

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
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)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KAWAKAMI K. (Japon / *Japan*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KRISHNASWAMY S. (Inde / *India*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J-M. (France)
LIU S-X. (Chine / *China*)
LU H-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
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*)
TRENCZEK T. (Suisse / *Switzerland*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Informations CSI / ISC Announcements	iii
Actualités / News	iv
 Articles originaux / Original papers	
Obtention et caractérisation de lignées cellulaires à partir de disques imaginaux alaires chez <i>Bombyx mori</i>	201
Isolation and characterisation of cell lines from wing imaginal discs of <i>Bombyx mori</i>	221
J. FOURCHE, S. HACHOUF, P. CHAREYRE, M.-T. BESSON, J. DEMONT & G. BOSQUET	
The nutritional behaviour of three different strains of mulberry silkworm (<i>Bombyx mori</i>) in relation to Insegar (fenoxycarb)	233
Comportement nutritionnel de trois souches différentes de vers à soie du mûrier (<i>Bombyx mori</i>) en relation avec l'Insegar (fénoxycarbe)	245
O.M. ASSAL, R. BENEDETTI, L. CAPPELLOZZA & S. CAPPELLOZZA	
Study on the identification of region-specific heterotic crosses in <i>Bombyx mori</i> L.	249
Identification de croisements hétérotiques géographiquement définis chez <i>Bombyx mori</i> L.	261
J.L. RAZDAN, A.A. SIDDIQUI, R.K. BALI & P. MUKHERJEE	
Effect of different disinfectants on the prevention of nuclear polyhedrosis of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	265
Effet de différents désinfectants sur la prévention de la polyédrose nucléaire du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	271
B.J. SARMA, M.V. SAMSON, M. BALAVENKATASUBBAIAH & R.K. DATTA	
Infectivity of <i>Serratia marcescens</i> to the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae), and its effect on certain biochemical constituents in the haemolymph and gut	275
L'infectivité de <i>Serratia marcescens</i> vis-à-vis du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae) et son effet sur certains composants biochimiques de l'hémolymphe et de l'intestin	283
C. SAM DEVDAS, T.O. SASIDIHARAN, M.V. SAMSON, V. SIVAPRASAD & R.K. DATTA	
Comparative studies between exfoliation reeling tension and reeling performance of Indian pure and hybrid races	287
Etudes comparatives entre la tension de détachement du fil et la dévidabilité lors du dévidage de cocons de races indiennes pure et hybride	297
C. TAKABAYASHI, G. HARIRAJ, H. TSUBOI & M. TSUGHE	
Effects of host plants on haemocyte populations and blood volumes of <i>Antheraea assama</i> Westwood (Lepidoptera : Saturniidae)	301
Effets des plantes hôtes sur les populations d'hémocytes et sur le volume sanguin d' <i>Antheraea assama</i> Westwood (Lepidoptera : Saturniidae)	307
L.K. HAZARIKA, S. BARDOLOI & A. KATAKY	
Evaluation of saline tolerance in mulberry varieties by exploiting rooting potential	311
Evaluation de la tolérance à la salinité chez certaines variétés de mûriers par mesure du potentiel de racinement	323
S. SHAIK MOHAMED ANAS & M. VIVEKANANDAN	

Notes brèves / Brief notes

Effect of zinc and nickel on the larval and cocoon characters of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> (L.)	327
Effet du zinc et du nickel sur les caractères de la larve et du cocon chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i> (L.)	331
P. CHAMUNDESWARI & K. RADHAKRISHNAIAH	

Genetic analysis of seed technological traits by diallel cross in the eri silkworm, <i>Samia cynthia ricini</i> Boisduval	333
Analyse génétique des caractères technologiques de la production d'oeufs chez le ver à soie eri <i>Samia cynthia ricini</i> Boisduval	339
M. NAGARAJA & R. GOVINDAN	

Clonal propagation of <i>Morus alba</i> L. cv S ₁ from nodal explants of mature trees : maintenance of proliferating cultures	343
Multiplication clonale de <i>Morus alba</i> L. cv S ₁ à partir d'explants nodaux d'arbres matures : maintien de cultures en multiplication	349
R. ISLAM, O.I. JOARDER, M. HOSSAIN, A. ZAMAN & A.C. BARMAN	

Growth, development and leaf yield in S-54 mulberry as influenced by deficiency of secondary nutrients	353
Effet de la déficience en éléments nutritifs secondaires sur la croissance, le développement et le rendement en feuilles chez la variété de mûrier S-54	359
M.A. SHANKAR & K. SHIVASHANKAR	

Incidence of <i>Cercospora moricola</i> Cooke in mulberry leaves (<i>Morus indica</i> L.) : Histopathological and histochemical changes	363
Incidence de <i>Cercospora moricola</i> Cooke sur les feuilles de mûrier (<i>Morus indica</i> L.) : Modifications histopathologiques et histochimiques	367
G.C. VIJAYA KUMAR	

Bibliographie / Bibliography 369

Sériciculture générale / General sericulture	371
Mûrier / Mulberry	374
<i>B. mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>B. mori</i> : rearing, feeding, pathology	378
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	386
Vers à soie : génétique / Silkworms : genetics	387
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms : physiology, biochemistry	389
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms : eggs, embryology	392
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms : silk glands	394
Soie / Silk	396

Instructions aux auteurs / Information for contributors

INFORMATIONS CSI

Le gouvernement indonésien a accepté d'organiser le XVI^e Congrès international de sériciculture de la CSI. Celui-ci se tiendra à Bandung (Indonésie) du 21 au 25 mars 1995.

Au nom de tous les Etats membres, le Secrétaire général tient à remercier les autorités indonésiennes de leur invitation qui témoigne, une fois encore, de leur soutien actif aux activités de la CSI.

Les représentants des Etats membres et les Membres associés recevront prochainement les dossiers d'inscription.

Pour toute demande de dossier d'inscription, prière de contacter le secrétariat de la CSI.

ISC ANNOUNCEMENTS

The Indonesian government has accepted to organise the XVIth ISC International Sericultural Congress. It will be held in Bandung, Indonesia, from 21-25 March 1995.

On behalf of the Member States, the Secretary-General wishes to thank the Indonesian authorities for their invitation, which evinces, once again, their active support to the ISC activities.

The representatives of Member States and our Associate Members will shortly receive the registration forms.

All applications for registration forms should be made to the ISC Secretariat.

NECROLOGIE

Nous avons appris, avec tristesse, le décès de Robert E. Karam, survenu le 16 août 1994 à Boston (Etats-unis).

Ce décès touchera tous ceux qui suivent la sériciculture internationale et, tout particulièrement, les membres de la CSI.

En effet, Robert E. Karam, après avoir fait des études en France (ingénieur de l'Institut national agronomique de Paris-Grignon et laboratoire de l'Institut national de la recherche agronomique de Bordeaux) puis au Japon (*National Sericulture Institute* de Tokyo), devint Directeur exécutif puis Directeur général de l'Office national de la soie du Liban. Il fut nommé délégué officiel auprès de la CSI jusque dans les années 1970 puis devint fonctionnaire permanent aux Services agricoles de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture au siège à Rome.

La rédaction de *Sericologia* et la Commission séricicole internationale adressent à sa veuve, à ses filles, à sa soeur et à ses quatre petits-enfants, leurs plus sincères condoléances.

OBITUARY

It is with sadness that we have learned of the death of Robert E. Karam, on 16th August 1994 in Boston, USA.

His death will affect all those who are involved in sericulture at the international level and, especially, the ISC members.

Robert E. Karam studied in France (as an engineer at the *Institut national agronomique* of Paris-Grignon and at the laboratory of the *Institut national de la recherche agronomique* of Bordeaux) and in Japan (*National Sericulture Institute* of Tokyo). He became Chief Executive Officer, then Director-General of the National Silk Board of Lebanon. He was nominated official delegate to the ISC until the '70s then became Professional Officer in the Agricultural Services of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations, at the headquarters in Rome.

The Editorial members of *Sericologia* and the International Sericultural Commission wish to express their deepest sympathy to his widow, his daughters, his sister and his four grand-children.

OBTENTION ET CARACTERISATION DE LIGNEES CELLULAIRES A PARTIR DE DISQUES IMAGINAUX ALAIRES CHEZ *BOMBYX MORI*

J. FOURCHE, S. HACHOUF, P. CHAREYRE, M.-T. BESSON, J. DEMONT & G. BOSQUET

Biologie du Développement des Insectes, CGMC-CNRS-UMR 106, Université Claude-Bernard
Lyon I, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

*Des essais de mise en culture de cellules de disques imaginaux alaires de **Bombyx mori** sont effectués. Plusieurs précultures sont conduites en cocultures avec des cellules de lignées déjà établies de **Bombyx mori** ou en présence de milieu conditionné par elles ; les lignées ainsi obtenues ont les caractères des cellules accompagnatrices. Une autre lignée est obtenue directement, elle a des caractères différents. Les techniques utilisées rendent les résultats parfaitement reproductibles. La morphologie des cellules est très modifiée par le milieu de culture utilisé. Les tests de caractérisation employés, hybridation des ARNm, oxydation de la tyrosine, synthèse de chitine, capacité à phagocyter, conduisent à la conclusion que les lignées obtenues sont d'origine hémocytaire (caractère qu'elles partagent avec les anciennes lignées) et non épidermiques. Elles proviennent des organes hémopoïétiques étroitement liés aux disques alaires ou même éventuellement de cellules circulantes intradiscales. Les résultats acquis posent le problème de l'existence de facteurs de différenciation des lignées sanguines d'insectes.*

Mots-clés : *Bombyx mori*, disques imaginaux, hémocytes, lignées cellulaires.

INTRODUCTION

Depuis les années 1950 (Wyatt, 1956 ; Vago et Chastang, 1958 ; Aizawa et Vago, 1959), de nombreuses lignées cellulaires ont été établies à partir de divers organes d'insectes appartenant à différents ordres (Hink, 1980 ; Sang, 1981 ; Hink et coll., 1985 ; Hink et Hall, 1987).

