* ***Bombyx mori*** *L. Les résultats obtenus révèlent que la contamination orale est possible et que l'agent pathogène se transmet par voie ovarienne chez le ver à soie. L'intensité de l'infestation est de 91 % chez les oeufs pondus par des papillons femelles infestés. Les caractères morphologiques des papillons infestés par le microsporidien de* ***T. religiosae*** *sont comparables à ceux des papillons infestés par* ***Nosema bombycis*** *Naegeli.*

INTRODUCTION

Theophila religiosae Helf. (Lepidoptera : Bombycidae) habite les ceintures himalayennes tempérées du nord-ouest de l'Himalaya à l'Assam (Chowdhury, 1984 ; Hampson, 1892 ; Mukherjee, 1919). C'est un parasite du mûrier dans les collines de Kalimpong (District de Darjeeling, Inde). Bien que ce parasite soit visible dans les plantations de février à mi-décembre, sa population augmente rapidement de février à avril. Les auteurs ont observé que *T. religiosae* était atteint d'une infestation microsporidienne (*Nosema* sp.) Un certain nombre d'autres insectes lépidoptères sont porteurs d'infestations microsporidiennes (Gaugler et Brook, 1975 ; Kudo, 1954 ; Steinhaus, 1967 ; Yokoyama, 1962). Les espèces de *Nosema* infestant *Hermorphila atrilineata* Butler et *Barathra brassicae* L. sont également infectieuses pour *Bombyx mori* L. (Jolly, 1986). L'infestation microsporidienne (*Nosema bombycis* Naegeli) du ver à soie *B. mori* est contagieuse pour *Diacresia obliqua* West., un parasite du mûrier (Singh, 1978). Machay (1957), dans une étude réalisée dans des fermes de Hongrie, a montré que 20 lépidoptères différents peuvent être infestés par *N. bombycis* sans transmission transovarienne. Cependant, les infestations microsporidiennes des divers insectes lépidoptères sériciqènes sont spécifiques de l'espèce. On a observé que l'espèce de *Nosema* sp. infestant *Antheraea mylitta* D. était spécifique de son hôte et n'infestait pas les autres espèces de vers à soie comme *B. mori* et *Philosamia ricini* H., l'inverse étant également vrai (Sengupta, 1986). Cependant, aucune étude n'a été faite sur l'infestabilité croisée du microsporidien (*Nosema* sp.) parasitant *T. religiosae* avec *B. mori* et de *N. bombycis* avec *T. religiosae*.

Les espèces *T. religiosae* et *B. mori* étant toutes deux des espèces sériciqènes appartenant à la même famille de lépidoptères, les bombycidés, avec certaines ressemblances morphologiques au cours de leur cycle vital (Mukherjee, 1919) et la même nourriture, on a jugé indispensable d'étudier l'infestabilité croisée du microsporidien chez ces deux espèces. Dans cette étude, on a déterminé l'infestabilité de l'espèce *Nosema* sp. parasitant *T. religiosae* pour *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Dans un premier test, les cocons de *T. religiosae* ont été prélevés dans la plantation expérimentale de mûrier de la Regional Sericultural Research Station de Kalimpong (Bengale occidental, Inde) et conservés en laboratoire (température : 25 °C ± 1 °C, humidité relative : 70 à 80 %). Dix cocons des deux sexes en nombre égal ont été placés dans un bocal d'une taille de 14,5 cm × 11,5 cm. Le bocal a été recouvert d'un filet en coton fin. Après l'émergence, les papillons mâles et femelles ont été examinés au microscope (grossissement 600 fois). Les têtes et les ailes des papillons infestés de microsporidiens ont été sectionnées et les parties restantes ont été broyées dans une petite quantité d'eau distillée et de KOH à 0,5 % et centrifugées à 6 000 tours/minute après élimination du matériel en suspension. Après sédimentation, le surnageant a été éliminé. Le résidu a été à nouveau centrifugé deux fois à 3 000 tours/minute pendant deux minutes dans de l'eau distillée et resuspendu dans de l'eau distillée. *N. bombycis* terminant son cycle en 4 à 7 jours (Steinhaus, 1963), on a jugé nécessaire de soumettre au traitement des larves de *B. mori* du 5e âge issues de pontes saines. La suspension a donc été appliquée sur des feuilles fraîches de *Morus alba* L. données comme aliment aux larves du 1er jour du 5e âge. Le traitement a été répété trois fois et 25 larves ont été utilisées pour chaque réplication. En parallèle, on a élevé un lot témoin de 25 larves réparties en trois réplications et nourries avec des feuilles de *Morus alba* traitées à l'eau distillée. L'élevage des larves traitées et non traitées a été réalisé selon la nouvelle technologie d'élevage du ver à soie (Krishnaswami, 1979). Après l'émergence, les papillons mâles et femelles ont été examinés au microscope afin de détecter la présence des microsopridiens.

Par ailleurs, afin de déterminer la transmission transovarienne des microsporidiens, cinq lots de papillons femelles infestés et accouplés et des papillons femelles sains des lots non traités ont été maintenus pendant 24 heures pour permettre l'oviposition. Le comportement de ponte a été relevé pour chaque femelle et les oeufs fécondés et non fécondés ont été examinés en appliquant le test de correction (Jolly, 1986) afin de déterminer l'intensité de l'infestation microsporidienne.

RESULTATS ET DISCUSSION

Toutes les larves traitées filent leur cocon et se transforment en chrysalides. Jolly (1986) a également observé que les larves de *Bombyx mori*, lorsqu'elles sont infestées au dernier stade larvaire par *Nosema bombycis*, filaient des cocons normaux mais pondaient des oeufs infestés. L'examen des lots traités au microscope révèle que les spores sont plus ou moins ovales avec un indice de réfraction élevé et sont facilement reconnaissables lorsqu'elles sont grossies 600 fois. Les spores mesurent 4,13 × 0,01 microns de long et 2,08 × 0,01 microns de large, elles ont une paroi et un filament polaire plus épais. Tous les papillons émergés sont infestés par les microsporidiens et l'intensité d'infestation est de l'ordre de 91 % chez les oeufs pondus par les papillons femelles infestés, ce qui suggère la possibilité d'une infestation transovarienne. De plus, par rapport aux papillons sains des lots témoins, les papillons femelles infestés présentent des anomalies corporelles avec des ailes recroquevillées. On observe également une décoloration des écailles abdominales et la chute des écailles alaires et corporelles, les papillons sont flasques (Fig. 1). Les papillons femelles infestés pondent leurs oeufs en les empilant contrairement aux papillons sains pondant leurs oeufs normalement. Ces observations concordent tout à fait avec les observations portant sur la pathogénicité de *Nosema pyraustae* Paillot pour l'insecte térébrant d'Europe *Ostrinia nubilalis* Hb. (Windels et coll., 1976) et sur celle de *N. bombycis* pour *B. mori* (Jolly, 1986).

Des observations décrites ci-dessus, il ressort que, *T. religiosae* étant un parasite du mûrier, il agit comme vecteur de maladie microsporidienne transmissible au ver à soie *B. mori*, de la même façon que d'autres insectes parasites se nourrissent de feuilles de mûrier et agissent en vecteurs d'agents pathogènes (Atwal et coll., 1970). Ce microsporidien n'est cependant pas nuisible pour son hôte primaire, *T. religiosae*. Ceci pourrait être dû à l'état non domestique du parasite et à la relation hôte-parasite, comme l'a observé Jameson (1922) : les insectes sauvages sont très résistants à leurs agents pathogènes (Steinhaus, 1967) et *T. religiosae* étant un sériciègne sauvage, il pourrait acquérir également une forme de résistance à son infestation microsporidienne. De plus, comme d'autres

parasites, le microsporidien de *T. religiosae* ne tue pas son hôte primaire et préserve ainsi la relation hôte-parasite.

Des études sur l'infestabilité croisée (Jolly, 1986 ; Sengupta, 1986) ont montré que les microsporidiens infestant les séricigènes sauvages n'infestent pas les vers à soie domestiques. Toutefois, dans cette étude, on a observé que le microsporidien infestant le séricigène sauvage *T. religiosae* infestait le ver à soie du mûrier domestique *B. mori*. Ceci pourrait être dû au fait que les deux espèces appartiennent à une même famille de lépidoptères, les bombycidés, présentant des ressemblances morphologiques et et alimentaires. De plus, relativement peu d'insectes lépidoptères transmettent des microsporidiens d'autres espèces lépidoptères par voie transovarienne (Windels et coll., 1976). Les résultats décrits ici révèlent que *B. mori* transmet le microsporidien de *T. religiosae* aussi bien par voie orale que par voie transovarienne.

Cette transmission étant associée à des anomalies de la taille et de la forme des papillons infestés et du comportement de ponte, il serait nécessaire d'éviter les risques d'infestation des champs de mûrier par des parasites tels que *T. religiosae*. Des études sur l'infestabilité croisée de *N. bombycis* de *B. mori* pour *T. religiosae* sont en cours à la Regional Sericultural Research Station de Kalimpong pour déterminer la relation éventuelle entre les microsporidiens de *B. mori* et ceux de *T. religiosae*.

1-TRIACONTANOL - A VALUABLE BYPRODUCT OF ERI SILK INDUSTRY

P.G. DEO, S.B. HASAN & B. RAJANIKANTH

Discipline of Infestation Control & Protectants, Central Food Technological Research Institute, Mysore - 570 013, India.

*1-triacontanol (TRIA), a naturally occurring plant growth regulator, was extracted from the larval exuviae of the eri silkworm, **Samia cynthia ricini** (Jones), using simple chemical procedures. The TRIA obtained was 90 % pure. Assuming the cost of TRIA as Rs 500 per gram, the additional income which an eri silk industry can get by the sale of TRIA was worked out. This income was found to be about seven times more than what an industry earns by the sale of cocoons and yarn. Since TRIA is extracted from the larval exuviae the normal silk production is not disturbed.*

Keywords : Eri silkworm, larval exuviae, cocoon weight, 1-triacontanol.

TRIA was first identified in 1933 by Chibnall *et al.* as a natural component of plants. It is a C^{30} straight chain monohydric alcohol having the structure $CH_3.(CH_2)_{28}.CH_2.OH$. It is present in microquantities as an ester, predominently in the epicuticular waxes of many plant species such as alfalfa (Chibnall *et al.*, 1933), grape (*Vitis vinifera*) (Eglinton and Hamilton, 1967), blueberry (*Vaccinium ashei*) (Freeman *et al.*, 1979), *Croton californicus* (Luzbetak *et al.*, 1978), rye (*Secale cereale*) (Tulloch and Hoffman, 1974), phytic nut (*Jatropha curcas*) (Hufford and Oguntimcin, 1978) and wheat (Tulloch and Hoffman, 1973). Most agronomic and horticultural crop species have shown pronounced effects on plant growth, crop yield and several other physiological processes in plants following the application of microquantities of exogenously applied TRIA (Ries, 1985).

After the discovery that naturally occurring TRIA stimulated plant growth (Ries *et al.*, 1977), several researchers have developed different procedures for the synthesis of TRIA (Welebir, 1979 ; Rao *et al.*, 1981 ; Hunter *et al.*, 1981 ; Maruyama *et al.*, 1980 ; Gibson, 1982). The approach in most cases has been to obtain 30 C carboxylic acid which was then reduced to obtain TRIA. Prepared synthetically or extracted from plants, it is often difficult to get good yields of pure TRIA and the TRIA thus obtained is very costly.

Bowers and Thompson (1965) reported that the larvae of the eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Jones), exuded a white powder on their cuticle. 92 % of this powder was found to be a mixture of 99.4 % TRIA and 0.6 % n-octacosanol. This report provided the basis for our present work. We now report that large quantities of pure TRIA can be produced from eri silkworms using very simple chemical procedures and without disturbing the normal silk production.

We procured the disease-free layings (dfls) from Jorhat (Assam), the home of eri silk industry in India, and we are now rearing this insect in our laboratory on castor leaves (*Ricinus communis*). For the extraction of TRIA, exuviae from 3rd, 4th and 5th instar larvae were collected. These were extracted with benzene and the benzene extract was dried on a flash evaporator. The residue was repeatedly washed with methanol to remove soluble impurities and colouring matter. The washed material was dissolved in 5 ml of hexane and placed on a floricil column (1 × 12 cm) and eluted with 25 ml each of 15 % and 25 % hexane in diethyl ether and 25 ml of methanol. The solvents were removed *in vacuo* and the residue dissolved in benzene. Recrystallization from benzene gave a 90 % pure TRIA (Fig. 1). The retention times of our TRIA and Aldrich TRIA sample were identical.

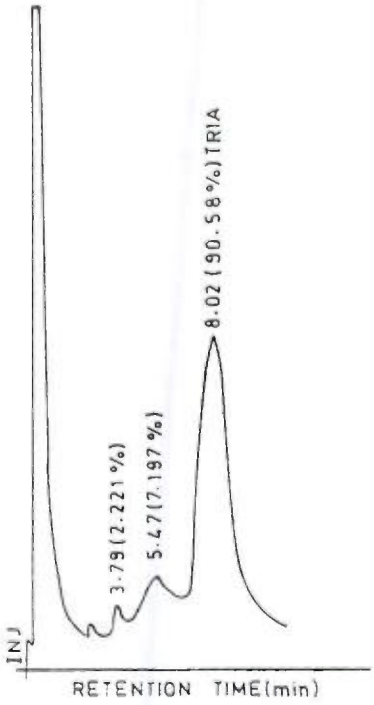
Benzene extracts from the larval exuviae of *Bombyx mori* (both multivoltine and bivoltine) did not show the presence of TRIA.

Fig. 1 : Gaz chromatogram of a TRIA sample extracted from the larval exuviae of eri silkworms.

A Hewlett Packard 5730 gas chromatograph with a 3380 integrator and equipped with an FID detector was used. **Operating conditions** : carried gas (nitrogen) flow 30 ml/min. **Temperature in °C** : injector 300, detector 350 and column 300 (isothermal). **Column** : stainless steel 6 ft × 1/8" packed with 10 % OV 101, 80-100 mesh, on chromosorb W.

Fig. 1 : Chromatogramme en phase gazeuse d'un échantillon de TRIA extrait d'exuvies larvaires de vers à soie eri.

*On a utilisé un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5730 comportant un intégrateur 3380 et équipé d'un détecteur FID. **Conditions de fonctionnement** : Flux de gaz (azote) transporteur à 30 ml/minute. **Température en °C** : injecteur 300, détecteur 350 et colonne 300 (isothermique). **Colonne :** acier inoxydable de 6 pieds × 1/8" remplie avec OV 101 à 10 %, 80-10 mesh sur chromosorb W.*



As per the data published by the Central Silk Board (Bangalore, India) (Sarkar, 1988), from a half-acre castor cultivation 347 lbs of cocoon weight can be raised which will give a net income of Rs 2,700/-. Our work on the extraction of TRIA from larval exuviae has indicated that 1 g (or a little more) TRIA can be obtained from the exuviae of 2,500 larvae. Similarly, it was observed that the weight of 100 fresh cocoons was 165 g. Thus, the number of cocoons corresponding to 347 lbs cocoon weight will be 95,267. This number of larvae (since the number of larvae = the number of cocoons) will give 38.1 g of 90 % pure TRIA. Assuming the cost of our TRIA as low as Rs 500/- per gram, the income from 38 g will be Rs 19,000/-. This is about seven times more than what an eri silk industry can earn from the sale of cocoons and yarn. This is an additional income because, while extracting TRIA from the larval exuviae, the normal silk production is not disturbed. The information provided in the present work should be immensely useful for the eri silk industry which is not flourishing well because the eri silk is not a very good quality silk.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to Dr D. Rajagopal Rao, Deputy Director, CFTRI, Mysore, for his keen interest in the work.

REFERENCES

BOWERS W.S., THOMPSON M.J. (1965) Identification of the major constituents of the crystalline powder covering the larval cuticle of *Samia cynthia ricini*. J. Inst. Physiol., 11, 1003-1011.

CHIBNALL A.C., WILLIAMS E.F., LATNER A.L., PIPER S.H. (1933) The isolation of n-triacontanol from lucerne wax. Biochem. J., 27, 1885-1888.

EGLINTON G., HAMILTON R.J. (1967) Leaf epicuticular waxes. Science, 156, 1322-1335.

FREEMAN B., ALBRIGA L.G., BIGGS R.H. (1979) Cuticular waxes of developing leaves and fruits of blueberry, *Vaccinnium ahsei* Reade cv. *Bhigum*. J. Am. Soc. Hortic. Soc., 104, 801.

GIBSON T. (1982) Hydrozirconation/oxidation of internal olefins. A simple synthesis of triacontanol. Tetrahedron Lett., 23, 157-158.

HUFFORD C.D., OGUNTIMCIN B.O. (1978) Non-polar constituents of *Jatropha curcas*. Lloydia, 41, 161-165.

HUNTER N.R., CHARLTON J.L., GREEN N.A. (1981) The synthesis of triacontanol, sodium triacontyl sulphate and dihydrogen triacontyl phosphate. Org. Prep. Proc. Int., 13, 19-22.

LUZBETAK D.J., TORRANCE S.J., HOFFMAN J.J., COLE J.R. (1978) Isolation of levo-hard wickeiic acid and 1-triacontanol from *Croton californicus*. J. Nat. Prod., 42, 317-318.

MARUYAMA K., TERADA K., YAMAMOTO Y. (1980) Synthesis of triacontanol via metathesis-hydroboration-isomerization-oxidation. J. Org. Chem., 45, 737-738.

RAO A.V.R., DESHMUKH M.N., KAMALAM M. (1981) A convenient 9-step synthesis of 1-triacontanol. Tetrahedron, 33, 227-230.

RIES S.K. (1985) Regulation of plant growth with triacontanol. Critical reviews in Plant Sciences, 2, 239-385.

RIES S.K., WERT V.F., SWEELEY C.C., LEAVITT R.A. (1977) Triacontanol : A new naturally occurring plant growth regulator, 195, 1339-1341.

SARKAR D.C. (1988) Eri culture in India. Publ. by Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 45.

TULLOCH A.P., HOFFMAN L.L. (1973) Leaf wax of *Triticum aestivum*. Phytochemistry, 12, 2217-2223.

TULLOCH A.P., HOFFMAN L.L. (1974) Epicuticular waxes of *Secale cereale* and *Triticale hexaploid leaves. Phytochemistry, 13, 2535-3540.*

WELEBIR A.J. (1979) Preparation of long-chain carboxylic acids and alcohols. US Patent 4, 167, 641.

LE 1-TRIACONTANOL, UN SOUS-PRODUIT RENTABLE DE L'INDUSTRIE DE LA SOIE ERI

P.G. DEO, S.B. HASAN & B. RAJANIKANTH

Discipline of Infestation Control and Protectants, Central Food Technological Research Institute, Mysore - 570 013, Inde.

Le 1-triacontanol (TRIA), régulateur de croissance naturel des végétaux, a été extrait de téguments larvaires du ver à soie eri ***Samia cynthia ricini*** *(Jones) en utilisant des protocoles chimiques simples. Le TRIA obtenu est pur à 90 %. Sur la base d'un prix de 500 roupies par gramme de TRIA, on a déterminé le revenu apporté à l'industrie eri par la vente du TRIA. Ce revenu est environ 7 fois supérieur au revenu apporté par la vente de cocons et de fils de soie. Le TRIA étant extrait d'exuvies larvaires, la production normale de soie n'est pas affectée.*

Le TRIA a été identifié pour la première fois en 1933 par Chibnall et coll. comme composant naturel des végétaux. Il s'agit d'une chaîne alcool monohydrique C^{30} dont la structure est $CH_3.(CH_2)_{28}.CH_2.OH$, présent en microquantités sous forme d'ester, principalement dans les cires épicuticulaires d'un grand nombre d'espèces végétales comme la luzerne (Chibnall et coll., 1933), le raisin (*Vitis vinifera*) (Eglinton et Hamilton, 1967), la myrtille (*Vaccinium ashei*) (Freeman et coll., 1979), *Croton californicus* (Luztebak et coll., 1978), le seigle (*Secale cereale*) (Tulloch et Hoffman, 1974), la noix phytique (*Jatropha curcas*) (Hufford et Oguntimcin, 1978) et le blé (Tulloch et Hoffman, 1973). La plupart des espèces culturales agricoles et horticoles présentent des effets marqués sur la croissance, le rendement, et plusieurs autres processus physiologiques après application exogène de microquantités de TRIA (Ries, 1985).

La découverte que le TRIA stimulait la croissance des plantes (Ries et coll., 1977) a incité plusieurs chercheurs à mettre au point différentes méthodes de synthèse du TRIA (Welebir, 1979 ; Rao et coll., 1981 ; Hunter et coll., 1981 ; Maruyama et coll., 1980 ; Gibson, 1982). L'approche choisie dans la plupart des cas a été d'obtenir de l'acide carboxylique en C^{30} et de le réduire pour produire du TRIA. Préparé synthétiquement ou extrait des plantes, il est souvent difficile d'obtenir de bons rendements en TRIA pur et le TRIA ainsi obtenu est onéreux.

Bowers et Thompson (1965) ont observé que les larves du ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* (Jones) exsudaient une poudre blanche sur la cuticule. Cette poudre est composée à 92 % d'un mélange de TRIA à 99,4 % et de n-octacosanol à 0,6 %. Cette observation a servi de base pour la présente étude. Nous démontrons ici que l'on peut produire d'importantes quantités de TRIA pur à partir de vers à soie eri en utilisant des protocoles chimiques simples sans que cela affecte la production normale de soie.

Nous nous sommes procurés des pontes saines à Jorhat (Assam), le berceau de l'industrie séricicole eri en Inde, et nous élevons à présent cet insecte en laboratoire sur des feuilles de ricin (*Ricinus communis*). Pour l'extraction du TRIA, on a traité des exuvies de larves du 3e, du 4e et du 5e âge avec du benzène, puis séché l'extrait de benzène dans un évaporateur à détente. Le résidu a été lavé à plusieurs reprises dans du méthanol pour éliminer les impuretés et la coloration. Le matériel lavé a été dissous dans 5 ml d'hexane, placé sur une colonne floricil (1 × 12 cm) et élué avec 25 ml d'hexane à 15 %, puis 25 ml à 25 % dans l'éther diéthylique et 25 ml d'éthanol. Les solvants ont été éliminés sous vide et les résidus dissous dans du benzène. La recristallisation à partir du benzène

donne un TRIA pur à 90 % (Fig. 1). Les durées de rétention du TRIA ainsi obtenu et de l'échantillon de TRIA Aldrich sont identiques. Les extraits de benzène des exuvies larvaires de *Bombyx mori* (aussi bien polyvoltin que bivoltin) se révèlent exempts de TRIA.

D'après les données publiées par le Central Silk Board (Bangalore, Inde) (Sarkar, 1988), 347 livres de cocons peuvent être obtenues à partir d'une plantation de ricin d'un demi-acre, ce qui donne un revenu net de 2 700 roupies. Nos travaux sur l'extraction de TRIA à partir de téguments larvaires indiquent que l'on peut obtenir 1 g (ou un peu plus) de TRIA à partir de 2 500 larves. Par ailleurs, il a été observé que le poids de 100 cocons frais est de 165 g, le nombre de cocons correspondant à 347 livres en termes de poids sera de 95 267. Ce nombre de larves (le nombre de larves étant égal au nombre de cocons) donnera 38,1 g de TRIA pur à 90 %. Pour un prix de 500 roupies par gramme de TRIA obtenu par cette méthode, 38 g rapporteront 19 000 roupies, soit sept fois plus que le revenu engendré par la vente de cocons et de fils de soie. Il s'agit d'un revenu complémentaire car l'extraction de TRIA à partir de téguments larvaires n'affecte pas la production normale de soie. Les informations présentées ici seront extrêment utiles à l'industrie de la soie eri, normalement peu rentable en raison de la mauvaise qualité de la soie eri.

EFFECT OF SOURCE AND LEVELS OF NITROGEN ON MULBERRY, AN ECONOMIC EVALUATION

L. RAJANNA[1]*& S.B. DANDIN[2]

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

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

A field experiment was carried out on irrigated mulberry to work out the economics of sericulture basing on the production cost of leaf and cocoons as influenced by different sources and levels of nitrogen. The perusal of the data indicates that urea supergranule recorded the cultivation cost of Rs. 21,839/ha/year at the lowest production cost of leaf (Re. 0.59/kg) with maximum cocoon production (1,613 kg/ha/year) in turn generating a highest net income of Rs. 46,149/ha/year, an increase of 30 % income as compared to conventional urea application (Rs. 35,516/ha/year). A moderate cost of leaf was recorded with cacium ammonium nitrate (CAN) with the cocoon production of 1,449 kg/ha/year at a net income of Rs. 37,836/ha/year, an increase of 7 % income over urea. The lowest cost of cultivation (Rs. 20,576/ha/year) with the highest production cost of leaf (Re. 0.77/kg) was found with urea alone. Increased nitrogen level (450 kg N/ha/year) decreased the cost of production of leaf (Re. 0.62/kg) resulting in a maximum cocoon production (1,617 kg/ha/year) by generating the highest net income of Rs. 45,365/ha/year, which is about 28 % more as compared to 300 kg N/ha/year (Re. 0.69/kg, Rs. 35,333/ha/year). The highest production cost of leaf (Re. 0.81/kg), lower cocoon production (1,138 kg/ha/year) in turn lower net income (Rs. 24,503/ha/year) were recorded at 150 kg N/ha/year, which is about 30 % less as compared to 300 kg N/ha/year.

Keywords : Sericulture economics, fertilizer application, leaf yield.

INTRODUCTION

A higher cocoon yield over a unit area is the final motive of every sericulturist and is mainly dependent on the quantity of leaf harvested. Hence it becomes imperative to increase the leaf productivity to brush a higher number of layings and, in turn, reap more cocoons. To increase leaf productivity, different sources and levels of nitrogen have been tried on irrigated mulberry over a period of two years to work out the economics of sericulture so as to evaluate a suitable source of nitrogenous fertilizer with a right dose of application.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was conducted on irrigated mulberries at Regional Sericultural Research Station (Bangalore, India) in red sandy-loam soil of pH 6.2. Economics of cocoon production as influenced by different sources and levels of nitrogen was worked out basing on the observations made for two years. Eighteen treatment combinations in split plot design with four replications were

---

* Part of the PhD thesis by the first author submitted to the University of Mysore.

studied during 1986-88, to evaluate the best source and economic dose of nitrogen. The treatment consisted of urea, urea supergranule (USG), neem cake blended urea (NCBU) (prepared indigenously by mixing 100 kg urea + 30 kg neem cake powder + 1 kg coal tar + 2 liters of kerosene), calcium ammonium nitrate (CAN), urea and calcium (equivalent to the weight of calcium present in calcium ammonium nitrate) all with phosphorus and potassium 120 kg each/ha/year and urea alone. Three different levels of nitrogen, i.e. 150, 300, 450 kg N/ha/year, were considered. A common dose of 10 tons of farmyard manure/ha/year was applied. The popular Kanva-2 (M_5) variety of mulberry was planted at a spacing of 60 × 60 cm. Uniform irrigation was provided once in 10 days. Treatments were imposed after one year of establishment of plantation. Five crops per year were harvested by shoot harvest method for a period of two years. Three rearing trials were conducted, synchronising three leaf harvests during October-November (winter), February-March (summer) and July-August (rainy season). A popular commercial cross breed race, Pure Mysore × NB_{18}, was reared in cellular beds with four replications for each treatment by following the standard rearing techniques as recommended by Krishnaswamy (1986). Sericulture economics was worked out for cost of cultivation, production cost of leaf, cocoon production, gross income and net income for one hectare, for each treatment, as represented in Table I and Fig. 1.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of different sources of nitrogen on the mean leaf yield clearly indicates the superiority of urea supergranule with a minimum cost of Re. 0.59/kg with the highest production of leaf of 36,815 kg/ha/year. Calcium ammonium nitrate ranks second with a production of 33,106 kg/ha/year at a cost of Re. 0.68/kg of leaf. Though the production cost of leaf in urea is on a par with CAN, leaf yield was less by 4 % in urea as compared to CAN.

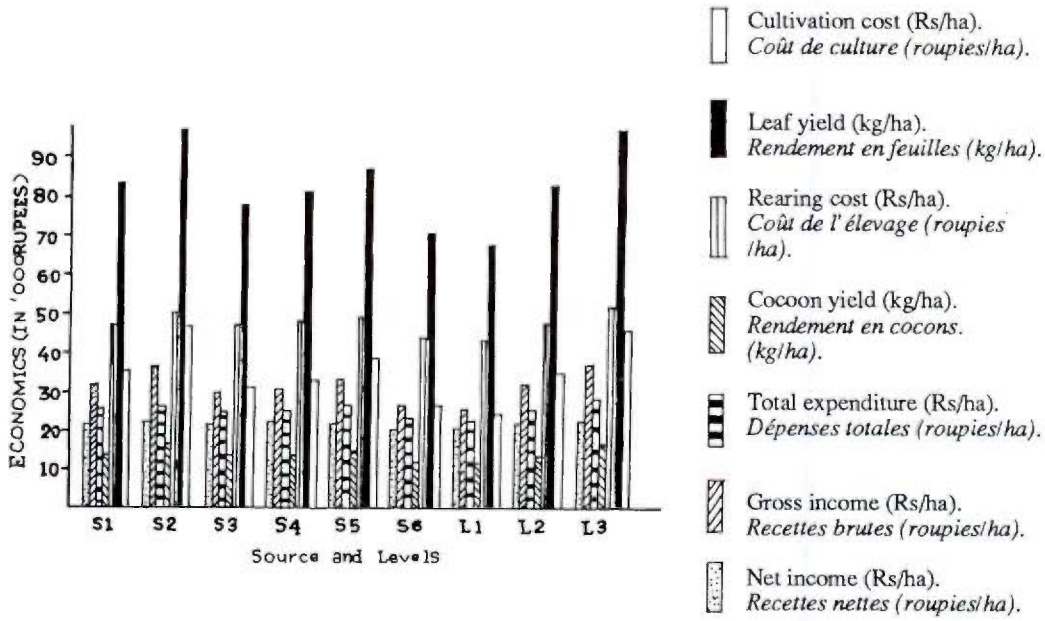


Fig. 1 : Sericulture economics as influenced by sources and levels of nitrogen.

Fig. 1 : Rentabilité de la sériciculture en fonction des sources et des niveaux d'azote.

Table I : Sericulture economics as influenced by sources and levels of nitrogen (N).

Tableau I : Rentabilité de la sériciculture en fonction des sources et des niveaux d'azote (N).

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	L1	L2	L3
Mulberry cultivation (Rs./ha) *Culture du mûrier (roupies/ha)*	21704	21839	21972	22857	22371	20576	20968	21887	22805
Leaf yield (kg/ha) *Rendement en feuilles (kg/ha)*	31720	36875	29921	30976	33105	26875	26043	31709	36985
Rearing cost (Rs./ha) *Coût de l'élevage (roupies/ha)*	25940	26792	24969	25552	26733	23924	22809	25940	28850
Cocoon yield (kg/ha) *Rendement en cocons (kg/ha)*	1386	1613	1309	1354	1449	1176	1138	1386	1617
Total expenditure (Rs./ha) *Dépenses totales (roupies/ha)*	47644	50631	46941	48409	49104	43870	43777	47827	51655
Gross income (Rs./ha) *Recettes brutes (roupies/ha)*	83160	96780	78540	81240	86940	70560	68280	83160	97020
Net income (Rs./ha) *Recettes nettes (roupies/ha)*	35516	46194	31599	32831	37836	26690	24503	35333	45365

S1 : Urea. **S2 :** Urea supergranule. **S3 :** Neem cake blended urea. **S4 :** Urea with calcium. **S5 :** Calcium ammonium nitrate. **S6 :** Urea without phosphorus and potassium.
S1 :Urée. S2 : Supergranules d'urée. S3 : Urée mélangée avec de la tourte de margoursier. S4 : Urée et calcium. S5 : Ammonitrate de chaux. S6 :Urée sans phosphore ni potassium.
L1 : 150 kg N/ha/year. **L2 :** 300 kg N/ha/year. **L3 :** 450 kg N/ha/year.

Leaf yield and productivity varied to the maximum extent when the levels of nitrogen were considered. An increase of 5,666 kg/ha/year in mean leaf yield at 300 kg N/ha/year and 10,942 kg/ha/year at 450 kg N/ha/year was obtained as compared to 150 kg N/ha/year. Hence every additional kg of nitrogen applied over 150 kg N/ha/year has resulted in 36 kg leaf at a cost of Re. 0.16 against Re. 0.81/kg leaf incurred at 150 kg N/ha/year. A general trend of reduction in cost per kg of leaf was noticed as the nitrogen level increased, which is in agreement with the report of Sengupta *et al.* (1972, 1973) and Kasiviswanathan *et al.* (1977). However, Kasiviswanathan *et al.* (1979) have noted that any amount of increase in nitrogen above 300 kg N/ha/year is not economical. But in the present study it is clearly brought out that even up to 450 kg N/ha/year, a progressive increase in leaf and in turn decrease in the production cost were noted. Further, the decrease in the production cost of one kg leaf was to the tune of Re. 0.20 in USG and CAN and Re. 0.23 in NCBU from 150 kg - 450 kg N/ha/year. The higher leaf yield of 36,875 kg/ha/year was obtained in USG from which 4,610 disease-free layings can be brushed with a cocoon yield of 1,613 kg which could fetch a gross income of Rs. 96,780/. After deducting Rs. 50,631/- as the cost of cultivation and silkworm rearing, the net income would be Rs. 46,149/-, which is 30 % more than the income generated by recommended package of practices wherein urea was used as a major source of nitrogen. Second in the series is CAN where the net return is Rs. 37,836/-, which is more by 7 % as compared to the cost of recommended package of practices.