La mise au point de telles lignées obéit à plusieurs objectifs :

- Production de virus soit pour en étudier le cycle (Cho et coll., 1989), soit pour développer de nouveaux insecticides biologiques (Weiss et coll., 1981 ; Cho et coll., 1989 ; Zhang et coll., 1992), soit enfin pour disposer d'outils biotechnologiques (Maeda et Furusawa, 1987 ; Maiorella et coll., 1988 ; Hink, 1991 ; Hartig et Cardon, 1992 ; Chaabihi et coll., 1993).
- Etude de biologie du développement, en particulier pour analyser le mode d'action des hormones (Lynn, 1982 ; Péronnet et coll., 1986 ; Porcheron, 1991) et la régulation de gènes après leur transfert (Oberlander et Miller, 1987 ; Walker, 1989).

Afin d'analyser, chez *Bombyx mori*, la différenciation de l'aile à partir du disque imaginal, nous avons entrepris l'étude de la régulation des gènes s'exprimant à diverses étapes. Dans cette perspective, l'obtention d'une lignée de cellules de disques était particulièrement intéressante. Il existe déjà plusieurs lignées de cellules de disques imaginaux obtenues chez *Drosophila* (Wyss, 1982 ; Currie et coll., 1988 ; Peel et coll., 1990 ; Cullen et Milner, 1991) ainsi que chez plusieurs espèces de lépidoptères au demeurant assez éloignées de *Bombyx* : *Spodoptera frugiperda*, *Plodia*

interpunctella (Lynn et Oberlander, 1983), *Trichoplusia ni* (Lynn et coll., 1982 ; Lynn et Oberlander, 1986 ; Lynn et coll., 1987).

Dans cette tentative, il s'est révélé, comme l'ont écrit Cullen et Miller (1991), que l'initiation d'une culture primaire demeure un art plutôt qu'une science exacte. Plusieurs lignées ont été obtenues avec des modalités de précultures distinctes et parfois originales : coculture où les partenaires sont séparés par une membrane, emploi de milieux conditionnés par une lignée préétablie. Ces différentes techniques permettent une excellente reproductibilité des résultats. Les caractéristiques de la lignée obtenue dépendent de la lignée des cellules accompagnatrices. Après plusieurs tests de caractérisation, il s'est avéré que les lignées obtenues n'étaient, selon toute vraisemblance, pas d'origine épidermique mais plutôt d'origine hémocytaire ; cette conclusion pose, de surcroît, la question de l'origine d'autres lignées préexistantes de *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

A. Matériel biologique :

Les *Bombyx mori* utilisés sont des hybrides des souches européennes 200 et 300 fournis par l'Unité nationale séricicole (La Mulatière, France) et élevés sur feuille de mûrier à 22 °C et, pendant l'hiver, sur milieu artificiel à 25 °C. Les chenilles sont synchronisées au début de chaque stade larvaire.

Les disques imaginaux alaires sont d'origine embryonnaire ectodermique. Leur évolution est relativement complexe, de sorte que, au Ve stade, le disque comporte d'une part l'ébauche alaire proprement dite avec deux couches cellulaires à l'origine des épithéliums alaires dorsal et ventral reliés par une matrice, d'autre part l'enveloppe péripodiale constituée, elle aussi, d'une assise épidermique réfléchie et qui entoure presque complètement l'ébauche. Cette enveloppe est doublée, à l'extérieur, par une lame conjonctive (Lavanseau, 1976 ; Mauchamp, 1979 ; Nardi, 1984 ; Nardi et coll., 1985 ; Kawasaki, 1988). Cet ensemble reste en continuité avec l'épiderme de la paroi du corps. Dans la région du hile, reliée à un gros tronc trachéen, existe une masse importante de trachéoles qui, lors de la différenciation précédant la nymphose, migreront dans les lacunes inter-épithéliales (Hasskarl et coll., 1973 ; Nardi et coll., 1985). Le disque comporte également (Nardi, 1984) des cellules qui évolueront dans le sens neuronal. En fin de stade, au niveau des lacunes, pénètre l'hémolymphe avec ses hémocytes.

Chez *Bombyx* (Akai et Sato, 1971), également dans la région du hile, se trouvent les organes hémopoïétiques qui sont constitués par plusieurs amas de cellules souches des hémocytes. A la fin du Ve stade larvaire, ces formations augmentent en nombre et en taille ; elles sont le siège d'une activité mitotique intense qui s'accompagne de la différenciation de divers types hémocytaires, prohémocytes, granulocytes, sphérulocytes, plasmocytes en particulier, qui passent dans la circulation. Les organes hémopoïétiques sont entourés d'une lame conjonctive qui, avec les trachées, les relie solidement au disque.

B. Préparation des larves :

Toutes les manipulations sont conduites sous une hotte à flux laminaire. Les chenilles sont vigoureusement lavées par immersions successives dans des solutions de Teepol (2,5 % V/V), d'hypochlorite de sodium (2,5 % V/V) et d'éthanol (70 % V/V). Une incision linéaire pratiquée entre le stigmate prothoracique et le premier abdominal permet le prélèvement des disques après section des gros tronc trachéens. Pour plusieurs essais, des disques ont été prélevés sur des larves prises à la fin du IVe stade ou à différents moments du Ve, avant ou après le début du filage ou même après injections de 20-hydroxyecdysone. Ce sont seulement les larves de 5e ou 6e jour du Ve stade qui ont permis d'obtenir des résultats.

C. Préparation des disques :

1) Rinçage :

Les disques sont déposés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant 3 ml soit de PBS de Dulbecco (Gibco), soit de milieu de culture, additionné de fungisone (Gibco) à 0,50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pénicilline-streptomycine (Boehringer) à 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ et phénylthiourée à 6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

2) Fragmentation :

Sous la loupe, les disques sont débarrassés des gros troncs trachéens et des lobes de tissu adipeux entraînés lors de la dissection ; suivant les expériences, les disques peuvent subir deux types de traitement :

- transférés dans 50 µl de milieu, ils sont immédiatement réduits aux ciseaux en une dizaine de petits fragments ;

- ou bien, d'abord isolés, ils subissent l'ablation d'un tiers environ de leur volume, côté hile, de façon à éliminer trachéoles et organes hémapoïétiques. Après regroupement dans 50 µl, ils sont hachés le plus finement possible aux ciseaux. A cette étape, des tentatives de mise en culture ont été faites sans succès, contrairement aux résultats de Lynn et Oberlander (1983).

3) Dissociation enzymatique :

Dans la majorité des cas, les fragments de disques subissent un des traitements enzymatiques (Tableau I) cités dans la littérature. La hyaluronidase nous a paru justifiée en raison de la forte teneur d'acide hyaluronidique dans la matrice (Nardi et coll., 1985) inter-épithéliale. Des mélanges ont également été employés aux concentrations indiquées. Dans tous les cas, les enzymes sont préparées en solutions-mères concentrées dans de l'eau UHQ (Elga) aliquotées et conservées à -20 °C. Seule la trypsine s'est révélée très détériorante pour les cellules.

Tableau I. Enzymes de dissociation utilisées.

Table I. Dissociation enzymes used.

Enzyme	Bibliographie	Fournisseur	Solution mère	Concentration finale	Durée d'action 25 °C
<i>Enzyme</i>	<i>Reference</i>	<i>Supplier</i>	<i>Stock solution</i>	<i>Final concentration</i>	<i>Duration of effect 25 °C</i>
Trypsine / <i>Trypsin</i>	Vaughn 1977	Boehringer	2,5 %	0,25 %	10 minutes
Protéase / <i>Protease</i>	Wyss 1982	Sigma	5 mg ml ⁻¹	50 mg ml ⁻¹	20 minutes
Collagénase Type II	Fenon 1985	Sigma	10 mg ml ⁻¹	200 mg ml ⁻¹	30 minutes
<i>Collagenase Type IIs</i>					
Dispase (grade I)	Currie 1988	Boehringer	1 mg ml ⁻¹	100 mg ml ⁻¹	45 minutes
Hyaluronidase Type VIII	Vaughn 1977	Sigma	5 mg ml ⁻¹	50 mg ml ⁻¹	10 minutes

Les enzymes sont ajoutées pour obtenir les concentrations indiquées dans 1 ml de milieu de base pour 12 disques. Les tubes sont placés à 25 °C environ sur un agitateur rotatif effectuant une révolution par seconde. Le traitement est arrêté par addition de 3 ml de milieu de culture supplémenté à 10 % de sérum bovin foetal. Le tube est centrifugé 3 minutes à 100 g. Le culot est resuspendu dans 250 µl du milieu définitif. L'ensemble est pipeté doucement et réparti par 50 µl dans cinq puits d'une plaque de 24 (Costar). La préparation est laissée 10 minutes au repos pour permettre aux fragments de disques et cellules d'adhérer (Lynn et coll., 1982).

L'activité de certaines des enzymes utilisées étant modifiée par la présence ou l'absence de cations divalents, des essais de dissociation ont été effectués dans du PBS additionné de Ca^{2+} ou d'EDTA. Ces additions n'ont pas modifié les résultats.

D. Réalisation des cultures :

Toutes les cultures sont conduites à 25 °C en étuve atmosphérique obscure.

1) Milieux utilisés :

Deux milieux de base ont été employés : Grace (Gibco) et IPL41 (Gibco). Dans certains essais initiaux, ils ont été modifiés pour ajuster pH et osmolarité aux valeurs de l'hémolymphé au moment du prélèvement des disques.

Après avoir testé plusieurs suppléments en nutriments [hydrolysate de lactalbumine, extraits de levure, complexe lipidique (Goodwin, 1990) ou facteurs divers, insuline, 20-hydroxyecdysone (Wyss, 1982 ; Currie et coll., 1988)], quatre préparations ont été retenues pour les précultures.

- Grace (G1010) avec 10 % de sérum (Yunker et coll., 1967) de veau foetal (Gibco) et 10 % d'hémolymphé chauffée de *Bombyx*.

- Grace (G101) avec 10 % de sérum et 1 % d'albumine bovine (SIGMA).

- IPL41 (I10) avec 10 % de sérum.

- IPL41 (Ic) (d'après Lynn, 1989) avec 10 % de sérum, 1 % de complexe lipidique (Gibco), 3 mg.ml⁻¹ de lactalbumine (SIGMA), 3 mg.ml⁻¹ d'extrait de levure (SIGMA).

Le sérum est chauffé 35 minutes à 55 °C et filtré à 0,2 µm. Dans tous les milieux est ajouté un mélange Pénicilline-Streptomycine (Boehringer) à la concentration indiquée par le fabricant.