REFERENCES

ANONYMOUS (1987-88) Annual Report. Department of Sericulture, Government of Karnataka, India.

JOLLY M.S. (1987) Sericulture and its economics, appropriate sericulture techniques. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. pp. 1-6.
KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMY S., VENKATARAMU C.V. (1977) Studies on varietal-cum-spacing and nitrogen fertilisation on the leaf yield of mulberry under irrigated conditions in Karnataka State, India. Indian J. Seric., 16, 10-18.
KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S., CHOWDHURY P.C. (1979) Long-term studies on the variety, spacing and nitrogen fertilization for improvement of yield potential of mulberry. Indian J. Seric., 18, 23-29.
KRISHNASWAMI S. (1986) New technology of silkworm rearing. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. pp. 1-23.
SENGUPTA K., MUKHERJEE S.K., SIKDAR A.K., MUSTAFI J.C., SENGUPTA D. (1973) A co-ordinated study on the effect of variety spacing in cultivation and levels of nitrogen fertilization of mulberry and cocoon yield and cocoon characters of multivoltine silk. Indian J. Seric., 12, 39-45.
SENGUPTA K., RAY D., SINGH B.D., KRISHNASWAMI S. (1972) Studies on the effect of high dose nitrogen fertilization of soil on the yield, chemical composition and nutritive value of mulberry leaf as evaluated from rearing results. Indian J. Seric., 11, 28-32.

EFFET DE LA SOURCE ET DE LA QUANTITE D'AZOTE SUR LE MURIER - ETUDE DE RENTABILITE

L. RAJANNA[1]* & S.B. DANDIN[2]

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

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

Une expérience a été réalisée sur des mûriers irrigués afin de déterminer la rentabilité de la culture de mûrier sur la base du coût de production des feuilles et des cocons après traitement avec différentes sources et différentes quantités d'azote. La lecture des données révèle que l'utilisation des supergranulés d'urée entraîne un coût de culture de 21 839 roupies/ha/an pour un coût de production des feuilles minimal (0,59 roupies/kg) et une production de cocons maximale (1 613 kg/ha/an) engendrant un revenu net maximal de 46 149 roupies par hectare/an, ce qui représente une augmentation de 30 % par rapport à l'application conventionnelle d'urée (35 516 roupies/ha/an). L'ammonitrate de chaux (CAN) entraîne un coût modéré de la production de feuilles avec une production de cocons de 1 449 kg/ha/an pour un revenu net de 37 836 roupies/ha/an, soit une augmentation de 7 % par rapport au traitement à l'urée. L'urée utilisée seule entraîne le coût de culture le plus faible (20 576 roupies/ha/an) pour le coût de production de feuilles le plus élevé (0,77 roupies/kg). L'augmentation de la quantité d'azote (450 kg N/ha/an) entraîne une diminution du coût de production des feuilles (0,62 roupies/kg), une production de cocons maximale (1 617 kg/ha/an) qui permet d'obtenir un revenu net maximal de 45 365 roupies par hectare/an), soit une augmentation de l'ordre de 28 % par rapport aux résultats obtenus avec l'utilisation de 300 kg N/ha/an qui engendre un coût de production des feuilles de 0,69 roupies/kg et un revenu net de 35 333 par hectare/an). Un coût de production des feuilles maximal (0,81 roupies/kg), une production de cocons inférieure (1 138 kg/ha/an) donnant un revenu net faible (24 503 roupies par hectare/an) ont été enregistrés avec l'utilisation de 150 kg N/ha/an, soit une diminution d'environ 30 % par rapport à l'utilisation de 300 kg N/ha/an.

INTRODUCTION

L'obtention d'un plus grand rendement en cocons pour une unité de surface donnée est le but de tout sériciculteur et dépend principalement de la quantité de feuilles récoltées. Il est donc impératif d'augmenter la productivité en feuilles si l'on souhaite lever un plus grand nombre de pontes et récolter ainsi davantage de cocons. Pour augmenter la productivité en feuilles, différentes sources et différentes quantités d'azote ont été administrées en mûraie irriguée pendant deux ans afin d'évaluer la rentabilité de la culture de mûrier et déterminer ainsi la source et le dosage optimaux d'engrais azoté.

MATERIELS ET METHODES

Une expérience a été réalisée sur une plantation de mûriers irrigués à la Regional Sericultural Research Station (Bangalore, Inde) et plantés dans un sol de sable gras rouge à pH 6,2. La rentabilité

* Extrait de thèse de doctorat du premier auteur soumise à l'Université de Mysore.

de la production de cocons en fonction de différentes sources et différentes quantités d'azote a été déterminée sur la base d'observations relevées pendant deux ans. Dix-huit combinaisons de traitements réparties en quatre réplicats suivant la configuration des parcelles partagées ont été étudiées de 1986 à 1988 afin d'évaluer la source et la dose optimales d'azote. Les traitements sont : urée, supergranulés d'urée (USG), mélange d'urée et de tourte de margousier (NCBU) (préparé localement avec 100 kg d'urée + 30 kg de tourte de margousier en poudre + 1 kg de goudron de houille + 2 litres de kérosène), ammonitrate de chaux (CAN), urée et calcium (équivalent au poids de calcium présent dans l'ammonitrate de chaux) contenant tous du phosphore et du potassium à raison de 120 kg/ha/an et urée seule. Trois doses différentes d'azote, soit 150, 300 et 450 kg N/ha/an, pour une dose commune de 10 tonnes de fumier/ha/an ont été appliquées. Des mûriers de la variété commerciale Kanva 2 (M_5) ont été plantés à espacement de 60 × 60 cm. Le taux d'irrigation, à raison d'une fois tous les dix jours, est le même pour tous les plants. Les traitements ont été effectués un an après le début de la plantation. Les feuilles ont été récoltées cinq fois par an suivant la méthode de récolte des rameaux pendant deux ans. Trois élevages expérimentaux ont été réalisés en synchronisation avec trois récoltes de feuilles en octobre-novembre (hiver), février-mars (été) et juillet-août (saison pluvieuse). L'hybride de ver à soie utilisé à l'échelle commerciale Pure Mysore × NB_{18} a été élevé sur des litières cellulaires avec quatre répliquats pour chaque traitement suivant les techniques d'élevage standard recommandées par Krishnaswamy (1986). La rentabilité de la sériciculture a été déterminée en fonction du coût de culture, du coût de production des feuilles, de la production de cocons, du revenu brut et du revenu net pour un hectare pour chaque traitement. Les résultats sont présentés dans le tableau I et dans la figure 1.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats concernant l'effet de différentes sources d'azote sur le rendement moyen en feuilles révèlent clairement la supériorité des supergranulés d'urée pour un coût minimum de 0,69 roupies/kg et une production maximale de feuilles de 36 815 kg/ha/an. L'ammonitrate de chaux vient en second avec une production de 33 106 kg/ha/an avec un coût de 0,68 roupies/kg de feuilles. Bien que le coût de production des feuilles obtenues avec l'urée soit comparable à celui obtenu pour le CAN, le rendement en feuilles après traitement à l'urée est inférieur de 4 % à celui obtenu pour le CAN.

La variation du rendement en feuilles et de la productivité est maximale lorsque l'on considère les quantités d'azote. On obtient une augmentation de 5 666 kg/ha/an du rendement moyen en feuilles après traitement avec 300 kg N/ha/an et de 10 942 kg/ha/an à 450 kg N/ha/an par rapport au traitement avec 150 N/ha/an. On constate une tendance à la baisse du coût de production du kg de feuilles lorsque la dose d'azote augmente, ce qui corrobore les résultats de Sengupta et coll. (1972, 1973) et de Kasiviswanathan et coll. (1977). Cependant, Kasiviswanathan et coll. (1979) ont observé que toute augmentation de la quantité d'azote au-delà de 300 N kg/ha/an n'était pas rentable alors que cette étude fait clairement apparaître une augmentation progressive de la production de feuilles entraînant une diminution du coût de production jusqu'à 450 N kg/ha/an. De plus, la diminution du coût de production pour un kg de feuilles est de l'ordre de 0,20 roupies avec les USG et le CAN et de 0,23 roupies avec le NCBU lorsque l'on utilise entre 150 et 450 kg N/ha/an. Les supergranulés d'urée permettent d'obtenir le rendement maximal en feuilles de 36 875 kg/ha/an permettant de nourrir 4 610 pontes saines et un rendement en cocons de 1 613 kg, ce qui correspond à un revenu brut 96 780 roupies. Après déduction de 50 631 roupies pour le coût de culture et d'élevage, le revenu net s'élève à 46 149 roupies, soit une augmentation de 30 % par rapport au revenu obtenu en suivant les méthodes de culture recommandées qui préconisent l'urée comme source principale d'azote. Le deuxième de la série est le CAN pour un revenu net de 37 836 roupies, ce qui correspond à une augmentation de 7 % par rapport au coût engendré par l'utilisation des méthodes de culture recommandées.

STUDIES OF FLOWERING BEHAVIOUR IN *TERMINALIA* SPECIES

P.K. SRIVASTAV

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, India.

0.0072 % juvenile flowering was observed in the seedlings of ***Terminalia arjuna*** *(0.0066 %) and* ***Terminalia tomentosa*** *(0.0006 %) during mass nursery and progeny testing of 24 plus trees (including controls) at the age of 3-4 months. The sexually early maturing plants of* ***T. arjuna*** *(0.0081 %) from the second year onwards and early and late flowering plants of* ***T. arjuna*** *(0.03 and 0.05 %) and* ***T. tomentosa*** *(0.06 and 0.03 %) were also isolated in raised plantations and their flowering period, floral biology and cytology were investigated, which opens avenues for evolution of seedling flowering and early maturing strains, measurement of allele frequencies for known enzyme loci and estimation of the number of genes responsible for early flowering in* ***T. arjuna*** *and* ***T. tomentosa****.*

Keywords : Seedling flowering, early sexual maturity, early and late flowering plants, flowering period, floral biology, meiosis.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna Bedd. and *T. tomentosa* W. & A. (Combretaceae) are considered as the two best tree species to breed tasar silkworms (*Antheraea mylitta* D.) in India. The plantations are raised from seedlings of open-pollinated trees through agencies like State Forest Departments, Social Forestry Organizations, Inter-State Tasar Project, State Sericulture Departments and Central Silk Board units. Besides, these species are also economically very valuable in pharmaceutical, timber, tanning and leather industries (Chopra *et al.*, 1974 ; Singh *et al.*, 1983).

The present author reports here about the preliminary observations recorded in various populations/genotypes of *T. arjuna* and *T. tomentosa* with respect to differences in their flowering behaviour at various stations of Madhya Pradesh, Bihar and Orissa States in India.

MATERIALS AND METHODS

The flowering behaviour of *T. arjuna* and/or *T. tomentosa* plants was studied with reference to their minimum age for attaining sexual maturity as well as their seasonal flowering periods and/or time.

During the raising of mass seedlings from various collections of *T. arjuna* and *T. tomentosa*, juvenile flowering was observed in the 3-4 month old seedlings raised in polythene tubes in the nursery at Research Extension Centre (REC), Katghora (Bilaspur, Madhya Pradesh) and Basic Seed Multiplication and Training Centres (BSM&TC) at Pali (Bilaspur, Madhya Pradesh), Noamundi (Singhbhum, Bihar), Sundergarh (Orissa) and Central Tasar Research and Training Institute (CTR&TI), Field Laboratory, Piska Nagri, Ranchi (Bihar). Likewise, the juvenile/seedling flowering was also observed in 3-4 month old seedling progenies of plus trees of *T. arjuna* (B_5, O_2) and *T. tomentosa* (NG) raised in polythene tubes at CTR&TI, Field Laboratory, Piska Nagri, Ranchi. The

flowering seedlings were transplanted at their respective stations to study their future behaviour with respect to flowering.

Early sexual maturity was observed in the second year and onwards after transplantation in various experimental progenies of eight marked plus trees of *T. arjuna* (O_2, D, Ds_1-Ds_4, TaC). These progenies were raised at the Field laboratory, Nagri, for testing the performance of their parents by progeny trial. The early sexual maturity from the third year onwards was also observed in the economic plantations at BSM&TC, Nowrangpur, raised by mass seedlings of *T. arjuna* trees located at Umerkote (Orissa).

The early and late flowering plants in *T. arjuna* and *T. tomentosa* were identified in 26 plots spread over 64.54 acres at the Field Laboratory (Nagri, Ranchi) at the onset and end of the flowering seasons, respectively.

For comparison, the floral biology of early/late flowering trees, flowering seedlings and matured trees of both species was carried out following the usual techniques. For meiotic analysis, floral buds of seedlings and matured early, normal and late flowering trees of *T. arjuna* were fixed in 1:3 acetic-ethanol for 24 hrs. The flower buds were subsequently squashed in one per cent acetocarmine and microphotographs were taken from temporary preparations.

RESULTS

Juvenile/seedling flowering :

The overall occurrence of seedling flowering in the five stations of Bihar, Madhya Pradesh and Orissa was found to be 0.0072 % (Table I) in *Terminalia*, out of which *T. arjuna* alone exhibited 0.0066 % occurrence while *T. tomentosa* had only a 0.0006 % occurrence of juvenile flowering in seedlings. The minimum (0.0014 %) and maximum (0.33 %) occurrences of juvenile flowering were observed at BSM&TC (Pali, Madhya Pradesh) and CTR&TI (Ranchi, Bihar), respectively. It is also of considerable interest that the 0.33 % occurrence of seedling flowering recorded at CTR&TI, Ranchi, was observed in the individual progenies of three plus trees, viz. NG, B_5 and O_2 marked at the Field Laboratory, Nagri (Ranchi, Bihar) and Forest of Sundergarh (Orissa), whereas the occurrence of seedling flowering recorded at other stations like BSM&TCs at Pali and Noamundi and REC at Katghora was observed in the mass (mixed) populations of seedlings intended for raising economic plantations of *T. arjuna*. The behaviour of the seedlings exhibiting flowering was also found to vary from place to place. While one single seedling flowered at REC, Katghora, and BSM&TC, Pali, died in the same year without setting fruits, the flowering seedlings at BSM&TC, Noamundi, exhibited flowering the next year also and subsequently died. On the contrary, the flowering seedlings at CTR&TI, Ranchi, and BSM&TC, Sundergarh, though they survived longer, did not flower in the subsequent years. No flowering seedlings could set seeds except the seedlings of BSM&TC, Sundergarh, which failed to germinate.

Early sexual maturity :

While the early sexual maturity at 3-5 years of age was observed in four plants amongst the economic plantations of BSM&TC, Nowrangpur (Orissa), it was observed in the seven plants of individual experimental progenies raised from the seeds collected from five plus trees, viz. O_2, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3 and control *T. arjuna* even at the age of two years. One plant ($N_3R_2L_2P_5$) raised from an N_3 plus tree exhibited early sexual maturity at the age of three years also. While the cumulative occurrence of early sexual maturity in mass economic plantations of *T. arjuna* at Nowrangpur (Orissa) was found to be 0.0027 %, the occurrence ranged from 0.0017 % in 1984 to 0.005 % in 1985 plantations. The mass seeds were collected from a common location/source, i.e. Umerkote (Orissa), and the early sexual maturity was observed at the age of 3, 4 and 5 years in 2, 1 and 1 plants in the 1985, 1984 and 1983 economic plantations, respectively. On the contrary, the cumulative occurrence of early sexual maturity in 8 out of 24 experimental progenies (including the control) was found to be 0.75 % and normally the frequency was noted to be 0.666 % in the individual progenies of six plus trees, viz. O_2, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3 and N_3 (Table II). The source of collection of seeds was common, i.e. Dhamtari Sorgaom (Madhya Pradesh) for 4 plus trees, viz. Ds_1-Ds_4, while D, O_2, N_3 and TaC had

Table I. Juvenile flowering observed in *T. arjuna* and *T. tomentosa* seedlings at various places.

Tableau I. Floraison juvénile observée chez des plantules de* T. arjuna *et* T. tomentosa *sur différents sites.

Sl no. / *N° de série*	Centre/place / *Centre/site*	Source / *Source*	Year of observation / *Année d'observation*	Number of seedlings raised / *Nombre de plantules cultivées*	Number of seedlings flowered / *Nombre de plantules donnant des fleurs*	Occurrence (%) / *Fréquence (%)*	Remarks / *Remarques*
1	Research Extension Centre, Kaghora, Bilaspur, Madhya Pradesh	Podi Bilaspur	1986-87	30 000	1*	0.0033	(1)
2	Basic Seed Multiplication & Training Centre, Pali Bilaspur, Madhya Pradesh	Kurud Raipur	1986-87	70 000	1*	0.0014	(1)
3	Central Tasar Research & Training Institute Ranchi, Bihar	Sundergarh (B_5, O_2) and Ranchi (NG)	1987-88	900	3 (1*+1*+1**)	0.33 (0.33)	(2)
		Khelari, Ranchi	1990-91	30 000	2*	0.0066	(2)
4	BSM&TC Sundergarh, Orissa	Sundergarh	1987-88	700	2*	0.28	(2)
5	BSM&TC Noamundi Singhbhum, Bihar	Noamundi	1987-88	21 000	2*	0.0095	(3)
	Overall occurrence in *T. arjuna* / *Total observé chez* T. arjuna			152 300	10	0.0066	
	Overall occurrence in *Terminalia* / *Total observé chez* Terminalia			152 600	11	0.0072	

* *T. arjuna* (B_5, O_2) ; ** *T. Tomentosa* (NG).
B_5 : 5th plus tree marked at Bijlikhaman in Sundergarh (Orissa) Forest. **O_2 :** 2nd plus tree marked at BSM&TC, Sundergarh, Office. **NG :** *T. tomentosa* marked at CTR&TI, F.L., Nagri, Ranchi / ***B_5 :*** *5e arbre supérieur marqué à Bijlikhaman dans la forêt de Sundergarh (Orissa).* ***O_2 :*** *2e arbre supérieur marqué au Basic Seed Multiplication and Training Centre de Sundergarh, Bureau.* ***NG :*** T. tomentosa *marqué au Field Laboratory du Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi.*
(1) : Died without setting seeds / *Mort sans donner de graines.* **(2)** : Not flowered in the following years / *N'a pas fleuri au cours des années suivantes.*
(3) : Flowered in the 2nd year also without setting seeds and died / *A fleuri pendant la 2e année mais est mort sans donner de graines.*

different locations (Table II). The overall occurrence of early sexual maturity was found to be 0.0081 % in *T. arjuna*.

Early and late flowering :

Normally, the peak periods of flowering in *T. arjuna* and *T. tomentosa* occur from May to June and from June to July respectively at CTR&TI, Nagri, Ranchi. The flowering phenology of this stand had been monitored over two years and trees differed in their dates of first, maximum and last flowering. The flowering time differences between specific trees were consistent over two years. The trees differed in their crown size and consequently in fecundity also. In *T. arjuna* 16 trees (0.05 %) were found to flower in late June while only 9 trees (0.03 %) flowered in late April and behaved as early flowering. On the contrary, in *T. tomentosa* 8 trees (0.06 %) behaved as early flowering (June) and four trees (0.03 %) flowered in late season, i.e. last week of August or early September.

Flowering period and floral biology :

The trees differed in their dates of first, maximum and last flower production. The number of days over which individual trees flowered also differed markedly, varying from 20 to 40 days. There was no difference in the size of the various floral organs of early and late flowering trees of both species. On the contrary, the size of the various floral organs in the flowering seedlings of *T. arjuna* and *T. tomentosa* was found to be smaller than that found in normal plants (Table III).

Cytology :

The cytological investigations carried out at diakinesis/metaphase I in sexually early maturing, early/late flowering and flowering seedlings revealed no significant differences. All early maturing, early/late flowering and flowering seedlings of *T. arjuna* and *T. tomentosa* exhibited 12 bivalents regularly in 15 cells studied in each case. Anaphase I showed an equal disjunction of chromosomes.

DISCUSSION

Terminalia arjuna and *T. tomentosa* trees require more than seven years to attain sexual maturity. The seedling/juvenile flowering observed in these taxa is a rather unusual and rare phenomenon (0.0072 %). As the behaviour of the seedlings exhibiting flowering was found to vary from place to place, the reasons for juvenile flowering might also be different. Since the seedlings flowered at REC, Katghora, and BSM&TC, Pali (Madya Pradesh), died in the same year and the flowering seedlings at BSM&TC, Noamundi (Bihar), exhibited flowering in the next year also and subsquently died without setting seeds, the juvenile flowering at these places might have been genetically controlled due to spontaneous mutations. On the contrary, the flowering seedlings at CTR&TI, Ranchi (Bihar), and BSM&TC, Sundergarh (Orissa), though they survived longer, did not flower during the subsequent years. The seedling flowering at such places seems to have occurred due to physiological reasons, most probably due to a prolonged stay of seeds beyond one year and a subsequent transfer of the florigen hormone to such seeds during the flowering phase before their fall from the trees. Such observations were earlier recorded by Waheed Khan (1969) also in *Eucalyptus rudis* and *E. camaldulensis*, who found that the flowering seedling of *E. rudis* (ex. Australia) continued to flower and fruit prolifically year after year and experienced a slight retardation in its vegetative growth also as compared to the non-flowering seedlings. On the contrary, the flowering seedling of *E. camaldulensis* experienced stagnation in vegetative growth, failed to flower in the following years and ultimately died within 2.5-3 years of planting.

The early sexual maturity in Nowrangpur (Orissa) at 3-5 years of age in four plants (0.0027 %) and in eight plants at 2-3 years of age at Piska Nagri, Ranchi, (0.75 %) seems to occur due to genetic reasons rather than physiological reasons since the early sexual maturity was observed in only eight experimental progenies out of 24 experimental progenies derived from 24 plus trees. Further, four out of these eight plus trees (Ds_1-Ds_4) had the same location, i.e. Dhamtari Sorgaom in Madhya Pradesh and normally the frequency of early maturing plants was found to be only 0.666 % in six individual progenies. The plants exhibiting early sexual maturity at Nowrangpur (Orissa) also had the same

Table II. Early sexual maturity observed from the second year onwards in *T. arjuna* at Nowrangpur (Orissa) and Ranchi (Bihar).

Tableau II. Maturité sexuelle précoce observée à partir de la deuxième année chez* T. arjuna *à Nowrangpur (Orissa) et Ranchi (Bihar).

Centre/ place *Centre/ site*	Source/location of seed collection *Source/lieu du prélèvement des graines*	Year of plantation *Année de plantation*	Year of flowering *Année de floraison*	Flowering age (years) *Age de floraison (années)*	Number of plants flowered/planted *Nombre de plants donnant des fleurs /plantés*	Year of seed collection *Année de prélèvement des graines*	Designation of the plant *Désignation du plant*	Occurrence (%) *Fréquence (%)*
BSM&TC (1)	Umerkote	1985	1988	3	2/40 000	1989	NEF_1, NEF_2	0.005
Nowrganpur	(Orissa)	1984	1988	4	1/58 000	1989	NEF_3	0.0017
		1983	1988	5	1/48 000	1989	NEF_4	0.0021
	A. Cumulative occurrence / *Présence cumulée* :				4/146 000			0.0027
CTR&TI (2)	Sundergarh	1987	1989	2	1/150	1990	$O_2R_1L_5P_3$	0.666
Ranchi	(Orissa)		1990	3		NS	$O_2R_1L_5P_3$	
	Dhamtari sorgaom (MP)	1987	1989	2	1/135	NS	$DS_4R_1L_4P_4$	0.74
	-do-	1987	1989	2	1/150	-do-	$DS_2R_2L_8P_3$	0.666
	-do-	1987	1989	2	1/150	-do-	$DS_2R_3L_9P_3$	0.666
	-do-	1987	1989	2	1/150	-do-	$DS_3R_1L_3P_5$	0.666
	Dhamtari (MP)	1987	1989	2	1/150	-do-	$DR_1L_1P_1$	0.666
	Nagri, Ranchi	1987	1989	2	1/25	-do-	$TaCL_1P_4$	4.00
	Raipur-Jagdalpur Road (MP)	1987	1990	3	1/150	-do-	$N_3R_2L_2P_5$	0.666
	B. Cumulative occurrence / *Présence cumulée* :				8/1 060			0.75
	Overall occurrence / *Présence totale* (A + B) :				12/147 060			0.0081

(1) : Economic plantations. **(2)** : Experimental progenies of plus trees, viz. O_2, DS_4, Ds_2, Ds_1, Ds_3, D, N_3 and TaC. **NEF** : Nowrangpur early flowering plants. **NS** : No seed setting. **R** : Replication. **L** : Line. **P** : Plant number. **O_2** : Marked plus tree in BSM&TC, Sundergarh (Orissa) office. **D** : Marked plus tree in Dhamtari (Madhya Pradesh). **Ds_1-Ds_4** : Marked plus tree in Dhamtari Sorgaom (Madhya Pradesh). **TaC** : *T. arjuna* control plantation at the Field Laboratory, Nagri, Ranchi (Bihar). **N_3** : Marked plus tree on Raipur-Jagdalpur Road (Madhya Pradesh).

*(1) : Plantations commerciales. (2) : Descendance expérimentale des arbres supérieurs O_2, DS_4, Ds_2, Ds_1, Ds_3, D, N_3 et TaC. **NEF** : Plants à floraison précoce de Nowrangpur. **NS** : Pas de production de graines. **R** : Réplicat. **L** : Lignée. **P** : Nombre de plants. **O_2** : Arbre identifié comme supérieurs au bureau du Basic Seed Multiplication and Training Centre de Sundergarh (Orissa). **D** : Arbre identifié comme supérieur à Dhamtari (Madhya Pradesh). **Ds_1-Ds_4** : Arbres identifiés comme supérieurs à Dhamtari Sorgaom (Madhya Pradesh). **TaC** : Plantation témoin de* T. arjuna *au Field Laboratory de Nagri, Ranchi (Bihar). **N_3** : Arbre identifié comme supérieur sur la route de Raipur-Jagdalpur (Madhya Pradesh).*

location, i.e. Umerkote. These observations indicate that the early maturity in *T. arjuna* depends on the outcross pollen pools and natural stands in the forests.

Table III. Comparative floral biological details in normal and seedling flowering plants of *Terminalia arjuna*.

***Tableau III. Biologie florale comparative des plants normaux et des plants à floraison des plantules chez* Terminalia arjuna.**

Characters *Caractères*	Normal *T. arjuna* T. arjuna *normaux*	Seedling flowering *T. arjuna* T. arjuna *à floraison des plantules*	Normal *T. tomentosa* T. tomentosa *normaux*	Seedling flowering *T. tomentosa* T. tomentosa *à floraison des plantules*
Inflorescence / *Inflorescence*	PR	PR	PR	PR
Flowering period *Période de floraison*	May-June *Mai à juin*	Late Aug.-Sept. *Fin août à sept.*	June-July *Juin à juil.*	September *Septembre*
Length of primary peduncle (cm) *Longueur du pédoncule primaire (cm)*	15.12	4.5	19.75	4.0
Average no. of flowers/peduncle *Nombre moyen de fleurs/pédoncule*	34.2	14.0	42.0	10.0
Length of buds / *Longueur des boutons* (mm)	2.5	2.0	2.62	2.0
Width of buds / *Largeur des boutons* (mm)	1.7	1.5	1.5	1.2
Number of sepals / *Nombre de sépales*	5.04 (3-12)	4.25 (4-5)	4.96 (4-10)	5.0
Length of sepals / *Longueur des sépales* (mm)	3.0	2.0	2.75	2.0
Width of sepals / *Largeur des sépales* (mm)	2.5	1.25	1.00	0.8
Length of pedicel / *Longueur du pédicelle* (mm)	0.9	0.7	0.9	0.5
Average number of stamens *Nombre moyen d'étamines*	10.10 (6-24)	8.5	9.92 (8-20)	10.0
Length of stamens / *Longeur des étamines* (mm)	4.5	3.8	3.5	3.0
Length of style / *Longueur du style* (mm)	3.70	3.0	3.0	2.5
Pollen shape / *Forme du pollen*	RH	RH	R	R
Pollen stainability / *Colorabilité du pollen* (%)	90.0	80.0	87.0	70.0
Pollination mechanisms *Mode de pollinisation*	E	E	E	E
Dehiscence of anthers *Déhiscence des anthères*	8.00- 9.00 am	9.00- 10.00 am	12.00- 2.00 pm	9.00- 10.00 am
Receptivity of stigma *Réceptivité du pistil*	8.30- 9.30 am	9.30- 10.30 am	1.00- 2.00 pm	9.30 10.30 am
Seed setting *Formation de graines*	Good *Bonne*	Nil *Néant*	Moderate *Modérée*	Nil *Néant*

PR : Panicled raceme / *Racème paniculé.*
E : Entomophilous / *Entomophile.*
H : Hexagonal / *Hexagonal.*
R : Round / *Rond.*

The occurrence of early, normal and late flowering plants in *T. arjuna* and *T. tomentosa* populations at Piska Nagri, Ranchi, confirms the observations recorded regarding flowering time and/or period differences in many species (Ashton, 1975 ; Bawa, 1983 ; Cooper, 1959 ; Florence, 1964 ; Frankie *et al.*, 1974 ; McNeilly and Antonovics, 1968 ; Medway, 1972 ; Stern and Roche, 1974 ; Westerman, 1971). In such populations the potential exists for allele frequencies in the outcross pollen pool to change during the flowering season as the flowering occurring at different times may show different genotype frequencies. Previous authors have discussed this issue (Bijlsma *et al.*, 1986 ; Friedman and Adams, 1984 ; Stern and Roche, 1974 ; Stam, 1983) and Fripp *et al.* (1987) attempted to measure the allele frequencies also at three known enzyme loci in *Eucalyptus regnans* by taking into account the inter-plant variations in flowering phenology and fecundity in outcross pollen pools. Further, the variation in flowering times within genotype classes of the early flowering (Ef ef) gene in lettuce (*Lactuca sativa*) suggested that more than one gene may govern flowering time (Ryder, 1988). Such studies have got relevance in *T. arjuna* and *T. tomentosa* also where trees differ in their dates of first, medium and last flower production and the period of flowering varied from 20 to 40 days.

No differences were discernible in pollen stainability and the size of various floral organs of early and late flowering trees of both species, which indicates that both early and late flowering trees are physiologically normal in both species. On the contrary, the floral organs of both species in flowering seedlings were found to be smaller than those found in their normal plants and they flowered in off-seasons/periods, which seems to have affected the viability of seeds at Sundergarh where flowering seedling had set fruits. Further, as the pollen stainability was also lesser and outcross pollen pools were absent due to off-season, the fertility of the plants in respect of fecundity was also poor.

The regular formation of 12 bivalents at diakinesis/MI and equal disjunction of chromosomes at AI in normal, sexually early maturing, early/late flowering plants and flowering seedlings in both species indicate that such differences in the flowering behaviour with respect to the minimum age required for attaining sexual maturity, flowering time and/or period in *T. arjuna* and *T. tomentosa* might occur or arise due to genic rather than cytological/chromosomal reasons.

The above studies open avenues for undertaking investigations along the following lines in the genus, *Terminalia* :

(i) Evolution of seedling flowering strains/genotypes through intercrossing between genetically flowering seedlings.

(ii) Evolution of sexually early maturing strains/genotypes through intercrossing between early maturing plants.

(iii) Measurement of allele frequencies with respect to known enzyme loci in future by detailed studies of interplant variation in flowering phenology and fecundity.

(iv) Estimation of the number of genes responsible for early flowering by studying segregation from crosses between earlier and later flowering plants in the early class during the same season.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful to Shri R.C. Kimothy, Sri H.C. Mahopatra, Sri D. Mishra and Dr R.N. Dutta for their valuable information and Dr S.S. Sinha and Dr K. Thangavelu, the Ex-Director-in-charge and Director of Central Tasar Research and Training Institute, respectively, for providing facilities.

REFERENCES

ASHTON D.H. (1975) Studies of flowering behaviour in *Eucalyptus regnans* F. Muell. Aust. J. Bot., 23, 399-411.

BAWA K.S. (1983) Patterns of flowering in tropical plants. *In* Handbook of Experimental Pollination Biology. Jones C.E., Little R.J. (eds), Van Nostrand-Reinhold, New York, 394-410.

BIJLSMA R., ALLARD R.W., KAHLER A.L. (1986) Non-random mating in an open-pollinated maize population. Genetics, 112, 669-680.

CHOPRA R.N., CHOPRA I.C., VERMA B.S. (1974) Supplement to glossary of Indian mecidinal plants. Pub. and Inform. Directorate, New Delhi.