2) Préparation de l'hémolymphé :

L'hémolymphé est prélevé sur des chenilles prises au 5e ou 6e jour du stade V par section d'une fausse patte. L'hémolymphé de 6 vers est rassemblée dans un tube placé dans la glace et immédiatement chauffé à 55 °C pendant 40 minutes. Les contenus de quatre tubes sont réunis avant centrifugation 10 min., à 3 000 g, 0 °C. Le surnageant, réparti par 10 ml, est conservé à -20 °C. Ce n'est qu'après dilution dans le milieu que le mélange est filtré sous azote à 0,2 µm (filtre Seitz EKS2) en raison de la viscosité de l'hémolymphé.

3) Coculture :

Le principe est d'utiliser dans un puits d'une plaque de 24 (Costar) un insert de 12 mm de diamètre pourvu d'une membrane avec des pores de 0,4 µm (Millicell PCF de Millipore) qui sépare les cellules de préculture des cellules accompagnatrices appartenant à une lignée préexistante. Les cellules accompagnatrices appartiennent à trois lignées, deux de *Bombyx* : Bm5, lignée établie par Grace (1967), SPC Bm36 (Quiot, 1982), une troisième lignée de *Spodoptera*, SF9 (Vaughn et coll., 1977).

Lorsque les fragments de disques sont restés 10 mn au repos, 600 µl du milieu choisi sont ajoutés ; l'insert est mis en place, 450 µl du même milieu y sont ajoutés, apportant 3 à 4.10⁵ cellules d'une culture de 4 jours. Insert, cellules accompagnatrices et 500 µl de milieu sont changés tous les 4 ou 5 jours.

Les plaques sont toujours fermées par un film collant transparent (Titerpek Flow).

Dans toutes les expériences, un puits témoin est équipé de l'insert et des cellules accompagnatrices. Un examen quotidien a assuré qu'aucune cellule n'a changé de compartiment.

4) Milieu conditionné :

Dans d'autres expériences, les cellules accompagnatrices ont été remplacées par du milieu conditionné par les mêmes lignées cultivées en conditions standard (5 ml, flacon de 25 cm²) depuis 4 ou 5 jours, les cellules flottantes sont alors exceptionnelles ; 3 ml sont prélevés et centrifugés 10 minutes à 1000 g à température ambiante ; la moitié supérieure du surnageant est récupérée pour être immédiatement utilisée en proportions variables avec du milieu neuf. Le milieu est renouvelé

par moitié tous les deux jours. Un puits témoin ne reçoit que du milieu conditionné. Enfin, le milieu conditionné a été soumis à plusieurs traitements : filtration (millex 0,22 μm ou 0,44 μm - Millipore), ultracentrifugation (25 000 g, 0 °C, 90 mn), concentration (ultra-free PF, Millipore), congélation à -20 °C.

E) Mise en culture de cellules circulantes :

Deux larves du 5^e jour du stade V sont saignées par section d'une fausse patte. L'hémolymphe recueillie à température ambiante dans un tube contenant 3 ml d'Ic additionné de phénylthiourée à 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'ensemble est centrifugé (100 g, 3 mn). Le culot est remis en suspension dans 3 ml de milieu et recentrifugé. Les cellules sont reprises dans 150 μl et réparties en 3 puits auxquels on ajoute 500 μl d'Ic et 500 μl du même milieu conditionné par Bm5. Le milieu est renouvelé par moitié toutes les semaines.

F) Tests de caractérisation des lignées :

1) Courbe de croissance :

Huit flacons de culture (flacon de 25 cm^2) contenant 5 ml de milieu sontensemencés à partir d'une culture de 5 jours à raison de 10^6 cellules par flacon. Chaque jour, un comptage est fait à l'aide d'une cellule de Malassez. L'opération est éventuellement conduite avec deux milieux. Les effets de la 20-hydroxyecdysone sont évalués en ajoutant l'hormone à la concentration finale de 10^{-6} M soit après 48 heures de culture, soit dès le repiquage.

2) Clonage :

Une dilution de la culture est effectuée de manière à obtenir une densité finale de 100 cellules environ pour 10 ml. Cette suspension est répartie par aliquotes de 100 μl dans les puits d'une plaque de 96 puits (Costar). Après un mois, les clones sont transférés en boîte de 6 puits avec 2,5 ml de milieu par puits.

3) Hybridation des ARN messagers :

Les ARNm totaux extraits de cultures de 5 jours en situation hormonale (10^{-6} M de 20-hydroxyecdysone pendant 24 h) ou en situation an hormonale et hybridés avec des sondes correspondant à des gènes dont l'expression dans le disque est modifiée par l'hormone (Chareyre et coll., 1993). La préparation des ARN totaux et des sondes marquées ainsi que l'hybridation ont été décrites antérieurement (Abraham et coll., 1993).

4) Présence de tyrosinase :

La technique de Okun (1969) (in Pearce, 1972) utilisée chez *Galleria* (Schmit et coll., 1976) est employée en ramenant la température d'incubation à 34 °C et en remplaçant pour les témoins le diéthylthiocarbonate de sodium par de la phénylthiourée à 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ qui inhibe sélectivement la tyrosinase des hémocytes (Richards, 1978).

5) Synthèse de chitine :

Le test de la lectine WGA marquée FITC (Sigma) utilisé sur *Pieris* (Mauchamp et Schrevel, 1977) est appliqué à des cellules repiquées depuis 4 jours sur plaque Microtech de 8 puits après, ou non, 24 heures de 20-hydroxyecdysone 10^{-6} M. La WGA possède en effet une grande affinité pour la N-acétyl-D-glucosamine.

6) Culture sur collagène :

Des cultures avec les milieux habituels sont faites sur des boîtes revêtues de collagène I (Corning).

7) Capacités de phagocytose :

Du charbon de bois végétal (Prolabo) est très finement broyé au mortier puis stérilisé. Trois à 5 mg de poudre sont mis en suspension dans 5 ml de milieu. Après décantation de 6 heures, 25 μl de

la suspension superficielle sont ajoutés aux flacons de culture de 4 jours. Après 12 heures de contact, les flacons sont rincés 2 fois au PBS avec agitation avant examen au microscope.

RESULTATS

A) Etablissement des lignées :

1) Cultures impliquant des cellules de disques :

Dans une première étape, les lignées ne seront désignées que par une immatriculation provisoire qui sera ensuite modifiée à la suite des tests d'identification réalisés.

a) Lignée L₁ :

α. Culture primaire :

Cette lignée est obtenue à partir de disques alaires (stade V, 5e jour) coupés aux ciseaux, traités à la collagénase puis mis en culture soit en présence de cellules Bm5, soit avec du milieu conditionné par les mêmes cellules. Seul le milieu I10 a donné un résultat positif.

La préparation mise en place dans le puits (plaque 24 puits) comporte au départ des cellules isolées arrondies et de petits amas de cellules (l'expérience montrera qu'ils sont en fait de deux types).

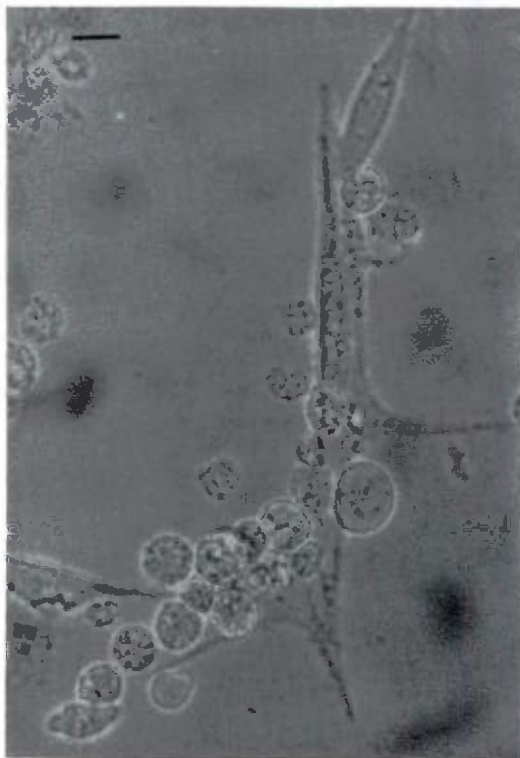
En l'absence de cellules accompagnatrices ou de milieu conditionné, les cellules isolées changent de forme en prenant un aspect pseudo-fibroblastique, se chargent d'inclusions péri-nucléaires et souvent forment un réseau dans lequel la structure cellulaire disparaît (Fig. 1). Cette détérioration est rapide, 4 à 5 jours avec du milieu G1010, beaucoup moins avec I10. Aucune prolifération n'est constatée.

Fig. 1 : Formation de réseau dans les cultures primaires.

La photographie représente une figure obtenue avec des cellules circulantes, l'aspect de ce réseau est identique dans tous les essais. Milieu IPLC - 5 jours de culture - Le trait représente 50 µm.

Fig. 1 : Formation of a network in the primary cultures.

The photograph shows a pattern obtained with circulating cells. This network presented the same pattern in all the tests. IPLC medium - 5 days of culture - The bar represents 50 µm.



En présence de cellules accompagnatrices Bm5 et avec un milieu sans hémolymphe, certains amas s'organisent en vésicules ne comportant qu'une seule assise de cellules qui émettent de nombreux prolongements à l'intérieur de la sphère creuse. Les vésicules présentent beaucoup de caractères communs avec celles décrites chez d'autres lépidoptères *Plodia* ou *Spodoptera* (Lynn et Oberlander, 1983 ; Lynn et coll., 1982 ; Lynn et coll., 1985) ou chez *Drosophila* (Currie et coll., 1988) où elles sont caractéristiques des disques imaginaux. La taille de ces vésicules augmente progressivement. Si elles sont sectionnées, elles reconstituent des vésicules de plus petite taille, suggérant la sécrétion à leur surface de molécules de reconnaissance cellulaire. Ces vésicules peuvent persister en bon état pendant plus de 6 semaines. Aucune cellule ne semble s'en échapper ; la présence des prolongements cytoplasmiques à l'intérieur de la vésicule, caractère qui n'existe pas dans d'autres espèces, peut en être la cause. Au contraire, en présence d'hémolymphe dans le milieu, ces vésicules se détériorent en moins d'une semaine.

A partir de 10 à 15 jours après la mise en culture, des migrations cellulaires débutent à partir d'autres amas qui n'ont au contraire pas réalisé de vésicules (Fig. 2). De plus, souvent, plusieurs foyers de prolifération peuvent apparaître simultanément. Ces cellules présentent deux nucléoles peu visibles. Elles augmentent progressivement de taille et passent de 10 μm à 20-25 μm tandis que le nombre des nucléoles augmente à 5 ou 6 ; ils sont également plus visibles. Ces modifications pourraient traduire d'importantes transformations chromosomiques par polyploïdisation (McIntoch et coll., 1983), aneuploïdisation (Inoue et Mitsuhashi, 1988) ou fragmentation chromosomique classique dans les cultures cellulaires de lépidoptères (Lynn et coll., 1982 ; Oberlander et Miller, 1987).



Fig. 2 : Début de la prolifération de la lignée L₁ à partir d'un amas non vésiculeux.

Milieu I₁₀ - 12 jours de culture. Le trait représente 30 μm .

Fig. 2 : Onset of the proliferation of line L₁ from a nonvesiculate bundle.

I₁₀ medium. 12 days of culture. The bar represents 30 μm .

Le traitement avec du milieu conditionné aboutit aux mêmes résultats : les lignées obtenues par les deux voies ne sont pas distinguables.

β. Délai d'établissement de la culture :

Il correspond au temps séparant la mise en culture des fragments de disques de la couverture complète du fond du puits. Il est alors possible de passer la culture en boîte 6 puits avec 3 ml de milieu sans addition de milieu conditionné. Avec du milieu conditionné à 50 %, ce délai est de 18 jours avec une excellente reproductibilité. Ce délai est étroitement dépendant des conditions d'addition des cellules accompagnatrices ou du milieu conditionné.

• Retard dans la mise en place de l'insert :

Si l'insert est mis en place 24 h ou 48 h après la mise en culture, le délai passe respectivement à 19 et 20 jours. Dans ces conditions, les cellules ont conservé les mêmes capacités de prolifération. Par contre, si l'insert est placé après 72 heures, aucune prolifération n'est plus observée, on retrouve ici les effets de la détérioration constatée pour les témoins.

• Retrait de l'insert après des temps de présence croissants (Tableau II).

Les cellules accompagnatrices doivent être présentes plus de 2 jours pour que la prolifération débute. La prolifération est plus rapide si l'insert est laissé 4 jours, après quoi la prolongation de son maintien n'a plus d'effet. Ces résultats conduisent à penser que les cellules accompagnatrices produisent un "facteur" reçu par un nombre croissant de cellules qui acquièrent ainsi la capacité de proliférer et qu'elles deviennent ensuite capables d'assurer elles-mêmes cette fonction.

Tableau II. Relation entre la durée de la présence de l'insert en jours et le délai avant le 1er repiquage en jours.

Table II. Relationship between the duration of the presence of the insert (in days) and the time span before the first sub-culture (in days).

Présence <i>Presence</i>	Délai <i>Time span</i>
1	-
2	28
3	21
4	18
6	18
14	18

- : Pas de prolifération / *No proliferation.*

• Effet de différentes concentrations de milieu conditionné (Tableau III).

Utilisé pur, le milieu conditionné ne permet pas la prolifération en raison, sans doute, de l'épuisement d'un composant nutritionnel essentiel. A la proportion de 75 ou 50 %, le milieu conditionné a le même effet de stimulation. Pour des proportions plus faibles, le délai augmente ; enfin, pour des proportions inférieures à 12,5 %, aucune prolifération n'intervient. Le délai de 18 jours, qui ne peut être réduit, est vraisemblablement indispensable aux modifications cellulaires

qui rendent possible la prolifération. A souligner que l'apport de milieu conditionné dure une douzaine de jours à comparer avec les 4 jours de présence de l'insert. C'est pendant cette période qu'est constatée l'augmentation de la taille cellulaire et du nombre des nucléoles.

Tableau III. Relation entre la concentration du milieu conditionné en pourcentage du milieu final (complément : milieu neuf) et le délai avant le 1er repiquage en jours.

Table III. Relationship between the concentration of the conditioned medium in percentage of the final medium (complement : fresh medium) and the time span before the first sub-culture (in days).

Concentration Concentration	Délai Time span
100	-
75	18
50	18
25	25
12,5	31
< 12,5	-

- Pas de prolifération / *No proliferation.*

- Autres modifications du milieu conditionné :

Si le milieu conditionné est concentré sous pression avant addition aux cellules, il ne stimulera pas la prolifération. Il en est de même après congélation à -20 °C ou après filtration à 0,22 µm. Par contre, l'activité est conservée si le diamètre des pores est de 0,44 µm (diamètre qui est celui des pores de l'insert). Après centrifugation à 25 000 g, on ne trouve pas de culot biologiquement actif.

b) Lignée L₂ :

Le traitement des disques est identique. Des cellules SPC Bm36 sont utilisées comme accompagnatrices ou pour conditionner le milieu. Les événements initiaux sont les mêmes. Le délai de repiquage en plaque 6 puits passe à 28 jours. Quiot (1982) signale un délai de 3 semaines pour le premier repiquage de sa culture dans des conditions différentes. Là encore, insert ou milieu conditionné aboutissent aux mêmes résultats concernant le type de lignées obtenues.

c) Utilisation des Lignées L₁ et L₂ comme cellules accompagnatrices :

Des cellules L₁ et L₂ après le 10^e passage ont été utilisées comme cellules accompagnatrices. Les mêmes résultats sont obtenus. Elles ont donc acquis la propriété de provoquer la prolifération de cellules nouvellement mises en culture.

d) Utilisation de SF₉ comme cellules accompagnatrices :

Cette lignée, qui provient de *Spodoptera*, ne provoque pas de prolifération dans les conditions utilisées pour les autres lignées.

e) Lignée L₃ :

Cette lignée correspond à des disques (prélevés au stade V, 6^e jour) qui ont subi l'ablation du hile, une fragmentation très fine et un traitement hyaluronidase-protéase 8 (Tableau I). Des cellules accompagnatrices ne sont pas utilisées. Après repos de 10 minutes de la préparation, 200 µl de milieu (G101) sont ajoutés. La même quantité est ajoutée les 3 jours suivants. A partir du 5^e jour, la moitié du milieu est remplacée par du milieu neuf, ensuite l'opération est faite tous les 7 jours.

Dans ce cas, aucune vésicule n'est observée en raison de l'utilisation d'enzymes particulières de dissociation. La prolifération peut ou non être associée à des amas de cellules. La première éventualité conduit à s'interroger sur l'élimination réellement complète des organes hématopoïétiques. Le passage en plaque 6 puits intervient après 25 jours ; l'expérience est reproductible, dans les mêmes conditions. Cette lignée est donc la seule obtenue sans que d'éventuels facteurs produits par des lignées anciennes soient impliqués.

f) Entretien et conservation :

α. Passage en flacon :

L₁ : la prolifération en boîte 6 puits est rapide après renouvellement de la moitié du milieu après 3 jours, le passage en flacon (25 cm², 5 ml de milieu) est possible 4 jours plus tard. Les milieux G10, G1010 et Ic conviennent parfaitement à cette lignée qui, comme Bm5, a tendance à partiellement flotter en vieillissant. Le repiquage est effectué en décollant les cellules restant adhérentes avec une pipette Pasteur recourbée à l'extrémité. Le volume de milieu est centrifugé 3 minutes à 100 g et ramené à 1 ml pour concentrer les cellules.

L₂ séjourne plutôt 8 jours en plaque 6 puits, elle pousse bien sur G10 ou sur G1010.

Le passage en L₃ en flacon se fait 15 jours après l'ensemencement de la plaque 6 puits. Cette lignée est cultivée sur milieu G101. Dans tous les cas, les repiquages sont hebdomadaires à 1/2 et rapidement à 1/4.

β. Conservation des cellules :

A partir du 10^e passage, les cellules supportent parfaitement la congélation progressive dans le milieu de base avec 7,5 % de DMSO et la conservation dans l'azote liquide. Toute tentative dans les premiers passages entraîne, comme il est habituel, la perte de la lignée. La résistance à la congélation est un bon test pour s'assurer que l'on a bien affaire à une lignée immortalisée. Cette caractéristique a été précocement acquise pour les lignées obtenues.

2) Culture des cellules circulantes (L₄) :

Cette culture est obtenue à partir des hémocytes circulants avec du milieu Ic dont la moitié est conditionnée par Bm5. Nous avons pu vérifier qu'aucune prolifération n'est obtenue, ni avec du milieu conditionné, ni avec du milieu neuf utilisés seul. Lors de la mise en culture, de nombreuses cellules se lysent rapidement, d'autres au contraire présentent un contour très irrégulier dentelé en liaison probable avec l'évacuation d'un grand nombre de petites vésicules cytoplasmiques. On note également des figures en réseau en tout point comparables à ce que nous avons décrit pour L₁. Ces figures sont certainement, dans tous les cas, le fait de certains hémocytes (Fig. 1). Corrélativement, le cytoplasme s'éclaircit. Les nucléoles en nombre variable deviennent très visibles. Les cellules sont transférées en boîte 6 puits après une cinquantaine de jours. Le passage en flacon intervient quinze jours plus tard. La prolifération est assez lente. L'expérience a été reproduite 3 fois. La culture a subi 8 passages, avec les milieux Ic ou G1010, elle a ensuite périclité. La congélation avait été tentée au 8^e passage mais, après décongélation, les cellules n'ont pas repris leur prolifération. Sang (1981) signale que les hémocytes peuvent être cultivés de façon transitoire. Ces résultats rappellent les observations chez les vertébrés où du milieu conditionné par une lignée permet la prolifération d'un autre type de cellule auquel la première fournit des facteurs de croissance. Cependant, pour L₄, la prolifération a persisté quelque temps en l'absence de milieu conditionné.

B) Caractéristiques des lignées :

1) Morphologie (Fig. 3) :

Les cellules de la lignée L₁ présentent une très grande ressemblance avec Bm5. Elles présentent un certain polymorphisme, cellules plus ou moins arrondies ou pourvues de larges pseudopodes. Leur cytoplasme est grossièrement granuleux. Leur morphologie est assez voisine des granulocytes de *Bombyx* (Nittono, 1960) ou d'autres lépidoptères (Saxena, 1992).