COOPER J.P. (1959) Selection and population structure in *Lolium*. I. The initial populations. Heredity, 13, 317-340.
FLORENCE R.G. (1964) A comparative study of flowering and seed production in six blackbutt (*Eucalyptus pilularis* Sm.) forest stands. Aust. For., 28, 23-33.
FRANKIE G.W., BAKER H.G., OPLER P.A. (1974) Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the low lands of Costa Rica. J. Ecol., 62, 881-919.
FRIEDMAN S.T., ADAMS W.T. (1984) Estimation of gene flow into seed orchards of the loblolly pine, *Pinus taeda* L. Theor. Appl. Genet., 68, 1-7.
FRIPP V.S., GRIFFIN A.R., MORAN G.F. (1987) Variation in allele frequencies in the outcross pollen pool of *Eucalyptus regnans* F. Muell. throughout a flowering season. Heredity, 59, 161-171.
McNEILLY, ANTONOVICS J. (1968) Evolution in closely adjacent plant populations. IV. Barriers to gene flow. Heredity, 23, 205-218.
MEDWAY L. (1972) Phenology of a tropical rainforest in Malaya. Biol. J. Linn. Soc., 4, 117-146.
RYDER E.J. (1988) Early flowering in lettuce as influenced by a second flowering time gene and seasonal variation. J. Am. Soc. Hort. Soc., 113, 456-460.
SINGH U., WADHWANI A.M., JOHRI B.M. (1983) Dictionary of Economic Plants in India. ICAR, New Delhi.
STAM P. (1983) The evolution of reproductive isolation in closely adjacent plant populations through differential flowering time. Heredity, 50, 105-118.
STERN K., ROCHE L. (1974) Genetics of Forest Ecosystems. Chapman and Hall, London.
WAHEED KHAN M.A. (1969) Further observations on the growth behaviour of flowering seedlings of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. rudis*. Ind. For., 95, 496-498.
WESTERMAN J.M. (1971) Genotype environment interaction and development regulation in *Arabidopsis thaliana*. IV. Wild material, analysis. Heredity, 26, 383-395.

ETUDES SUR LA FLORAISON CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE *TERMINALIA*

P.K. SRIVASTAV

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

Une floraison juvénile à une fréquence de 0,0072 % a été observée chez des plantules de ***Terminalia arjuna*** *(0,0066 %) et de* ***Terminalia tomentosa*** *(0,0006 %) au cours de la culture en masse et de l'évaluation de la descendance de 24 arbres supérieurs (y compris les témoins). Les plants sexuellement précoces de* ***T. arjuna*** *(0,0081 %) et les plants à floraisons précoce et tardive de* ***T. arjuna*** *(0,03 et 0,05 %) et de* ***T. tomentosa*** *(0,06 et 0,03 %) ont également été isolés dans les plantations à partir de la 2e année et leur période de floraison, leur biologie florale et leur cytologie ont été étudiées. Ceci a permis de dégager les nouvelles orientations suivantes : isolement de plantules donnant des fleurs et des souches précoces, mesure des fréquences alléliques pour des locus d'enzymes connus et estimation du nombre de gènes responsables de la floraison précoce chez* ***T. arjuna*** *et* ***T. tomentosa****.*

INTRODUCTION

Terminalia arjuna Bedd. et *T. tomentosa* W. & A. (Combretaceae) sont considérées comme les deux espèces d'arbres les mieux adaptées à l'élevage du ver à soie tasar (*Antheraea mylitta* D.) en Inde. Les plantations sont issues de plantules obtenues par pollinisation ouverte cultivées par des agences comme les Départements forestiers d'Etat, les Organisations de sylviculture sociale, le Projet tasar inter-Etat, les Départements séricicoles d'Etat et les unités du Bureau central de la soie. En outre, ces espèces sont également très rentables pour l'industrie pharmaceutique, l'industrie du bois, la tannerie et la maroquinerie (Chopra et coll., 1974 ; Singh et coll., 1983).

L'auteur décrit ici les observations préliminaires réalisées chez divers(es) populations/génotypes de *T. arjuna* et de *T. tomentosa* pour ce qui concerne les différences de comportement de floraison dans plusieurs stations du Madhya Pradesh, du Bihar et de l'Orissa en Inde.

MATERIELS ET METHODES

La floraison des plants de *T. arjuna* et/ou *T. tomentosa* a été étudiée en fonction de l'âge minimum auquel ils arrivent à maturité sexuelle ainsi que leurs périodes et/ou époques de floraison saisonnières.

Au cours de la culture en masse de plantules issues de diverses collections de *T. arjuna* et de *T. tomentosa*, on a observé une floraison juvénile chez des plantules de 3 à 4 mois cultivées dans des tubes en polyéthylène à la pépinière du Research Extension Centre (REC) de Katghora (Bilaspur, Madhya Pradesh) et aux Basic Seed Multiplication and Training Centres (BSM&TC) de Pali (Bilaspur, Madhya Pradesh), de Noamundi (Singhbhum, Bihar), de Sundergarh (Orissa) et à la plantation expérimentale du Central Tasar Research and Training Institute (CTR&TI) de Piska Nagri (Ranchi, Bihar). Une floraison juvénile a également été observée chez des plantules de 3 à 4 mois issues d'arbres supérieurs de *T. arjuna* (B_5, O_2) et de *T. tomentosa* (NG) cultivés dans des tubes en polyéthylène à la plantation expérimentale du CTR&TI de Piska Nagri (Ranchi). Les plantules

présentant une floraison ont été transplantées dans leurs stations respectives afin d'étudier leur comportement pour ce qui concerne la floraison.

La maturité sexuelle précoce a été observée deux ans après la plantation initiale chez les diverses descendances expérimentales de huit arbres supérieurs de *T. arjuna* (O_2, D, Ds_1-Ds_4, TaC). Ces descendances ont été cultivées à la plantation expérimentale de Nagri afin d'évaluer la performance de leurs parents par test de la descendance. On a également observé une maturité sexuelle précoce à partir de la 3e année dans les plantations économiques de BSM&TC de Nowrangpur situées à Umerkote (Orissa) et obtenues par culture en masse de plantules de *T. arjuna*.

Des plants à floraison précoce et tardive chez *T. arjuna* et *T. tomentosa* ont été identifiés dans 26 parcelles réparties sur 64,54 acres à la plantation expérimentale (Nagri, Ranchi) respectivement au début et à la fin des saisons de floraison.

Pour permettre les comparaisons, la biologie florale des arbres à floraison précoce/tardive, des plantules donnant des fleurs et des arbres matures des deux espèces a été étudiée suivant les techniques habituelles. Pour l'analyse méïotique, des bourgeons floraux de plantules et d'arbres matures, à floraison précoce, normale et tardive ont été fixés dans un mélange éthanol-acétique (1:3) pendant 24 heures. Les bourgeons floraux ont ensuite été écrasés dans du carmin acétique à 1 % et des microphotographies ont été prises à partir de ces préparations.

RESULTATS

Floraison juvénile/floraison des plantules :

La fréquence globale de floraison des plantules dans les cinq stations du Bihar, du Madhya Pradesh et de l'Orissa est de 0,0072 % (Tableau I) chez *Terminalia*, dont 0,0066 % pour *T. arjuna* et seulement 0,0006 % de floraison juvénile chez les plantules pour *T. tomentosa*. Les fréquences minimale (0,014 %) et maximale (0,33 %) de floraison juvénile ont été observées respectivement au BSM&TC de Pali (Madhya Pradesh) et au CTR&TI de Ranchi (Bihar). Il est également intéressant de noter que le chiffre de 0,33 % de floraison des plantules relevé au CTR&TI de Ranchi a été observé chez des individus issus de trois arbres supérieurs, NG, B_5 et O_2, identifiés à la plantation expérimentale de Nagri (Ranchi, Bihar) et dans la forêt de Sundergarh (Orissa), alors que le nombre de floraisons juvéniles relevé dans les autres stations comme les BSM&TC de Pali et de Noamundi et le REC de Katghora a été observé chez des populations cultivées en masse (mixtes) de plantules destinées à des plantations économiques de *T. arjuna*. Le comportement des plantules donnant des fleurs varie d'un endroit à l'autre. Alors qu'une seule plantule ayant donné des fleurs au REC de Katghora et au BSM&TC de Pali soit morte la même année sans produire de fruit, les plantules ayant donné des fleurs au BSM&TC de Noamundi ont également donné des fleurs l'année suivante et sont mortes par la suite. Au contraire, les plantules ayant donné des fleurs au CTR&TI de Ranchi et au BSM&TC de Sundergarh, si elles ont survécu plus longtemps, n'ont pas donné de fleurs au cours des années suivantes. Aucune des plantules ayant donné des fleurs n'a produit de graines, à l'exception des plantules du BSM&TC de Sundergarh dont les graines n'ont pas germé.

Maturité sexuelle précoce :

Une maturité sexuelle précoce a été observée, d'une part, chez quatre plants âgés de 3 à 5 ans dans les plantations commerciales du BSM&TC de Nowrangpur (Orissa) et, d'autre part, chez sept individus issus d'une culture expérimentale obtenue à partir de graines prélevées sur cinq arbres supérieurs, O_2, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3 et sur l'arbre témoin *T. arjuna* dès l'âge de 2 ans. L'un des plants ($N_3R_2L_2P_5$) obtenu à partir d'un arbre supérieur N_3 a également présenté une maturité sexuelle précoce à l'âge de 3 ans. La fréquence cumulée de maturités sexuelles précoces dans les plantations commerciales de *T. arjuna* à Nowrangpur (Orissa) est de 0,0027 %, allant de 0,0017 % en 1984 à 0,005 % en 1985. Les graines destinés à la culture en masse sont issues d'une source commune, Umerkote (Orissa), et la maturité sexuelle précoce a été observée chez des plants âgés de 3, 4 et 5 ans respectivement pour les plantations commerciales de 1985, 1984 et 1983. Au contraire, la fréquence cumulée de maturités sexuelles précoces chez 8 des 24 individus expérimentaux (y compris le témoin) est de 0,75 % et la fréquence est de 0,666 % pour les individus descendant de six arbres supérieurs, O_2, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3 et N_3 (Tableau II). Les graines de quatre de ces arbres supérieurs, Ds_1 à Ds_4,

sont issues de la même source : Dhamtari Sorgaom (Madhya Pradesh), tandis que D, O_2, N_3 et TaC proviennent de différents endroits (Tableau II). La fréquence totale de plants à maturité sexuelle précoce est de 0,0081 % chez *T. arjuna*.

Floraison précoce et tardive :

Normalement, les périodes principales de floraison chez *T. arjuna* et *T. tomentosa* se situent respectivement de mai à juin et de juin à juillet au CTR&TI de Nagri (Ranchi). La phénologie de floraison de ce site a été contrôlée pendant deux ans et les arbres présentent des différences pour ce qui concerne les dates de première floraison, de dernière floraison et de floraison maximale. Les différences d'époques de floraison entre des arbres spécifiques sont uniformes pour les deux années. Les arbres présentent des différences au niveau de la taille de la couronne, d'où des différences de fécondité. Chez *T. arjuna*, 16 arbres (0,05 %) fleurissent à la fin du mois de juin tandis que 9 arbres seulement (0,03 %) fleurissent à la fin du mois d'avril (floraison précoce). Chez *T. tomentosa*, 8 arbres (0,06 %) ont une floraison précoce (juin) et quatre arbres (0,03 %) une floraison tardive, au cours de la dernière semaine d'août ou début septembre.

Durée de la floraison et biologie florale :

Les arbres présentent des différences pour ce qui concerne les dates de première floraison, de floraison maximale et de dernière floraison. Le nombre de jours au cours desquels l'arbre fleurit varie également fortement et se situe entre 20 et 40. Il n'y a aucune différence de taille des divers organes floraux entre les arbres à floraison précoce et les arbres à floraison tardive des deux espèces. Au contraire, la taille des divers organes floraux des plantules de *T. arjuna* et *T. tomentosa* donnant des fleurs est inférieure à celle observée chez les plants normaux (Tableau III).

Cytologie :

Les études cytologiques réalisées au stade diacinèse et/ou métaphase I chez les arbres à maturité sexuelle précoce, à floraison précoce/tardive et chez les plantules donnant des fleurs ne révèlent aucune différence significative. Tous ces arbres présentent 12 bilavents chez les 15 cellules étudiées dans chaque cas. L'anaphase I présente une disjonction égale des chromosomes.

DISCUSSION

Terminalia arjuna et *T. tomentosa* mettent plus de sept ans à parvenir à maturité sexuelle. La floraison des plantules/juvénile observée chez ces espèces est un phénomène assez rare (0,0072 %). Etant donné que le comportement des plantules donnant des fleurs varie d'un endroit à l'autre, les causes de la floraison juvénile pourraient également être différentes. Puisque les plantules ayant donné des fleurs au REC de Katghora et au BSM&TC de Pali (Madhya Pradesh) sont toutes mortes la même année et celles du BSM&TC de Noamundi (Bihar) ont donné des fleurs l'année suivante, la floraison juvénile observée sur ces sites pourrait être contrôlée génétiquement par des mutations spontanées. Au contraire, les plantules ayant donné des fleurs au CTR&TI de Ranchi (Bihar) et au BSM&TC de Sundergarh (Orissa), bien qu'elles aient survécu plus longtemps, n'ont pas donné de fleurs au cours des années suivantes. La floraison des plantules sur ces sites semble avoir des causes physiologiques, dues probablement à un séjour prolongé de plus d'un an des plantules et au transfert de l'hormone florigène vers ces graines pendant la phase de floraison avant leur chute des arbres. Ces résultats corroborent ceux de Waheed Khan (1969) chez *Eucalyptus rudis* et chez *E. camaldulensis* qui a observé que la plantule donnant des fleurs chez *E. rudis* (ex. Australie) continue à donner des fleurs et des fruits en quantités abondantes année après année et connaît un léger retardement de sa croissance végétative par rapport à la plantule normale. Au contraire, la plantule donnant des fleurs chez *E. camaldulensis* subit une stagnation de sa croissance végétative, ne donne pas de fleurs au cours des années suivantes et meurt dans les 2,5 à 3 ans après la plantation initiale.

La maturité sexuelle précoce observée à Nowrangpur (Orissa) chez quatre plants âgés de 3 à 5 ans (0,0027 %) et à Piska Nagri (Ranchi) chez huit plants âgés de 2 à 3 ans semble être d'origine génétique étant donné que la maturité sexuelle précoce a été observée chez seulement 8 des 24 individus expérimentaux issus des 24 arbres supérieurs. De plus, quatre de ces huit arbres (Ds_1 à

Ds4) proviennent du même site, Dhamtari Sorgaom dans le Madhya Pradesh, et la fréquence des plants à maturité précoce est seulement de 0,666 % chez six individus. Les plants présentant une maturité sexuelle précoce à Nowrangpur (Orissa) proviennent également du même site, Umerkote. Ces observations indiquent que la maturité précoce chez *T. arjuna* est fonction des pools à pollinisation ouverte et de l'emplacement naturel dans les forêts.

L'existence de plants à floraison normale, précoce ou tardive dans les populations de *T. arjuna* et *T. tomentosa* à Piska Nagri confirme les observations rélevées chez un grand nombre d'espèces pour les différences d'époque et/ou de durée de floraison (Ashton, 1975 ; Bawa, 1983 ; Cooper, 1959 ; Florence, 1964 ; Frankie et coll., 1974 ; McNeilly et Antonovics, 1968 ; Medway, 1972 ; Stern et Roche, 1974 ; Westerman, 1971). Chez ces populations, il existe un potentiel de modification des fréquences alléliques dans le pool des pollens à croisement sans consanguinité au cours de l'époque de floraison car la floraison qui se produit à différentes époques peut présenter différentes fréquences de génotypes. Des chercheurs ont discuté cette question (Bijlsma et coll., 1986 ; Friedman et Adams, 1984 ; Stern et Roche, 1974 ; Stam, 1983) et Fripp et coll. (1987) ont tenté de mesurer les fréquences alléliques au niveau de trois locus enzymatiques connus chez *Eucalyptus regnans* en tenant compte des variations entre plants de la phénologie de la floraison et de la fécondité dans le pool des pollens à croisement sans consanguinité. De plus, la variation de l'époque de floraison à l'intérieur des classes de génotypes du gène de la floraison précoce (Ef ef) chez la laitue (*Lactuca sativa*) suggère que plusieurs gènes pourraient gouverner l'époque de floraison (Ryder, 1988). Ces observations peuvent s'appliquer à *T. arjuna* et *T. tomentosa* chez lesquels les arbres présentent des différences pour ce qui concerne leurs dates de première floraison, de floraison moyenne et de dernière floraison et dont la durée de floraison est de 20 à 40 jours.

Aucune différence significative n'a été décelée pour ce qui concerne la coloration du pollen et la taille des divers organes floraux entre les arbres à floraison précoce et ceux à floraison tardive chez les deux espèces, ce qui indique que ces arbres sont physiologiquement normaux chez les deux espèces. Par contre, chez les deux espèces, les organes floraux des plantules donnant des fleurs sont plus petits que ceux observés chez les plants normaux et fleurissent hors-saison, ce qui semble avoir affecté la viabilité des graines à Sundergarh où la plantule anormale a donné des fruits. De plus, la coloration du pollen étant également inférieure et en l'absence de pools de pollens sans consanguinité du fait de la floraison hors-saison, la fertilité des plants est médiocre.

La formation régulière de 12 bivalents aux stades diacinèse/MI et la disjonction égale des chromosomes au stade AI des plants normaux, à maturité sexuelle précoce/tardive, à floraison précoce/tardive et des plantules donnant des fleurs chez les deux espèces indiquent que ces différences de comportement floral pour ce qui concerne l'âge minimal nécessaire à la maturité sexuelle, l'époque et/ou la durée de floraison chez *T. arjuna* et *T. tomentosa* pourraient avoir des causes génétiques plutôt que cytologiques/chromosomiques.

L'étude présentée ici ouvre les nouvelles orientations suivantes dans les recherches sur le genre *Terminalia* :

1) Isolement de souches/génotypes à floraison des plantules par croisement des plantules donnant des fleurs.

2) Isolement de souches/génotypes à maturité sexuelle précoce par croisement des plants à maturité précoce.

3) Mesure des fréquences alléliques au niveau des locus enzymatiques connus par l'étude approfondie des variations de la phénologie de floraison et de la fécondité entre les plants.

4) Estimation du nombre de gènes responsables de la floraison précoce par l'étude de la ségrégation à partir de croisements entre des plants à floraison précoce et des plants à floraison tardive pour le groupe précoce pendant une même saison.

Brief note

PERFORMANCE OF BIVOLTINE BREEDS OF SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS

V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ

Regional Sericultural Research Station, PO Box 21, Coonoor - 643 101, India.

*Twenty-eight bivoltine breeds of silkworm (**Bombyx mori** L.) of different geographical regions were reared in summer and spring seasons during 1988-90, i.e. for three years, at Regional Sericultural Research Station, Coonoor, at an altitude of about 6000 ft (1 800 m) above mean sea level in the Nilgiri hills of Western Ghat. Their performances were analysed statistically for five characters. The analysis made on means over a number of traits, viz. effective rate of rearing (ERR) per 10,000 larvae brushed, single cocoon weight, single shell weight, shell ratio percentage and filament length, showed the superiority of 12 breeds out of the total 28 breeds studied. These topmost breeds in their order of performance for all the above-mentioned traits are as follows : $J_2(M)$, SPJ_2, $J_2(P)$, SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_{1SS}$, C_{108} and M_{10}.*

Keywords : *Bombyx mori*, cocoon weight, shell weight, shell ratio, filament length, seasons, breeds, least significant difference.

INTRODUCTION

Evaluation of superior silkworm breeds presupposes recommendation on their release to the field for proper exploitation in different seasons. Datta and Pershad (1987) emphasised the importance of selection of parental material and biometrical evaluation of the breeds as a prerequisite for their utilization in future breeding programmes.

In the present study, the rearing performances of 28 bivoltine breeds collected from different geographical regions, including some exotic breeds, have been recorded. These breeds have been maintained since 1988 in the 'bivoltine germplasm bank' of Regional Sericultural Research Station (RSRS), Coonoor, as the climatic conditions prevalent here are most congenial for rearing bivoltine silkworms. The observations were made on ERR/10,000 larvae, single cocoon weight, single shell weight, shell ratio percentage and filament length. Data were statistically analysed to select the best breeds.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted in the summer and spring seasons during 1988-90, i.e. for three years, at RSRS (Central Silk Board), Coonoor, at an altitude of about 6000 feet above mean sea level in the Nilgiri Hills of Western Ghat.

All the 28 breeds (Table I) were reared under laboratory conditions at a temperature of 26 °C-29 °C and humidity of 70-85 % with three replications of one laying each, following the standard rearing technology by Krishnaswami (1978, 1979).

Analyses of variance of the traits (characters) for two seasons, 28 breeds, breeds × seasons interactions, and lsd (least significant difference) at 5 % level were made according to the method described by Pershad *et al.* (1986). A simple method of taking decision on means over a number of

Table I. Salient features of the 28 breeds of bivoltine silkworm used in the study.

Tableau I. Caractéristiques principales des 28 souches de vers à soie bivoltines utilisées dans cette étude.

Sl no. *N° de série*	Breed *Souche*	Origin/ source *Origine/ source*	Larval marking *Marquage larvaire*	Cocoon colour *Couleur du cocon*	Cocoon shape *Forme du cocon*	Size of grains *Taille des graines*
1	Alps Yellow	Europe	Plain *Uni*	Dull yellow *Jaune pâle*	Elongated, oval with little constriction *Allongé, ovale légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
2	Ascolic yellow	Europe	Plain *Uni*	Buff yellow *Jaune chamois*	Elongated, constricted *Allongé, ceintré*	Medium *Intermédiaire*
3	AWC	Europe	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Ordinary *Ordinaire*
4	Cevense yellow	Europe	Plain *Uni*	Flesh yellow *Chair*	Elongated oval with little constriction *Ovale allongé légèrement ceintré*	Ordinary *Ordinaire*
5	C_{108}	China *Chine*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Ordinary *Ordinaire*
6	$2C_1ss$	China *Chine*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Elliptical *Elliptique*
7	J_1(M)	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Elongated constricted *Allongé ceintré*	Ordinary *Ordinaire*
8	J_2(P)	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Elongated oval *Ovale allongé*	Medium *Intermédiaire*
9	J_2(M)	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Deeply constricted *Fortement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
10	J_{112}	Japan *Japon*	Plain and marked *Uni et marqué*	White *Blanc*	Elongated, constricted *Allongé, ceintré*	Medium *Intermédiaire*
11	J_{122}	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval, mildly constricted *Ovale, légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
12	J_{191}(P)	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Mildly constricted *Légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
13	J_{191}(M)	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Mildly constricted *Légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*

Continued / *Suite page suivante*

Table I (continued) / *Tableau I (suite).*

Sl no. *N° de série*	Breed *Souche*	Origin/ source *Origine/ source*	Larval marking *Marquage larvaire*	Cocoon colour *Couleur du cocon*	Cocoon shape *Forme du cocon*	Size of grains *Taille des graines*
14	J_2C_2	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Mildly constricted *Légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
15	M_2	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Slightly constricted *Légèrement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
16	M_5	Japan *Japon*	Plain and marked *Uni et marqué*	White *Blanc*	Deeply constricted *Fortement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
17	M_8	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Constricted *Ceintré*	Medium *Intermédiaire*
18	M_{10}	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Deeply constricted *Fortement ceintré*	Medium *Intermédiaire*
19	NN_6D	China *Chine*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval short cocoons *Cocons ovales courts*	Ordinary *Ordinaire*
20	NB_1	CSRTI Mysore (India / *Inde*)	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Medium *Intermédiaire*
21	NB_1C	CSRTI Mysore (India / *Inde*)	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Medium *Intermédiaire*
22	NB_3	India *Inde*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Medium *Intermédiaire*
23	SPC_1	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval, short cocoons *Cocoons courts ovales*	Medium *Intermédiaire*
24	SPJ_1	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Slender constricted *Mince et ceintré*	Medium *Intermédiaire*
25	SPJ_2	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Slender constricted *Mince et ceintré*	Medium *Intermédiaire*
26	$T_1(P)$	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Elongated oval *Ovale allongé*	Medium *Intermédiaire*
27	$T_1(M)$	Japan *Japon*	Marked *Marqué*	White *Blanc*	Deeply constricted *Fortement ceintré*	Ordinary *Ordinaire*
28	Yakwei	Japan *Japon*	Plain *Uni*	White *Blanc*	Oval *Ovale*	Medium *Intermédiaire*

traits based on lsd, as suggested by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984), was followed for each trait. The method consists of the following steps :

i) Forming overlapping groups of means arranged in order of magnitude on the basis of tests like lsd or Duncan's multiple range test.

ii) Assigning a score of 1 to the topmost (in order of preference) group, 2 to the next and so on.

iii) Assigning a score, si, to each entity, i, studied where si = average of the scores of all groups to which the mean for that entity belongs.

iv) Standardizing the si to get si/No. of groups.

Finally, a score (si) is obtained for each entity where $si = \Sigma s_{ij}$ (where j = number of traits).

The results were interpreted according to Lush (1954), Sprague (1955) and Kempthrone (1957).

RESULTS AND DISCUSSION

The average value (mean ± standard deviation) of each trait and the least significant difference (lsd) value at 5 % level of 28 breeds for 3 years are presented in Table II. The analysis of variance (ANOVA) for breeds, seasons and breeds × season interactions is presented in Table III.

Based on lsd values at 5 % level the breeds found to be superior in the order of merit for 5 characters are as follows :

1. Effective rate of rearing (ERR) per 10,000 larvae brushed :

J_{122}, M_2, M_5, NB_1, M_8, NB_3 (all these breeds are superior in both summer and spring seasons), J_{112}, $2C_1ss$, $J_1(M)$, NB_1C, Yakwei, Cevense Yellow, $J_2(P)$, $J_2(M)$, J_2C_2, SPC_1, C_{108}, $J_{191}(P)$, M_{10} (all these breeds are superior in the spring season only), SPJ_2, AWC and NN_6D (all these breeds are superior in the summer season only).

2. Single cocoon weight :

Alps Yellow, J_{122}, $J_2(M)$, NB_1 and C_{108}.

3. Single shell weight :

$J_2(M)$, $J_2(P)$, SPJ_2, NB_1C, SPJ_1, NB_1, J_{122}, M_2, M_5, $2C_1ss$, NB_3, SPC_1, M_8, $J_1(M)$, M_{10}, $J_{191}(M)$, $T_1(M)$, Yakwei, C_{108}, Alps Yellow, $T_1(P)$ and $J_{191}(P)$.

4. Shell ratio (SR %) :

SPJ_2, $J_2(P)$, NB_1C, SPC_1, SPJ_1, $J_2(M)$, M_2 and M_{10}.

5. Filament length :

SPJ_1, $2C_1ss$, SPJ_2, NB_1C, NN_6D, $J_2(M)$, SPC_1, NB_1, $J_2(P)$, $J_{191}(M)$ and $T_1(P)$.

The analysis made on means over a number of traits, viz. ERR, single cocoon weight, single shell weight, SR % and filament length, showed the superiority of 12 breeds out of the total 28 breeds. These topmost breeds in their order of performance for all the above-mentioned traits are as follows : $J_2(M)$, SPJ_2, $J_2(P)$, SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_1ss$, C_{108} and M_{10}.

The analysis of variance for breeds, seasons and breed × season interaction reveals the following results :

Breeds :

All the breeds showed significant differences at 95 % probability for ERR, single shell weight, silk ratio percentage and filament length, whereas cocoon weight did not show any appreciable difference among the breeds studied.

Table II. Performance of bivoltine breeds of silkworms maintained at Regional Sericultural Research Station, Coonoor, India.

Tableau II. Performance des souches de vers à soie bivoltines conservées à la Regional Sericultural Research Station de Coonoor, Inde.

Sl no. / N° de série	Breed / Souche	ERR/10,000 larvae brushed (no.) / Taux effectif d'élevage pour 10 000 larves levées (nombre)	Cocoon weight (g) / Poids d'un cocon (g)	Shell weight (g) / Poids d'une coque (g)	Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	Filament length (m) / Longueur du filament (m)
1	J_{122}	9438 ± 281*	1.90 ± 0.20*	0.338 ± 0.048*	17.90 ± 0.66	966 ± 46
2	M_2	9348 ± 303*	1.67 ± 0.16	0.335 ± 0.046*	19.90 ± 1.44*	1011 ± 146
3	M_5	9266 ± 229*	1.72 ± 0.08	0.333 ± 0.027*	19.45 ± 1.90	1028 ± 149
4	NB_1	9245 ± 381*	1.82 ± 0.18*	0.348 ± 0.042*	19.30 ± 1.16	1054 ± 149*
5	M_8	9218 ± 352*	1.74 ± 0.19	0.328 ± 0.444*	18.93 ± 1.07	989 ± 168
6	NB_3	9196 ± 229*	1.76 ± 0.08	0.332 ± 0.26*	18.87 ± 1.08	1014 ± 106
7	J_{112}	9102 ± 650*	1.75 ± 0.13	0.288 ± 0.036	16.48 ± 1.48	807 ± 78
8	$2C_1ss$	9018 ± 585*	1.76 ± 0.13	0.333 ± 0.047*	18.93 ± 1.57	1148 ± 138*
9	$J_1(M)$	8965 ± 709*	1.70 ± 0.14	0.328 ± 0.058*	19.28 ± 2.00	965 ± 188
10	NB_1C	8932 ± 811*	1.73 ± 0.13	0.355 ± 0.046*	20.42 ± 1.27*	1104 ± 78*
11	AWC	8926 ± 681	1.74 ± 0.19	0.307 ± 0.034	17.07 ± 0.71	973 ± 97
12	Yakwei	8901 ± 625*	1.77 ± 0.18	0.317 ± 0.030*	17.92 ± 1.20	962 ± 164
13	Cevense Yellow	8867 ± 943*	1.74 ± 0.16	0.297 ± 0.035	17.12 ± 1.32	940 ± 152
14	SPJ_1	8868 ± 841*	1.72 ± 0.15	0.352 ± 0.067*	20.25 ± 2.22*	1171 ± 240*
15	SPJ_2	8865 ± 982*	1.67 ± 0.10	0.355 ± 0.052*	21.22 ± 2.69*	1108 ± 196*
16	$J_2(P)$	8803 ± 888*	1.76 ± 0.18	0.365 ± 0.047*	20.67 ± 1.19*	1032 ± 111*
17	$J_2(M)$	8707 ± 867*	1.83 ± 0.14*	0.367 ± 0.056	20.15 ± 1.41*	1070 ± 87*
18	J_2C_2	8690 ± 1044*	1.73 ± 0.12	0.305 ± 0.049	17.43 ± 2.06	949 ± 101
19	SPC_1	8565 ± 1191*	1.65 ± 0.18	0.330 ± 0.055*	20.38 ± 2.45*	1069 ± 95*
20	C_{108}	8564 ± 685*	1.80 ± 0.08*	0.315 ± 0.027*	17.62 ± 1.18	877 ± 133
21	$J_{191}(P)$	8528 ± 1341*	1.69 ± 0.18	0.308 ± 0.046*	18.27 ± 0.74	1024 ± 56
22	M_{10}	8509 ± 472	1.69 ± 0.08	0.327 ± 0.019*	19.78 ± 0.78	861 ± 67
23	NN_6D	8417 ± 1420	1.61 ± 0.17	0.302 ± 0.037	18.28 ± 0.90	1071 ± 117*
24	Ascolic Yellow	8397 ± 539	1.55 ± 0.20	0.270 ± 0.028	16.41 ± 1.08	1015 ± 127
25	$T_1(P)$	8258 ± 976	1.66 ± 0.05	0.310 ± 0.042*	18.38 ± 2.22	1051 ± 102*
26	Alps Yellow	8157 ± 1386	1.92 ± 0.27*	0.315 ± 0.056*	16.41 ± 1.16	953 ± 176
27	$T_1(M)$	8145 ± 1553	1.68 ± 0.14	0.318 ± 0.051*	18.52 ± 1.40	902 ± 143
28	$J_{191}(M)$	7229 ± 2455	1.64 ± 0.15	0.323 ± 0.045*	19.55 ± 1.39	1059 ± 102*
	Lsd	847	0.13	0.059	1.46	141

* Signficant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
Data are presented as mean ± standard deviation / *Les données indiquent la moyenne ± l'écart type.*
Lsd : Least significant difference at 5 % level / *Différence la moins significative au seuil de 5 %.*

Table III. Analysis of variance of bivoltine silkworm breeds.

Tableau III. Analyse de variance des souches de vers à soie bivoltines.