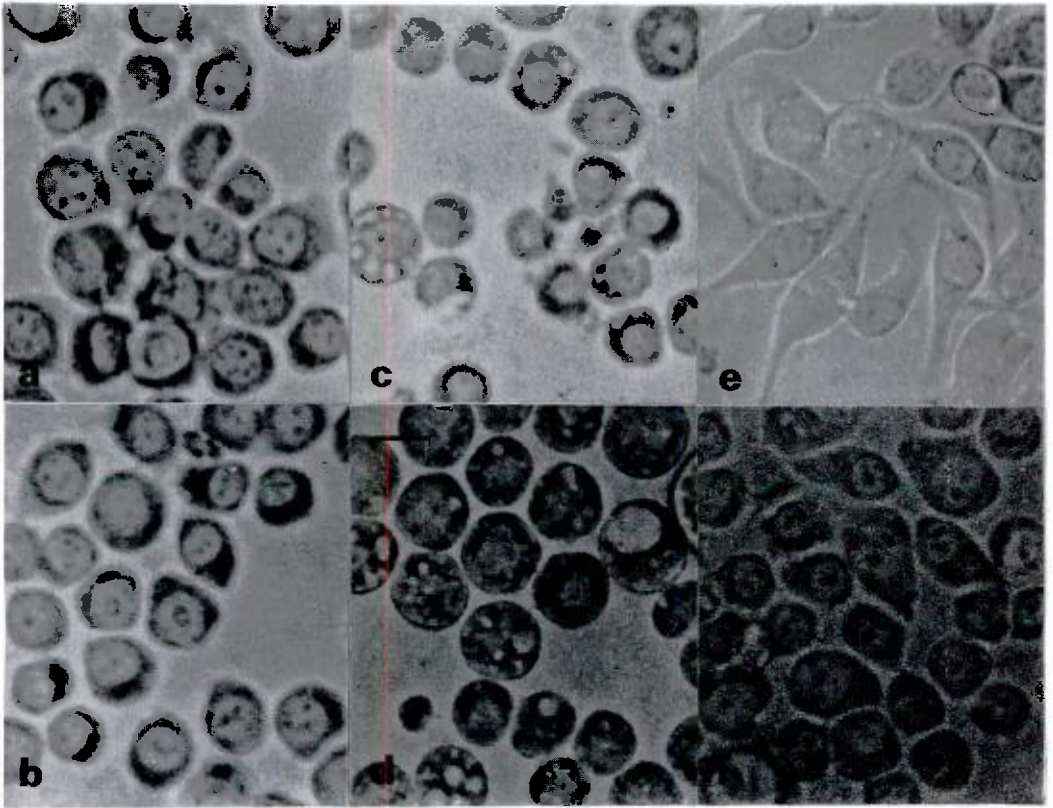


Fig. 3 : Morphologie des lignées.

a : Bm5, b : L₁ (cellules accompagnatrices, Bm5), c : Bm36, d : L₂ (cellules accompagnatrices, Bm36), e : L₃ (sans cellules accompagnatrices), f : (cellules circulantes, Bm5 accompagnatrices). Milieu G1010 pour a, b, c, d, f et G101 pour e, 6 jours après le repiquage. Le trait représente 30 μm.

Fig. 3 : Morphology of the lines.

a : Bm5, b : L₁ (companion cells, Bm5), c : Bm36, d : L₂ (companion cells, Bm36), e : L₃ (without companion cells), f : L₄ (circulating cells, Bm5 companion cells). G1010 medium for a, b, c, d and f and G101 for e, 6 days after sub-culturing. The bar represents 30 μm.

De la même façon, la lignée L₂ ressemble à Bm36. Les cellules sont pour la plupart arrondies avec un cytoplasme plus clair et un noyau moins net. Après 5 ou 6 jours de culture dans un milieu G1010, le cytoplasme se charge de vésicules de taille importante qui leur confèrent un aspect voisin des sphérulocytes (Nittono, 1960 ; Saxena, 1992). Souvent, on note la présence d'énormes cellules pourvues d'un noyau de très grande taille, voire de 2 noyaux, ce sont des cellules qui ne se divisent pas et qui sont non sélectionnables.

La lignée L₃ est formée de cellules plus petites, polymorphes arrondies ou très nettement bipolaires. Elles sont morphologiquement proches des formes décrites dans les lignées de disque de *Drosophila* (Currie et coll., 1988) ou d'autres espèces de lépidoptères (Lynn et coll., 1982) mais elles ressemblent aussi aux plasmocytes (Nittono, 1960). Leur forme bipolaire est pour Oberlander et Lynn (1984) tout à fait caractéristique des lignées d'insectes. Le clonage de cette lignée a permis de recueillir 6 clones, chacun issu d'une seule cellule, et présentant au départ des différences dans leur morphologie et leur adhérence au support. Après 3 passages, les différences avaient disparu et le polymorphisme initial était rétabli. Les différences pourraient provenir de micro-conditions locales et non d'une origine tissulaire distincte (Peel et Milner, 1989). La morphologie de la lignée est particulièrement sensible à la nature du milieu : L₃ est établie sur G101, son passage sur I10 provoque des modifications considérables même de la taille (Fig. 4) (Hink et coll., 1985). En revenant sur le milieu initial, 3 passages suffisent pour retrouver la première morphologie. Le passage sur G1010 s'accompagne aussi de changements importants de forme, mais la lignée disparaît après 3 passages successifs dans ces conditions.

Quant aux cellules L₄, conditionnées par Bm5, elles présentent elles aussi des caractères communs avec cette lignée (Fig. 3).

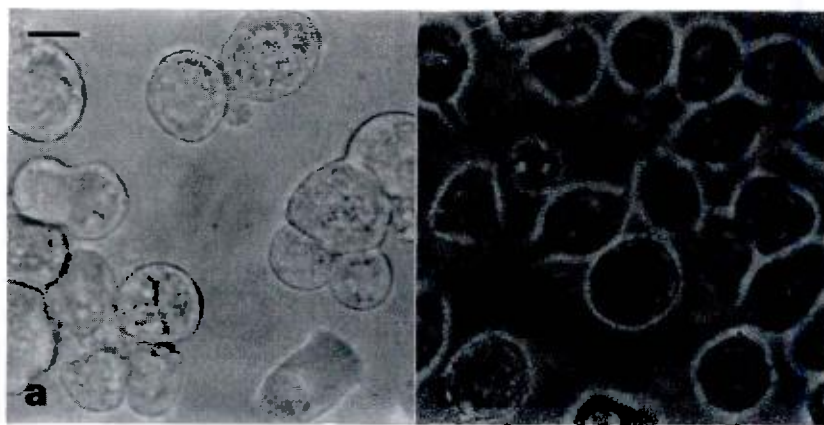


Fig. 4 : Effet du milieu ou de l'ecdysone sur L₃ après a : milieu I₁₀, b : milieu G101 avec 20-hydroxyecdysone 10⁻⁶ M.

Le trait représente 30 μ m.

Fig. 4 : Effect of the medium or ecdysone on L₃ after a : I₁₀ medium, b : G101 medium with 10⁻⁶ M 20-hydroxyecdysone.

The bar represents 30 μ m.

Pour les diverses souches, l'apport de 20-hydroxyecdysone entraîne, après 3 jours de culture, des modifications de bien moindre importance que celles provoquées par les changements de milieu. Il apparaît donc que la morphologie des cellules est un paramètre peu fiable dans la définition d'une lignée (Hink et coll., 1985). Elle n'est pas définie seulement par la nature des cellules mais beaucoup plus par les conditions de milieu et d'environnement auxquelles elles sont soumises (Fig. 4).

2) Croissance :

Les lignées L₁, L₂ et L₄ (Fig. 5), bien que distinctes morphologiquement, présentent des cinétiques de croissance voisine lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu G1010. Le temps de doublement est de 36 heures à partir du jour 2.

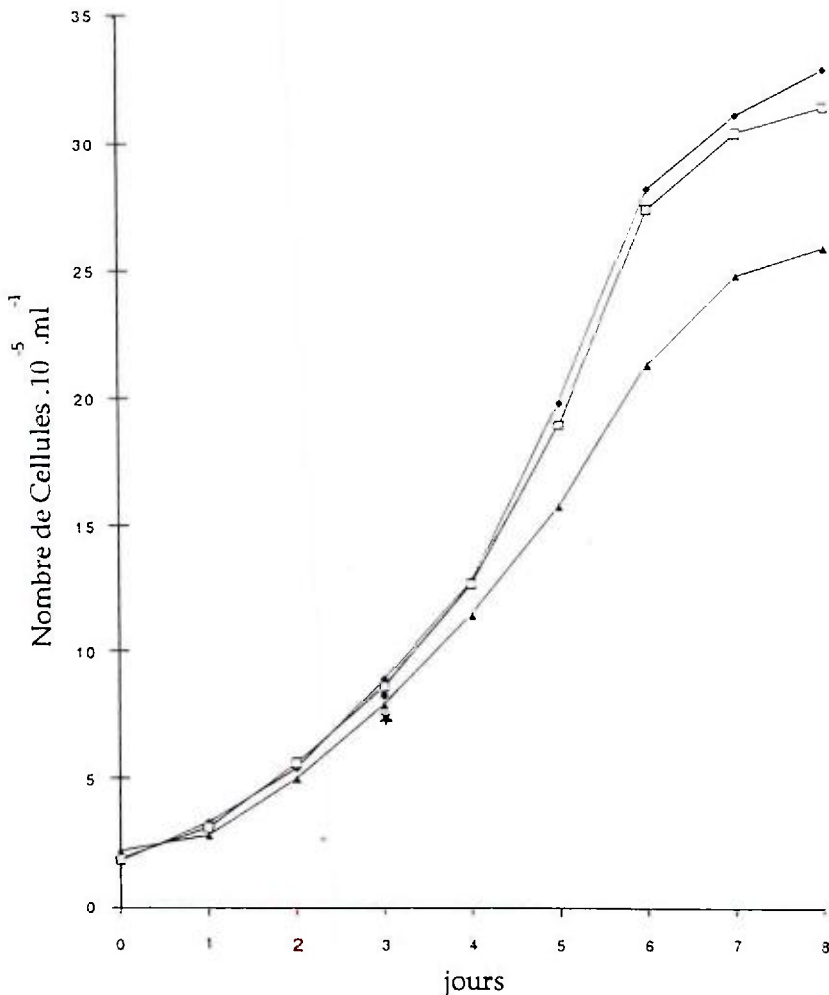


Fig. 5 : Courbes de croissance des lignées : ◆ L₁, □ L₂, ▲ L₄ - Milieu G1010.