Source	DF	ERR × 10^3		Single cocoon wt		Single shell wt		Shell ratio		Filament length	
		SS	MS	SS	MS	SS	MS	SS	MS	SS	MS
Source	*DL*	*ERR × 10^3*		*Poids d'un cocon*		*Poids d'une coque*		*Richesse soyeuse*		*Longueur de la bave*	
		SC	*MC*	*SC*	*MC*	*SC*	*MC*	*SC*	*MC*	*SC*	*MC*
Treatment / *Traitement*	27	49279	1852.1	7.925	0.293	1.109	0.041	317.03	11.74	791032	29297
Replication / *Réplicat#*	5	10786	2157.2	8.067	1.613	0.217	0.043	86.91	17.38		
Breeds / *Souches* (F)	27	10410	385.6** (8.24)	6.405	0.237** (6.58)	2.598	0.096* (2.53)	287.71	10.65** (6.42)	354277	13121* (3.94)
Season / *Saison* (F)	1	2121.9	2121.9** (45.34)	0.032	0.032 (0.89)^{NS}	0.057	0.057 (1.50)^{NS}	3.24	3.24^{NS} (1.95)	1824	1824^{NS} (0.55)
Breeds × season *Souches × saisons* (F)	27	12731	471.5** (10.1)	0.912	0.034 (0.94)^{NS}	1.867	0.069 (1.82)^{NS}	95.31	3.53 (2.13)	160613	5949 (1.79)^{NS}
Error / *Ecart*	135	6315	46.8	4.864	0.036	5.137	0.038	223.59	1.66	449079	3327

* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*
DF : Degree of freedom. **ERR** : Effective rate of rearing. SS : Sum of squares. **MS** : Sum of mean squares. # : 3 years with 2 seasons per year.
***DL** : Degré de liberté. **ERR** : Taux effectif d'élevage. **SC** : Somme des carrés. **MC** : Somme des carrés moyens. # : Sur trois ans à raison de deux saisons par an.*

Season :

Only ERR character was found to be highly influenced by seasons. All the other characters, viz. cocoon weight, shell weight, silk ratio percentage and filament length, showed non significant differences in the spring and summer seasons at 5 % level.

Breeds × season :

A highly significant interaction was found between breeds reared in the spring and summer seasons for ERR character, whereas the interactions for the remaining four characters were non significant.

CONCLUSION

The main purpose to undertake this study was to evaluate the performance of 28 bivoltine silkworm breeds maintained at RSRS, Coonoor, since 1988. The climatic conditions, being most congenial for rearing bivoltine silkworms, have prompted us to plan a silkworm breeding programme. The first step in this direction is to evaluate all the breeds for each trait in different seasons and then to select a few breeds which are superior for most of these traits valuable to silk industry. The data of all the 28 breeds for the past three years, i.e. 1988-90, were analysed statistically. All these breeds were reared twice a year, i.e. in the summer and spring seasons. The results of the analysis made on the means over a number of traits, viz. ERR/10,000 larvae brushed, single cocoon weight, single shell weight, shell ratio % and filament length, showed the superiority of 12 breeds out of the total 28 breeds studied. These topmost breeds in their order of merit for all the above-mentioned traits are as follows : J_2(M), SPJ_2, J_2(P), SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_1$ss, C_{108} and M_{10}. The results of our study showed that only ERR character is influenced by seasons, whereas the other characters did not change significantly. Based on the least significant difference (lsd) values at 5 % level the breeds found to be superior for ERR in the order of merit are as follows : J_{122}, M_2, M_5, NB_1, M_8, NB_3 (all these breeds are superior in both summer and spring seasons), J_{122}, $2C_1$ss, J_1(M), NB_1C, Yakwei, Cevense Yellow, J_2(P), J_2(M), J_2C_2, SPC_1, C_{108}, J_{191}(P) and M_{10} (all these breeds are superior in spring seasons only), AWC, SPJ_2 and NN_6D (all these breeds are superior in summer seasons only). This suggests the possibility to exploit different breeds' potential for gaining maximum cocoon yield by rearing them in either of the suitable seasons, since a highly significant interaction was found between breeds reared in spring and summer seasons for ERR character. The results of this study will be employed in selecting a few important topmost breeds for our next breeding programme to be initiated at this station.

REFERENCES

ARUNACHALAM V., BANDYOPADHYAY A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of dependent characters. Indian J. Genet., 44, 419-424.

DATTA R.K., PERSHAD G.D. (1988) Combining ability among multivoltine × bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids. Sericologia, 28(1), 21-29.

KEMPTHRONE O. (1957) The partition of variance. *In* An Introduction to Genetic Statistics. Wiley, New York, Chapt. 13, pp. 224-269.

KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Bull. 2, pp. 1-10.

KRISHNASWAMI S. (1979) Improved method of rearing young age (chawki) silkworms. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Bull. 3, pp. 23-24.

LUSH J.L. (1954) Breeding structure of populations. I. General considerations. *In* Statistics and Mathematics in Biology. Ed. Kempthrone *et al.*, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, Chapt. 42.

PERSHAD G.D., DATTA R.K., VIJAYAKUMAR H.V., BHARGAVA S.K., JOLLY M.S. (1986) Performance of some multivoltine races of *Bombyx mori* L. Sericologia, 26(3), 295-301.

SPRAGUE G.F. (1955) Corn and Corn Improvement. Acad. Press, New York.

Note brève

PERFORMANCE DE RACES BIVOLTINES DE VERS A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) A HAUTE ALTITUDE

V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ

Regional Sericultural Research Station, PO Box 21, Coonoor - 643 101, Inde.

*Vingt-huit races de vers à soie (**Bombyx mori** L.) provenant de différentes zones géographiques ont été élevées au cours des saisons d'été et de printemps de 1988 à 1990, soit pendant trois ans, à la Regional Sericultural Research Station de Coonoor à une altitude d'environ 6000 pieds (1 800 mètres) dans les monts Nilgiri des Ghats occidentaux. Leurs performances ont été analysées statistiquement pour cinq caractères. L'analyse, basée sur les valeurs moyennes d'un certain nombre de caractères, à savoir : le taux effectif d'élevage (ERR) pour 10 000 larves levées, le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament, fait apparaître la supériorité de 12 races sur les 28 étudiées. Par ordre de performances pour les caractères mentionnés ci-dessus, ces races supérieures sont : $J_2(M)$, SPJ_2, $J_2(P)$, SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_{1SS}$, C_{108} et M_{10}.*

INTRODUCTION

L'évaluation de races de vers à soie supérieures implique que des recommandations préalables ont été faites quant à leur utilisation sur le terrain pour une exploitation optimale au cours des différentes saisons. Datta et Pershad (1987) ont souligné l'importance du rôle joué par la sélection du matériel parental et par l'évaluation biométrique des souches avant la mise en place de programmes de sélection.

Dans cette étude, on a enregistré les performances d'élevage de 28 races bivoltines, comprenant certaines races exotiques, prélevées dans différentes zones géographiques. Ces races ont été maintenues depuis 1988 à la "banque génétique bivoltine" de la Regional Sericultural Research Station de Coonoor, les conditions climatiques de cette région étant tout à fait favorables à l'élevage du ver à soie bivoltin. Les observations portent sur le taux effectif d'élevage pour 10 000 larves, le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament. Les données ont été analysées statistiquement avant la sélection des races les plus performantes.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences ont été effectuées au cours des saisons d'été et d'automne de 1988 à 1990, soit pendant trois ans, à la RSRS (Central Silk Board) de Coonoor, située dans les monts Nilgiri des Ghats occidentaux à une altitude d'environ 1800 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Les vingt-huit races (Tableau I) ont été élevées en laboratoire à une température de 26 à 29 °C et une humidité de 70 à 85 % en trois répliquats d'une ponte, suivant la technique d'élevage standard de Krishnaswami (1978, 1979).

L'analyse de variance des caractères pour les deux saisons, les 28 races, les interactions races × saisons et la différence la moins significative au seuil de 5 %, a été faite selon la méthode décrite par Pershad et coll. (1986). Pour décider des moyennes d'un certain nombre de caractères, on a suivi une méthode simple, suivant les recommandations de Arunachalam et Bandyopadhyay (1984), basée sur la plus faible différence (lsd). La méthode comporte les trois étapes suivantes :

1) Formation de groupes de moyennes imbriqués et arrangés par ordre de grandeur sur la base de tests comme la lsd ou le test à portée multiple de Duncan.

2) Attribution du chiffre 1 au groupe supérieur (par ordre de préférence), du chiffre 2 au groupe suivant, etc.

3) Attribution d'un score "si" à chaque entité "i" étudiée où si = moyenne des scores de tous les groupes auxquels appartient la moyenne de cette entité.

4) Normalisation du si pour obtenir le si/nombre de groupes.

Enfin, on obtient un score (si) pour chaque entité où si = Σ_{ij} (où j = nombre de caractères).

Les résultats ont été interprétés d'après les méthodes de Lush (1954), Sprague (1955) et Kempthrone (1957).

RESULTATS ET DISCUSSION

La valeur moyenne (moyenne × écart type) de chaque caractère et la plus faible différence (lsd) au seuil de 5 % pour les 28 races étudiées pendant 3 ans sont présentées dans le tableau II. L'analyse de variance (ANOVA) pour les races, les saisons et les interactions races × saisons est présentée dans le tableau III.

Sur la base des valeurs de la lsd au seuil de 5 %, les races qui se sont révélées les plus performantes pour les cinq caractères considérés sont les suivantes :

1. Taux effectif d'élevage (ERR) pour 10 000 larves levées :

J_{122}, M_2, M_5, NB_1, M_8, NB_3 (toutes ces races sont supérieures à la fois en été et au printemps), J_{122}, $2C_1ss$, $J_1(M)$, NB_1C, Yakwei, Cevense Yellow, $J_2(P)$, $J_2(M)$, J_2C_2, SPC_1, C_{108}, $J_{191}(P)$, M_{10} (toutes ces races sont supérieures seulement au printemps), SPJ_2, AWC et NN_6D (ces races sont supérieures seulement en été).

2. Poids d'un cocon :

Alps Yellow, J_{122}, $J_2(M)$, NB_1 et C_{108}.

3. Poids d'une coque :

$J_2(M)$, $J_2(P)$, SPJ_2, NB_1C, SPJ_1, NB_1, J_{122}, M_2, M_5, $2C_1ss$, NB_3, SPC_1, M_8, $J_1(M)$, M_{10}, $J_{191}(M)$, $T_1(M)$, Yakwei, C_{108}, Alps Yellow, $T_1(P)$ et $J_{191}(P)$.

4. Richesse soyeuse (SR %) :

SPJ_2, $J_2(P)$, NB_1C, SPC_1, SPJ_1, $J_2(M)$, M_2 et M_{10}.

5. Longueur du filament :

SPJ_1, $2C_1ss$, SPJ_2, NB_1C, NN_6D, $J_2(M)$, SPC_1, NB_1, $J_2(P)$, $J_{191}(M)$ et $T_1(P)$.

L'analyse réalisée sur les moyennes d'un certain nombre de caractères, à savoir : ERR, poids d'un cocon, poids d'une coque, richesse soyeuse et longueur du filament, révèle que 12 des 28 souches sont supérieures. Par ordre de performance pour tous les caractères mentionnés ci-dessus, ces races supérieures sont : $J_2(M)$, SPJ_2, $J_2(P)$, SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_1ss$, C_{108} et M_{10}.

L'analyse de variance pour les races, les saisons et les interactions races × saisons fait apparaître les résultats suivants :

Races :

Toutes les races présentent des différences significatives à un taux de probabilité de 95 % pour l'ERR, le poids d'une coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament, tandis que le poids d'un cocon ne donne aucune différence appréciable entre les races étudiées.

Saison :

Seul l'ERR est fortement influencé par les saisons. Tous les autres caractères, à savoir : le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament, ne révèlent aucune différence significative au seuil de 5 % pour les deux saisons considérées.

Races × saisons :

L'ERR donne une interaction fortement significative entre les élevages de printemps et d'automne, alors que les quatre autres caractères ne font apparaître aucune interaction significative.

CONCLUSION

Le principal but de cette étude était d'évaluer la performance de 28 races de vers à soie bivoltins élevés à la RSRS de Coonoor depuis 1988. Les conditions climatiques, qui sont tout à fait propices à l'élevage des vers à soie bivoltins, nous ont incités à engager un programme de sélection du ver à soie. La première étape consiste à évaluer les caractères de toutes les races en fonction des saisons puis, dans un deuxième temps, à sélectionner quelques unes des races qui se sont révélées supérieures pour la plupart des caractères d'intérêt commercial. Les données obtenues pour ces 28 races sur trois ans (1988 à 1990) ont été analysées statistiquement. Toutes ces souches ont été élevées deux fois par an, à savoir en été et au printemps. Les résultats de l'analyse des moyennes d'un certain nombre de caractères, soit le taux effectif d'élevage pour 10 000 larves levées, le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament, révèle que 12 des 28 races étudiées sont supérieures. Par ordre de performances pour les caractères mentionnés ci-dessus, ces races supérieures sont : J_2(M), SPJ_2, J_2(P), SPJ_1, SPC_1, NB_1C, NB_1, J_{122}, M_2, $2C_1ss$, C_{108} et M_{10}. Les résultats de notre étude montre que, seul, le taux effectif d'élevage est influencé par les saisons, tandis que les autres caractères ne varient pas de manière significative. Sur la base des valeurs de la plus petite différence (lsd) au seuil de 5 %, les races supérieures pour le taux effectif d'élevage sont, par ordre de performance : J_{122}, M_2, M_5, NB_1, M_8, NB_3 (toutes ces souches sont performantes aussi bien en été qu'au printemps), J_{122}, $2C_1ss$, J_1(M), NB_1C, Yakwei, Cevense Yellow, J_2(P), J_2(M), J_2C_2, SPC_1, C_{108}, J_{191}(P) et M_{10} (ces souches étant performantes uniquement au printemps), AWC, SPJ_2 et NN_{6D} (souches performantes uniquement en été). Ceci montre qu'il est possible d'exploiter le potentiel de différentes races afin d'obtenir un rendement en cocons maximal en les élevant à l'une ou l'autre des saisons favorables étant donné qu'une interaction significative a été observée entre l'élevage de printemps et d'automne pour le taux effectif d'élevage. Les résultats de cette étude permettront de sélectionner quelques races performantes dans le programme de sélection qui doit prochainement être mis en place dans notre station.

Brief note

PRELIMINARY STUDIES ON THE YIELD POTENTIAL OF NEW MULBERRY STRAINS

S.B. DANDIN[1], L. RAJANNA[2], MALA V. RAJAN[2] & SARAT CHANDRA[3]

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

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

3. Silkworm and Mulberry Germplasm Station, B 130 & 131 Sipcot Colony, Hosur - 635 126, India.

Promising mulberry lines isolated from open-pollinated hybrid lines and controlled hybridization experiments were tested for their growth and yield performance at Regional Sericultural Research Station, Kodathi (Bangalore, India). Trials were conducted by following 5 × 5 lattice design with four replications each. Growth and yield parameters were observed for two years and the data presented are the average of 10 crops. The results of these experiments are discussed in this paper with the recommendation of a few top scoring lines for final yield trial.

Keywords : Varietal trial, yield parameters, genotype screening.

INTRODUCTION

The silkworm (*Bombyx mori* L.) is exclusively dependent on the mulberry (*Morus* spp.) for food. Hence, silk production is directly dependent on the quantity and quality of mulberry leaves produced. To improve the leaf productivity, mulberry improvement programmes are being carried out by various institutions. High yielding varieties/lines evolved by breeders need to be tested for various agronomic characters, quality and yield potential. Since such evolved varieties/lines are large in number, they are first subjected to a preliminary yield trial where the population of each variety/line are limited in number. Since mulberry is a perennial crop with a large amount of variability, all the strains available cannot be tested at one stretch. Hence a three-tier method of testing, viz. individual character, yield and quality, is found suitable. Based on the individual character analysis, progenies obtained from open-pollinated and cross-pollinated hybrid populations were put for primary yield trial. The results of the same are presented in this paper. After the primary trials, the highest yielders are again tested for their yield and quality with a larger population. In the present case, 23 new lines were studied using S_{54} and Kanva-2 varieties as controls and the results are discussed in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Progenies obtained from various cross combinations as shown in Table I formed the basic material for this study. The progenies showing quite good sprouting, high rooting, good growth, branching and leaf character were visually selected and studied as suggested by Dandin and Jolly (1986) and screened for primary yield trial. Values for these characters are also given in Table I. The 23 elite strains which showed maximum values were further multiplied and subjected to preliminary yield trial at Regional Sericultural Research Station (RSRS), Bangalore. For each genotype, 48 plants

in the form of 4 month-old saplings were planted in 60 × 60 cm spacing in 4 replications each. Treatments were imposed after one year of planting. Plants were given a basal pruning at a height of 30 cm and 5 harvests were taken at an interval of 70 days. All the harvests were made by shoot pruning. Growth data, viz. height of plant, leaf weight, number of branches, moisture content, etc., were recorded on 5 selected plants following the method suggested by Dandin and Jolly (1986). Yield data were taken as leaves harvested on each plot and pooled later. Plots were given the regular cultural practices as recommended by Krishnaswamy (1976). Data collected for two years were subjected to statistical analysis.

Table I. Growth characters of strains included in the primary trial*.

Tableau I. Paramètres de croissance des lignées soumises au premier test*.

Sl no. / *N° de série*	Name of variety/line / *Nom de la variété/lignée*	Height (cm) / *Hauteur (cm)*	Number of shoots / *Nombre de pousses*	Internodal distance (cm) / *Distance interdonale (cm)*	Weight of 100 leaves (g) / *Poids de 100 feuilles (g)*	Moisture (%) / *Humidité (%)*	Rooting (%) / *Racinement (%)*
1	OPH P_{22}	205.00	18	2.20	329.00	70.50	91.40
2	OPH R_{10} P_{10}	145.00	19	3.63	452.00	75.00	98.48
3	OPH R10 B_{29}	212.00	20	4.09	327.00	79.24	86.13
4	OPH R_{14} P_1	191.00	17	2.76	273.00	74.35	86.07
5	OPH R_{16} P_1	190.00	15	2.81	291.00	74.22	98.00
6	OPH R_{20} P_{23}	245.00	21	3.15	400.00	70.05	90.05
7	S_{30} × BG_{776} R_{11} P_3	222.20	9	3.03	254.00	70.47	100.00
8	Jatinunt × S_{41} R_3 P_{11}	229.80	12	4.36	169.00	70.4	95.24
9	S_{54} × I_{19} R_6 P_1	218.00	14	2.74	294.00	69.38	84.62
10	R_{13} P_{12}	217.20	9	3.57	314.00	69.7	87.50
11	K_2 × S_{41} R_5 P_{12}	248.40	8	4.94	314.00	69.15	96.15
12	R_5 P_{16}	158.60	5	4.40	340.00	71.0	76.60
13	S_{54} × Kosen P_8	195.00	14	3.42	260.00	69.0	74.00
14	S_{36} × S_{41}	173.80	11	3.30	255.00	69.0	74.00
15	Local × RFS_{135} P_{10}	192.20	8	3.86	220.00	71.0	97.00
16	S_{30} × Ber_{776} R_3 P_4	242.80	7	4.25	308.00	70.0	94.00
17	R_4 P_{25}	213.00	9	3.95	334.00	73.05	100.00
18	R_7 P_3	186.00	6	3.62	294.00	72.78	96.00
19	S_{36} × S_{41} P_5	190.20	9	3.58	265.00	70.0	80.00
20	P_{11}	189.00	15	3.99	335.00	71.0	76.00
21	S_{36} × RFS_{175} R_2 P_{15}	135.60	15	3.55	264.00	72.0	80.00
22	S_{30} × Ber_{776} R_9 P_{20}	189.60	9	3.39	219.00	70.31	100.00
23	R_{10} P_{22}	196.20	9	3.90	249.00	71.88	100.00
24	S_{54} (Control / *Témoin*)	118.65	10	4.36	296.00	70.75	75.00
25	K_2 (Control / *Témoin*)	117.75	7	4.52	254.00	75.50	80.00

* Regional Sericultural Research Station, Bangalore (India / *Inde*).

Table II. Yield and growth parameters of the mulberry varieties/lines tested.

Tableau II. Paramètres du rendement et de la croissance des variétés/lignées de mûriers testées.

Sl no. / *N° de série*	Name of variety/line / *Nom de la variété/lignée*	Height of plant (cm) / *Hauteur du plant (cm)*	Total shoot length (cm) / *Longueur totale des pousses (cm)*	Yield of leaves per plant per crop (g) / *Rendement en feuilles par plant par récolte (g)*	Leaf moisture (%) / *Humidité des feuilles (%)*
1	OPH_{22}	119.00	245.75	221.50	69.25
2	OPH R_{10} P_{10}	115.00	235.25	239.75	72.00
3	OPH P_{29}	132.75	318.00	277.05	74.00
4	OPH R_{14} P_1	114.25	270.05	210.75	72.00
5	OPH R_{16} P_1	120.75	270.25	229.05	70.5
6	OPH R_{20} P_{23}	129.00	269.05	205.00	72.25
7	$S_{30} \times C_{776}$ R_{11} P_3	133.25	295.25	224.00	70.25
8	Janituni × S_{41} R_3 P_{11}	146.25	345.05	286.00	72.25
9	$S_{54} \times I_{19}$ R_6 P_1	131.25	281.00	219.25	73.00
10	$S_{54} \times I_{19}$ R_{13} P_{12}	134.25	289.00	244.05	73.75
11	$K_2 \times S_{41}$ R_5 P_{12}	125.75	266.25	192.75	74.00
12	$K_2 \times S_{41}$ R_5 P_{12}	127.75	289.00	212.75	69.50
13	S_{54} × Kosen P_{18}	130.75	337.00	233.25	72.25
14	$S_{36} \times S_{41}$ P_2	132.25	315.75	278.05	74.25
15	Local × RFS_{135} P_{10}	125.05	295.00	197.25	67.50
16	$S_{30} \times C_{776}$ R_3 P_4	133.75	335.75	253.05	71.75
17	$S_{30} \times C_{776}$ R_4 P_{25}	125.05	308.25	239.05	70.75
18	$S_{30} \times C_{776}$ R_7 P_3	138.00	306.50	245.05	69.75
19	$S_{36} \times S_{41}$ P_5	123.75	277.75	237.00	69.50
20	$S_{36} \times S_{41}$ P_{11}	126.00	306.75	202.05	71.25
21	$S_{36} \times RFS_{135}$ R_2 P_{15}	124.05	221.75	202.05	71.75
22	$S_{30} \times C_{776}$ R_9 P_{20}	130.75	326.25	257.00	73.50
23	$S_{30} \times C_{776}$ R_{10} P_{22}	140.00	296.05	253.75	74.25
24	S_{54}	118.75	273.25	232.75	70.75
25	Kanva 2	117.75	275.75	207.25	75.50
Standard error + / *Ecart type* +		4.179	23.815	6.891	0.556
CD (5 %)		11.584	66.01	61.823	0.776
F test / *Test F*		**	*	**	**

* Variation significant at 5 % / *Variation significativer à 5 %.*
** Variation significant at 1 % / *Variation significative à 1 %.*

RESULTS AND DISCUSSION

The average values of the observations on yield and growth parameters made for two years are presented in Table II. From the available data it is observed that Jatinuni × S_{41} R_3 P_{11} has yielded highest followed by $S_{36} \times S_{41}$ P_2, OPH P_{29}, $S_{30} \times C_{776}$ R_9 P_{20}, $S_{30} \times C_{776}$ R_{10} P_{22}, $S_{30} \times C_{776}$ R_3 P_4,

$S_{30} \times C_{776}$ R_7 P_3, $S_{54} \times I_{19}$ R_3 P_{12}, OPH R_{10}, P_{10}, $S_{30} \times C_{776}$ R_4 P_{25}, $S_{36} \times S_{41}$ P_5, $S_{54} \times$ Kosen P_8, S_{54} and OPH R_{16} PL. All these are statistically at par. Jatinuni $\times S_{41}$ R_3 P_{11} was observed to be the tallest followed by $S_{30} \times C_{776}$ R_{10} P_{22} and $S_{30} \times C_{776}$ R_7 P_3 which were also at par with the former, indicating their fast growing nature. Among those which have shown significantly higher leaf yields, all except OPH R_{10} P_1, S_{54} and OPH R_{16} P_1, have shown a significantly higher shoot length compared to others, S_{54} and Kanva-2 were at par and significantly above others in the number of leaves per meter length. The leaf moisture percentage was significantly high in Kanva-2 followed by $S_{36} \times S_{41}$ P_2, $S_{30} \times C_{776}$ R_{10} P_{22}, OPH P_{29}, Kanva-2 $\times S_{41}$ R_5 and $S_{54} \times I_{19}$ R_3 P_{12}. The F test indicated that the variation in total shoot length was significant at five per cent level while that in other parameters was significant at one per cent level.

A similar work was carried out in tropical India by Kasiviswanathan and Ieyngar (1965), Kasiviswanathan *et al.* (1977) and Kasiviswanathan *et al.* (1979) and, based on these studies, Kanva-2 was recommended to the field as a better yielder than Mysore Local and Berhampore varieties. Further, varieties S_{30}, S_{36}, S_{41} and S_{54} were isolated from the mutant population and tested for their yield (Jolly *et al.*, 1982 ; Anonymous, 1982). Based on the field data, varieties S_{36} and S_{54} were recommended for commercial cultivation. In the present study, K_2 and S_{54} were taken as controls for comparison of yield with that of the new selections.

REFERENCES

ANONYMOUS (1988) Multilocational trials of mulberry varieties under different agroclimatic conditions. Annual Report, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 30.

DANDIN S.B., JOLLY M.S. (1986) Collection, conservation and evaluation of mulberry (*Morus* spp.) germplasm. Central Sericultural Research and Training Institute, CSB, Mysore.

JOLLY M.S., SASTRY C.R., RAJU R., SUSHEELAMMA B.N., MANJUNATH P.B., GIRIDHAR K. (1982) Yield trial studies of evolved mulberry varieties - Final trial of evolved varieties of mulberry. Annual Report, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 9.

KASIVISWANATHAN K., IYENGDAR M.N.S. (1965) Preliminary observations on the varietal-cum-irrigational response to different 'N' levels on the seasonal and total yield of mulberry. Indian J. Seric., 4, 22-33.

KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S., VENKATARAMU C.V. (1977) Studies on varietal-cum-spacing and nitrogen fertilisation on the leaf yield of mulberry under irrigated condition in Karnataka State (India). Indian J. Seric., 16(1), 10-18.

KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S., CHOUDHURY P.C. (1979) Long-term studies on the variety, spacing and nitrogen fertilisation for the improvement of yield potential of mulberry. Indian J. Seric., 18(1), 23-29.

Note brève

ETUDES PRELIMINAIRES SUR LE POTENTIEL DE RENDEMENT DE NOUVELLES SOUCHES DE MURIERS

S.B. DANDIN[1], L. RAJANNA[2], MALA V. RAJAN[2] & SARAT CHANDRA[3]

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

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

3. Silkworm and Mulberry Germplasm Station, B 130 & 131 Sipcot Colony, Hosur - 635 126, Inde.

On a étudié la croissance et le rendement de lignées de mûriers prometteuses isolées à partir d'hybrides obtenus par pollinisation ouverte ou par hybridation contrôlée à la Regional Sericultural Research Station de Kodathi (Bangalore, Inde). Les essais ont été réalisées selon un dessin de plantation de 5 × 5 avec quatre réplicats pour chaque expérience. Les paramètres de croissance et de rendement ont été relevés pendant deux ans et les données présentées constituent la moyenne de 10 récoltes. Les résultats de ces expériences sont discutés dans cet article et l'on recommande quelques lignées très performantes pour l'évaluation finale du rendement.

INTRODUCTION

Le ver à soie (*Bombyx mori* L.) est tributaire du mûrier (*Morus* spp.) à l'exclusion de toute autre plante pour sa nourriture. La production de soie est donc directement subordonnée à la quantité et à la qualité de feuilles de mûriers produites. Pour améliorer la productivité en feuilles, des programmes d'amélioration du mûrier sont suivis par divers instituts. Il est nécessaire d'évaluer le potentiel de rendement et de qualité et les divers caractères agronomiques des lignées/variétés à haut rendement mises au point par les cultivateurs. Etant donné le grand nombre de nouvelles variétés/lignés isolées, on les soumet en premier lieu à un test préliminaire sur le rendement avec un nombre limité d'individus pour chacune des variétés/lignées. Le mûrier étant une culture pérenne à forte variabilité, toutes les souches existantes ne peuvent être testées en une fois. On a donc estimé que la méthode d'évaluation en trois phases, c'est-à-dire évaluation des caractères individuels, évaluation du rendement et évaluation de la qualité, était la plus appropriée. Sur la base de l'analyse des caractères individuels, les descendances hybrides obtenus par pollinisation ouverte et par pollinisation contrôlée ont été soumises au test préliminaire sur le rendement. Les résultats de cette expérience sont présentés ici. Après les tests préliminaires, on a évalué à nouveau le rendement des variétés les plus performantes avec une population plus importante. Dans le cas présent, 23 nouvelles lignées ont été étudiées en prenant les variétés S_{54} et Kanva-2 comme témoins. Les résultats sont discutés dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Les descendances issues des diverses combinaisons de croisement présentées dans le tableau I forment le matériel de base de cette étude. Les descendances donnant de bons résultats pour ce qui concerne le bourgeonnement, le racinement, la croissance, la ramification et les caractères foliaires ont été sélectionnées visuellement et étudiées selon les recommandations de Dandin et Jolly (1986) et soumises à un test primaire sur le rendement. Les valeurs obtenues pour ces caractères sont

également présentées dans le tableau I. Les 23 souches donnant les valeurs maximales ont été reproduites et soumises au test préliminaire sur le rendement à la Regional Sericultural Research Station (RSRS) de Bangalore. Pour chaque génotype, 48 plants sous la forme de plantules âgées de 4 mois ont été plantés à espacement de 60 × 60 cm en quatre réplicats. Les analyses ont été réalisées un an après la plantation initiale. Les plants ont été taillés à la base à une hauteur de 30 cm et 5 récoltes ont été faites à 70 jours d'intervalle. Toutes les récoltes ont été faites sous forme de rameaux. Les paramètres de croissance, c'est-à-dire la hauteur du plant, le poids des feuilles, le nombre de branches, le contenu en humidité, etc., ont été relevés sur 5 plants sélectionnés suivant la méthode suggérée par Dandin et Jolly (1986). Les données concernant le rendement ont été relevées sur la base des feuilles récoltées dans chaque parcelle et consolidées plus tard. Les parcelles ont été cultivées selon la méthode standard recommandée par Krishnaswamy (1976). Les données collectées pendant deux ans ont été soumises à une analyse statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs moyennes des données observées pendant deux ans sur les paramètres du rendement et de la croissance sont présentées dans le tableau II. Les données obtenues montrent que Jatinuni × S_{41} R_3 P_{11} donne le meilleur rendement, suivi de S_{36} × S_{41} P_2, OPH P_{29}, S_{30} × C_{776} R_9 P_{20}, S_{30} × C_{776} R_{10} P_{22}, S_{30} × C_{776} R_3 P_4, S_{30} × C_{776} R_7 P_3, S_{54} × I_{19} R_3 P_{12}, OPH R_{10}, P_{10}, S_{30} × C_{776} R_4 P_{25}, S_{36} × S_{41} P_5, S_{54} × Kosen P_8, S_{54} et OPH R_{16} PL. Toutes ces lignées sont statistiquement comparables. Jatinuni × S_{41} R_3 P_{11} donne le plant le plus haut, suivi de S_{30} × C_{776} R_{10} P_{22} et S_{30} × C_{776} R_7 P_3 dont les résultats sont comparables à ceux obtenus pour la première variété, ce qui montre la rapidité de leur croissance. Parmi les lignées qui ont donné des rendements en feuilles significativement supérieurs, toutes, à l'exception de OPH R_{10} P_1, S_{54} et OPH R_{16} P_1, donnent une longeur de pousses nettement supérieure à celles des autres ; S_{54} et Kanva-2 donnant des nombres de feuilles par mètre sensiblement identiques et nettement supérieurs à ceux obtenus pour les autres lignées. Le pourcentage d'humidité des feuilles est très élevé chez Kanva-2, suivi de S_{36} × S_{41} P_2, S_{30} × C_{776} R_{10} P_{22}, OPH P_{29}, Kanva-2 × S_{41} R_5 et S_{54} × I_{19} R_3 P_{12}. Le test F indique que la différence est significative au seuil de 5 % pour la longueur totale de la pousse et au seuil de 1 % pour les autres paramètres.

Une expérience similaire a été réalisée en Inde tropicale par Kasiviswanathan et Ieyngar (1965), Kasiviswanathan et coll. (1977) et Kasiviswanathan et coll. (1979) et les résultats obtenus ont permis de recommander l'utilisation de Kanva-2, plus performant que les variétés Mysore Local et Berhampore.

De plus, les variétés S_{30}, S_{36}, S_{41} et S_{54} ont été isolées à partir d'une population mutante et leur rendement a été évalué (Jolly et coll., 1982 ; Anonyme, 1982). Sur la base des données obtenues sur le terrain, les variétés S_{36} et S_{54} ont pu être recommandées pour la culture commerciale. Dans cette étude, K_2 et S_{54} ont été pris comme témoins pour permettre la comparaison avec le rendement obtenu pour les nouvelles variétés.

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 × 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 : 3e trimestre 1993