Les points ● L₁, ★ L₂ avec 20-hydroxyecdysone 10^{-6} M depuis le repiquage.

Fig. 5 : Growth curves of lines : ◆ L₁, □ L₂, ▲ L₄ - G1010 medium.

Dots ● L₁, ★ L₂ with 10^{-6} M 20-hydroxyecdysone since sub-culturing.

L'addition de 20-hydroxyecdysone dès le repiquage n'a qu'un faible effet sur la prolifération. En ce qui concerne la lignée L₃ (Fig. 6), la courbe de croissance est obtenue avec G101. La multiplication cellulaire est moins rapide, le temps de doublement de 48 h à partir du jour 2. Deux clones sélectionnés ont des croissances identiques. Cette lignée tolère mal G1010 avec lequel la culture est perdue ; après trois passages, la croissance sur ce milieu est considérablement ralentie. La même courbe est obtenue lorsqu'on cultive les cellules avec G101 en présence d'ecdysone (10^{-6} M) dès le repiquage. On serait tenté de penser que ce milieu, qui contient de l'hémolymph, pourrait apporter de l'hormone. Dans un travail antérieur, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence par RIA de l'ecdysone dans ce milieu (Bosquet et coll., 1989).

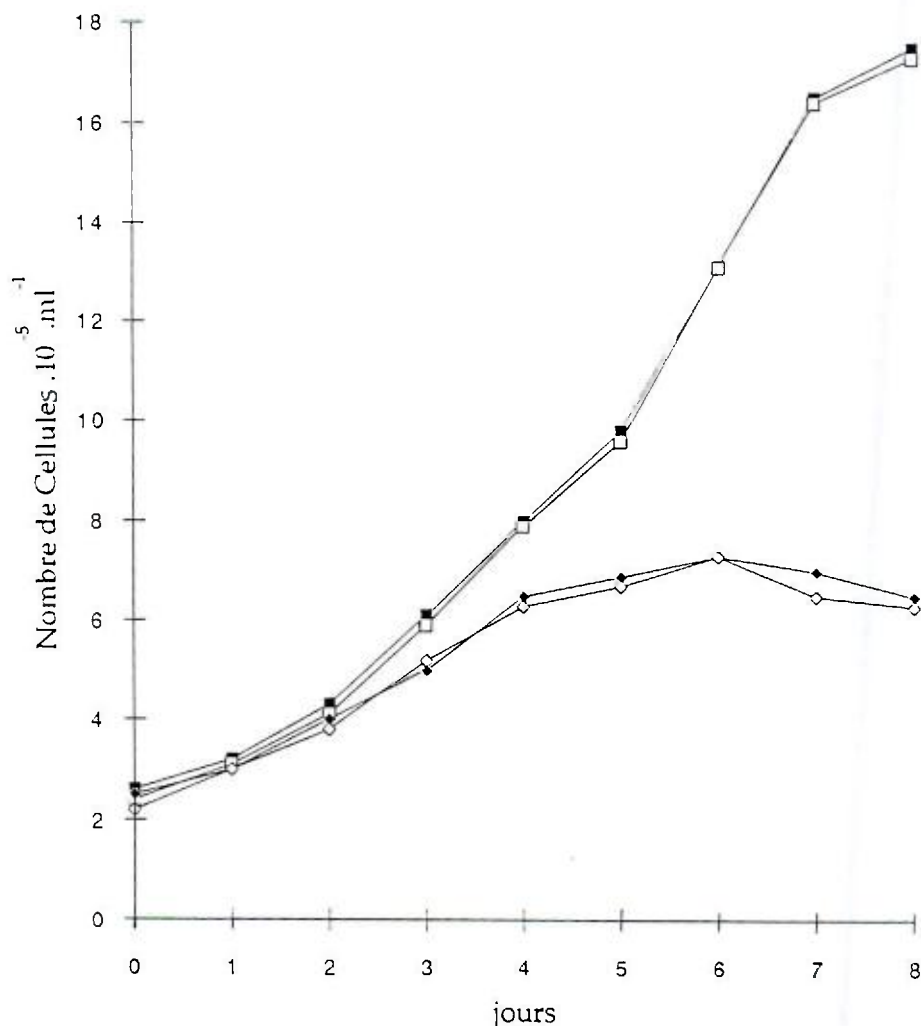


Fig. 6 : Courbes de croissance de la lignée L₃ ■ clone : e5, □ clone : d2, milieu G101, ◇ milieu G1010, ◆ milieu G101 + 20-hydroxyecdysone 10^{-6} M depuis le repiquage.

Fig. 6 : Growth curve of line L₃ ■ clone : e5, □ clone : d2, G101 medium, ◇ G1010 medium, ◆ G101 medium + 10^{-6} M 20-hydroxyecdysone since sub-culturing.

3) Autres éléments de caractérisation :

a) Analyse des ARNm :

Les ARNm sont extraits de cellules qui ont subi 24 heures d'action de la 20-hydroecdysone. Les témoins sont cultivés en conditions an hormonales. Pour toutes les souches, aucune hybridation n'est obtenue même en conditions de faible stringence avec les sondes correspondant à des gènes dont l'expression dans le disque est tributaire de l'hormone (Chareyre et coll., 1993). L'un de ces gènes code pour un collagène particulier. Il apparaît donc que ces gènes ne s'expriment pas dans nos lignées.

b) Synthèse de chitine :

Les cellules de disques, sous l'action de l'ecdysone, produisent de la chitine aussi bien *in vivo* (Sehnal, 1972) qu'*in vitro*, en cultures organotypiques (Nardi et Willis, 1979) ou en cultures cellulaires (Peel et coll., 1990). Cette capacité de synthèse est testée par la fixation de lectine fluorescente. Si l'on excepte quelques marquages erratiques localisés dans les noyaux, surtout dans la culture L₄ et indépendamment de tout traitement hormonal préalable, aucune lignée n'a fourni de réaction positive ni au niveau cytoplasmique, ni au niveau péricellulaire. La technique a été éprouvée sur des cellules de la lignée IALTNDI (Lynn et coll., 1982) aimablement fournie par le Dr Leach. Cette lignée provient de disques de *Trichoplusia ni*. Après un traitement de 24 heures à l'hormone, ces cellules répondent très positivement et de façon unanime. Aucune de nos souches n'est donc capable de synthétiser la N-acétyl-D-glucosamine.

c) Oxydation de la tyrosine (Fig. 7) :

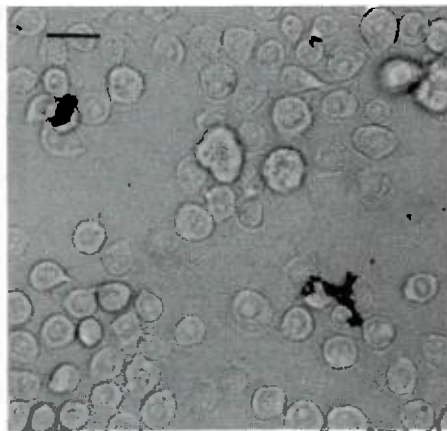
Toutes les lignées L₁, L₂, L₃ et L₄ mais aussi Bm5 et Bm36 oxydent la tyrosine fournie en présence de faible quantité de Dopa. Les témoins, PBS seul, Dopa seule ou réaction effectuée en présence de phénylthiourée, sont au contraire tous négatifs. Toutes les lignées possèdent donc une tyrosinase inhibée par la phénylthiourée. Cette réaction permet de caractériser des cellules sanguines (Richards, 1978). Par contre, la lignée TNDI, qui provient authentiquement de disques imaginaux, a fourni des résultats totalement négatifs.

Fig. 7 : Oxydation de la tyrosine par une tyrosinase bloquée par la phénylthiourée.

Résultats obtenus avec L₁ à titre d'exemple. Les lignées L₂, L₃, L₄, Bm5, Bm36 donnent des figures identiques. Les cellules sont détériorées par leur passage à 34 °C. Le trait représente 50 µm.

Fig. 7 : Oxidation of tyrosine by a tyrosinase inhibited by phenylthiourea.

Results obtained with L₁ as an example. Lines L₂, L₃, L₄, Bm5 and Bm36 gave identical patterns. The cells were damaged by being passed at 34 °C. The bar represents 50 µm.



d) Capacité à phagocyter des particules inertes (Fig. 8) :

Les quatre lignées obtenues ainsi que Bm5 et Bm36 sont toutes capables d'absorber de fines particules de charbon de bois alors que TNDI en est parfaitement incapable.

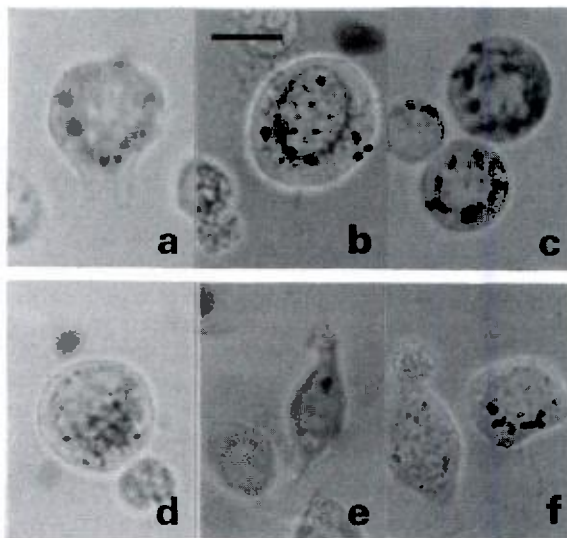


Fig. 8 : Capacités à phagocyter des particules de charbon de bois après 12 heures de contact.

a : Bm5, b : L₁, c : Bm36, d : L₂, e : L₃, f : L₄.
On remarque que L₃ est moins active. Le trait représente 20 µm.

Fig. 8 : Phagocytosis ability for charcoal particles after 12 hours of contact.

a : Bm5, b : L₁, c : Bm36, d : L₂, e : L₃, f : L₄. It can be noted that L₃ was less active. The bar represents 20 µm.

e) Adhésion sur collagène :

Les essais de cultures, avec les mêmes milieux, sur boîtes revêtues de collagène I se sont traduits par des cellules toutes flottantes alors qu'elles ont une bonne adhérence sur les flacons ordinaires.

DISCUSSION

Si l'on récapitule les principaux résultats : deux lignées et une culture transitoire sont obtenues grâce à l'intervention de cellules accompagnatrices ou de milieu conditionné, les deux premières (L₁, L₂) sont acquises à partir de cellules majoritairement différenciées. La dernière lignée (L₃) est obtenue sans cellules accompagnatrices ou leurs produits. D'autres différences dans les modalités expérimentales proviennent d'une part des traitements subis par les prélèvements tissulaires, d'autre part de la nature des milieux (composition, supplémentation).

L₁ et L₄, conduites par Bm5, ont acquis des caractères de Bm5, L₂, conduite par Bm36, des caractères de Bm36, enfin L₃, obtenue sans accompagnement ne ressemble pas aux autres lignées. Il n'est pas inutile de rappeler que, dans tous les cas, plusieurs essais ont été tentés (âge des larves, enzymes de dissociation, nature et supplémentation des milieux) et que seuls les essais positifs sont retenus ici. En d'autres termes, un ensemble de conditions particulières n'a permis d'obtenir qu'un seul type de cellules. Deux points successifs seront envisagés : d'abord, origine tissulaire des cellules qui ont donné des lignées ; ensuite, la nature des effets des cellules accompagnatrices et l'existence de facteurs.

A) Origine tissulaire :

Il apparaît donc très clairement que les 3 lignées L₁, L₂, L₃, isolées à partir de disques mis en culture présentent des propriétés de cellules sanguines, propriétés qu'elles partagent avec les lignées établies Bm5 et Bm36 : morphologie, capacité d'oxyder la tyrosine par une phénol oxydase sensible à la phénylthiourée, capacité de phagocyter des particules inertes. Elles sont incapables de synthétiser de la chitine et de se fixer sur du collagène, et elles ne répondent pas à un apport de 20-hydroecdysone par la synthèse d'ARNm caractéristiques (Chareyre et coll., 1993). Enfin, nous ajouterons que les patrons protéiques (résultats non montrés ici) font apparaître plus de différences entre L₁, L₂, L₃ qu'entre L₁ et Bm5 ou L₂ et Bm36. En outre, toutes les lignées précédentes ont des patrons

notablement différents des disques. Par contre, elles présentent de nombreux points communs avec la culture L₄ qui a été obtenue à partir d'hémocytes circulants.

Ces résultats constituent un faisceau de preuves suggérant que les nouvelles lignées, bien qu'issues de matériel prélevé avec les disques, éventuellement de leur partie la plus distale (L₃) ne sont pas d'origine épidermique mais plus vraisemblablement hémocytaire.

Il faut rappeler qu'en fin de 5e stade larvaire, les organes hémo-poïétiques étroitement accolés au disque *sensu stricto* entrent en période d'intense activité et forment des pro-hémocytes (Akai et coll., 1971). L'hypothèse est donc que, lors de la mise en culture, ce sont ces cellules et non les cellules des épithéliums alaires ou de l'enveloppe péripodiale qui prolifèrent. L'impossibilité d'obtenir des lignées cellulaires à partir de larves jeunes, chez lesquelles la prolifération des pro-hémocytes n'est pas induite renforce cette hypothèse. Dans le cas de L₃, obtenue à partir de la région distale du disque, il se peut que ce soient des hémocytes (ou pro-hémocytes) entraînés dans les lacunes interépithéliales qui sont à l'origine de la prolifération sans exclure cependant la présence résiduelle d'organes hémo-poïétiques.

Ceci pose le problème de l'origine des lignées cellulaires Bm5 et Bm36 obtenues après mise en culture de gaines ovariques. Les propriétés partagées avec toutes les lignées obtenues ici suggèrent qu'elles correspondent à des lignées sanguines, modifiées au niveau chromosomique mais ayant conservé une partie de leur différenciation (granulocyte-like pour Bm5, sphérulocyte-like pour Bm36). Il faut signaler que les cellules hémocyte-like dominent dans les cultures obtenues à partir de gaine ovarique (Oberlander et Miller, 1987). On peut rappeler que plusieurs lignées issues d'embryons de drosophiles Kc (Echalier et Ohanessian, 1969) ou S2 (Schneider, 1972) semblent être hémocytaires (Andres et Cherbas, 1992) : sous l'influence de la 20-hydroxyecdysone, elles expriment les gènes EIP 40 et 28/29 selon un patron temporel identique à celui des glandes lymphatiques, homologues des organes hémo-poïétiques de *Bombyx*. Il est évident que ces constatations reposent le problème de l'origine tissulaire réelle des diverses lignées obtenues à partir d'embryons ou de gaines ovariques.

B) Existence de facteurs :

Les lignées accompagnatrices Bm5 et Bm36 ont manifestement un rôle d'orientation respectivement pour les lignées L₁ et L₂ pour la production de facteurs passant dans le milieu. Ces facteurs présentent une spécificité zoologique comme le montre l'absence d'effet de SF₉ venant de *Spodoptera frugiperda*. Les informations recueillies sur Bm5 montrent que ce facteur doit être présent en quantité relativement importante pour agir. Il s'agit d'un facteur fragile, comme le montre la nécessité de prolonger l'apport de milieu conditionné frais et (ou) facilement adsorbable sur les membranes de filtration et qui ne résiste pas à la congélation. Ces caractéristiques font plutôt penser à un facteur soluble qu'à une particule virale.

S'agit-il de facteurs intervenant sur la prolifération cellulaire ou au niveau de la différenciation, ou enfin sur l'immortalisation des cellules. Nos résultats n'apportent que peu d'informations sur le dernier point, nous retiendrons seulement que les lignées L₁ et L₂ peuvent à leur tour agir sur des cellules venant d'être mises en culture. Le facteur produit par Bm5 agit aussi bien sur les cellules hémo-poïétiques que sur les cellules circulantes. Les cellules obtenues en culture, dans les mêmes conditions de milieu, possèdent la même morphologie. Cependant, L₁ (organes hémo-poïétiques) est une lignée immortalisée, L₄ (cellules sanguines) est une culture transitoire. Ce résultat nous conduirait à penser que le facteur agirait plutôt dans le sens de la différenciation, les cellules des organes hémo-poïétiques possédant, comme nous l'avons indiqué, des capacités de prolifération au moment de leur prélèvement. Il faut, à ce niveau également, se souvenir que L₃ a proliféré sans l'intervention de facteurs et qu'on ne peut tout à fait exclure pour elle qu'elle provient également des organes hémo-poïétiques. Chez les vertébrés sont décrites plusieurs situations où, en coculture, un type cellulaire permet la différenciation d'un autre type. Chez *Bombyx*, il apparaît plutôt une différenciation identique. Ces données conduiraient à l'idée qu'il existe chez les insectes des facteurs de différenciation particuliers pour les différentes catégories de cellules circulantes et ces facteurs pourraient être produits par ces cellules elles-mêmes au moins lorsqu'elles ont établi des lignées en culture.

CONCLUSION

Nous avons pu obtenir de nouvelles lignées cellulaires à partir de cellules prélevées avec le disque imaginal alaire *sensu stricto*. Ces cellules sont proches de lignées déjà établies (Bm5 et Bm36) et possèdent des caractères de cellules hématocytaires mais aucun de cellules épidermiques. Le type de lignée obtenue est influencé par la présence de cellules accompagnatrices ou l'addition de milieu conditionné par elles. Selon la nomenclature proposée par Hink (1980), ces lignées reçoivent donc les dénominations suivantes :

L₁ : BDI Bm HOa

(Biologie du développement des insectes, *Bombyx mori*, organe hématopoïétique, conduites par Bm5).

L₂ : BDI Bm HOa (... conduites par Bm36).

L₃ : BDI Bm CH (hématocytes circulants dans le disque).

L₄ : n'est pas une lignée définitivement établie.

Ces résultats ne nous ont pas permis d'obtenir des lignées de cellules épidermiques caractérisées. Ils ouvrent par contre des perspectives nouvelles concernant l'existence d'éventuels facteurs de différenciation des cellules sanguines d'insectes.

REFERENCES

- ABRAHAM E.G., MOUNIER N., BOSQUET G. (1993) Expression of a *Bombyx* cytoplasmic actin gene in cultured *Drosophila* cells : influence of 20-hydroxyecdysone and interference with expression of endogenous cytoplasmic actin genes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 23, 905-912.
- AIZAWA K., VAGO C. (1959) Culture *in vitro* de cellules séparées de tissus d'insectes. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 249, 928-930.
- AKAI H., SATO S. (1971) An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 17, 1665-1676.
- ANDRES A.J., CHERBAS P. (1992) Tissue-specific ecdysone responses : regulation of the *Drosophila* genes Eip28/29 and Eip40 during larval development. *Development*, 116, 865-876.
- BOSQUET G., FOURCHE J., GUILLET C. (1989) Respective contributions of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone to the regulation of major haemolymph protein synthesis in *Bombyx mori* larvae. *J. Insect Physiol.*, 35, 1005-1015.
- CHAABIHI N., OGLIASTRO M.H., MARTIN M., GIRAUD C., DEVAUCHELLE G. (1993) Competition between baculovirus polyhedrin and p10 gene expression during infection of insect cells. *J. Virol.*, 67, 2664-2671.
- CHAREYRE P., GUILLET C., BESSON M.-T., FOURCHE J., BOSQUET G. (1993) Genes expressed during the differentiation of the pupal wings are also transiently expressed during the larval moult in *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 239-246.
- CHO T., SHULER M.L., GRANADOS R.R. (1989) Current developments in new media and cell culture systems for the large-scale production of insect cells. *Advances in cell culture*, 7, 261-277.
- CULLEN C.F., MILNER M.J. (1991) Parameters of growth in primary cultures and cell lines established from *Drosophila* imaginal discs. *Tissue and Cell*, 23, 29-39.
- CURRIE D.A., MILNER M.J., EVANS C.W. (1988) The growth and differentiation *in vitro* of leg and wing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster*. *Development*, 102, 805-814.
- ECHALIER G., OHANESSIAN A. (1970) *In vitro* culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. *In vitro*, 6, 162-172.
- GOODWIN R.H. (1990) Lipid cell culture supplements. *Nature*, 347, 209-210.
- GRACE T.D.C. (1967) Establishment of a line of cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 216, 613.
- HARTIG P.C., CARDON M.C. (1992) Rapid efficient production of Baculovirus expression vector. *Virol. Methods*, 38, 61-70.
- HASSKARL E., OBERLANDER H., STEPHENS R.E. (1973) Microtubules and tracheole migration in wing disks of *Galleria mellonella*. *Developmental Biol.*, 33(2), 334-343.

- HINK W.F. (1980) The 1979 compilation of invertebrate cell lines and culture media. *In Invertebrate System in Vitro*. Ed. Kurstak, Maramorosch K., Dubendorfer A., 553-578. Elsevier/North Holland Biochemical Press E., Amsterdam.
- HINK W.F. (1991) A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins. *In vitro Cell Devl. Biol.*, 27A, 397-401.
- HINK W.F., HALL (1989) Recent established invertebrates cell lines. *In Invertebrate Cell System Application*. Vol. II, 269-293. Ed. J. Mitsuhashi. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- HINK W.F., RALPH D.A., JOPLIN K.H. (1985) Metabolism and characterisation of insect cell culture. *In Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology*. Ed. G.A. Kerkut and L.J. Gilbert, Vol. 10, 510-547. Pergamon Press, Oxford, New York.
- INOUE H., MITSUHASHI J. (1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. *Appl. Ent. Zool.*, 23, 8-14.
- KAWASAKI H. (1988) Studies on the wing disc morphogenesis according to the *Bombyx* metamorphosis. Special Bulletin of College of Agriculture, Utsunomiya University, 50, 1-53.
- LAVENEAU L. (1976) Etude descriptive et expérimentale du développement post-embryonnaire des ébauches alaires de quelques lépidoptères. 221 pp., Thèse (Bordeaux).
- LYNN D.E. (1989) Methods for the development of cell lines from insects. *J. Tissue Culture Methods*, 12, 23-29.
- LYNN D.E., MILLER S.G., OBERLANDER H. (1982) Establishment of a cell line from lepidoptera wing imaginal discs : induction of newly synthesized proteins by 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2589-2593.
- LYNN D.E., OBERLANDER H. (1983) The establishment of cell lines from imaginal wing discs of *Spodoptera frugiperda* and *Plodia interpunctella*. *J. Insect Physiol.*, 29, 591-596.
- LYNN D.E., OBERLANDER H. (1986) Obtainment of hormonally sensitive cell lines from imaginal discs of Lepidoptera species. *In Technique of Life Science. In vitro invertebrate hormones and genes*. 1-12. Ed. E. Kurstak, Elsevier Scientific, Ireland.
- LYNN D.E., OBERLANDER H. (1989) Characteristics of cell lines derived from imaginal discs of three species of *Lepidoptera*. *In Invertebrates Cell System Application*. Vol. II, 207-221. Ed. J. Mitsuhashi, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- LYNN D.E., OBERLANDER H., FERKOVICH M. (1985) Induction of vesicle formation in a cell line derived from imaginal discs. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 21, 277-281.
- MAEDA S., FURUSAWA M. (1985) Production of human α -interferon in silkworm using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus vector. *Develop. Biol. Standard*, 66, 75-82.
- MAIORELLA B., INLOW D., SHAUGER A., HARANO D. (1988) Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. *BioTechnology*, 6, 1406-1410.
- MAUCHAMP B. (1980) Aspects ultrastructuraux, biochimiques et endocrines de la différenciation des formations épidermiques chez *Pieris brassicae*. 208 pp., Thèse (Paris).
- MAUCHAMP B., SCHREVEL J. (1977) Observations en microscopie à fluorescence de la cuticule des insectes : une méthode faisant appel aux propriétés spécifiques de la WGA vis-à-vis des glycoconjugués de la chitine. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 285, série D, 1107-1110.
- McINTOSH A.H., IGNOFFO C.M., QUHOU C., PAPPAS M. (1983) Establishment of a cell line from *Heliothis armigera*. *In vitro*, 19, 589-590.
- NARDI J.B. (1984) Tracheole migration in an insect wing. *Roux' Arch. Dev. Biol.*, 194, 1-8.
- NARDI J.B., HARDT T.A., MAGEE-ADAMS S.M., OSTERBUR D.L. (1985) Morphogenesis in wing imaginal discs : its relationship to changes in the extra cellular matrix. *Tissue and Cell*, 17, 473-490.
- NARDI J.B., WILLIS J.H. (1979) Control of cuticle formation by wing imaginal discs *in vitro*. *Dev. Biol.*, 68, 381-395.
- NITTONO Y. (1960) Studies on the blood cells in the silkworm. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 16, 171-266.
- OBERLANDER H., LYNN D.E. (1984) Morphogenesis in insect tissue culture. *Advances in cell culture*, 2, 237-265.
- OBERLANDER H., MILLER S. (1987) Lepidopteran cell lines : tools for research in physiology, development and genetics. *Advances in cell culture*, 5, 187-207.

- PEARSE A.G.E. (1972) Histochemistry theoretical and applied. 1339. Ed. Churchill-Livingstone. Edinburgh, London, New York.
- PEEL D.J., MILNER M.J. (1990) The diversity of cell morphology in cloned cell lines derived from *Drosophila* imaginal discs. Roux' Arch Dev. Biol., 198, 479-482.
- PEEL D.J., JOHNSON S.A., MILNER M.J. (1990) The ultrastructure of imaginal disc cells in primary cultures and during cell aggregation in continuous cell lines. Tissue and Cell, 22, 749-758.
- PERONNET F., ROPP M., ROLLET E., BECKER J.L., BECKER J., MAISONHAUTE C., COURGEON A.M., ECHALIER G., BEST-BELPOMME M. (1986) *Drosophila* cells in culture as a model for the study of ecdysteroid action. In Techniques *in vitro* : Invertebrate hormones and genes. Ed. E. Kurstak, Elsevier Scientific, Ireland.
- PORCHERON P. (1991) Insect tissue culture systems : models for study of hormonal control of development. *In vitro* Cell. Dev. Biol., 27A, 479-482.
- QUIOT J.-M. (1982) Establishment of a cell line (SPC Bm36) from the ovaries of *Bombyx mori*. Sericologia, 22(1), 22-31.
- RICHARDS A.G. (1978) Chemistry of insect cuticle. In Biochemistry of Insecta. 205-232. Ed. M. Rockstein, Acad. Press, New York, San Francisco, London.
- SANG J.H. (1981) *Drosophila* cells and cell lines. Advances in cell culture, 1, 125-182.
- SAXENA B.P. (1992) Comparative study of haemocytes of three lepidopterans by light and scanning electron microscopy. Acta Entomol. Bohemoslov., 89, 323-329.
- SCHMIT A., ROWLEY A.F., RATCLIFFE N.A. (1977) The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation. J. Invert. Pathol., 29, 232-234.
- SCHNEIDER I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365.
- SEHNAL F. (1972) Action of ecdysone on ligated larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). Induction of development. Acta Entomol. Bohemoslov., 69, 143-155.
- VAGO C., CHASTANG S. (1958) Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés. Experientia, 14, 110-113.
- VAUGHN J.L., GOODWIN R.H., TOMPKINS G.J., McCAWLEY P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *In vitro*, 13, 213-217.
- WALKER V.K. Gene transfer in insects. Advances in cell culture, 7, 87-124.
- WEISS S.A., SMITH G.C., KALTER S.S., VAUGHN J.L. (1981) Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. *In vitro*, 17, 495-502.
- WYATT S.S. (1986) Culture *in vitro* of tissue from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Gen. Physiol., 39, 841-852.
- WYSS C. (1982) Ecdysterone, insulin and fly extract needed for the proliferation of normal *Drosophila* cells in defined medium. Exp. Cell Res., 139, 297-307.
- YUNKER C.E., VAUGHN J.L., CORY J. (1967) Adaptation of an insect cell line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of insect hemolymph. Science, 155, 1565-1566.
- ZHANG J., KALOGERAKIS, BEHII L.A., TATROV K. (1992) Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of Baculovirus. Biotech. Bioeng., 40, 1165-1172.

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF CELL LINES FROM WING IMAGINAL DISCS OF *BOMBYX MORI*

J. FOURCHE, S. HACHOUF, P. CHAREYRE, M.-T. BESSON, J. DEMONT & G. BOSQUET

Biologie du Développement des Insectes, CGMC-CNRS-UMR 106, Université Claude-Bernard
Lyon I, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Attempts to culture cells from wing imaginal discs of Bombyx mori were made. Several precultures were carried out as cocultures with cells from already established lines of Bombyx mori or in the presence of a medium conditioned by them. The lines thus obtained had the characters of the companion cells. Another line obtained directly exhibited different characters. The techniques used make the results thoroughly reproducible. The morphology of the cells was significantly altered by the culture medium used. The characterisation tests used (mRNA hybridisation, tyrosine oxidation, chitine synthesis, phagocytosis ability) led to the conclusion that the lines obtained originated from haemocytes (a character which they share with older lines) but not from the epidermis. They could be derived from haemopoietic organs which are closely bound to wing discs or even from intradiscal circulating cells. These results pose the problem of the existence of differentiation factors of insect blood cell lines.

INTRODUCTION

Since the 1950s (Wyatt, 1956 ; Vago and Chastang, 1958 ; Aizawa and Vago, 1959), many cell lines have been developed from various insect organs belonging to different orders (Hink, 1980 ; Sang, 1981 ; Hink *et al.*, 1985 ; Hink and Hall, 1987).

Such lines were developed to meet several purposes :

- Production of viruses either to study their cycle (Cho *et al.*, 1989) or to develop new biological insecticides (Weiss *et al.*, 1981 ; Cho *et al.*, 1989 ; Zhang *et al.*, 1992), or again to obtain biotechnological tools (Maeda and Furusawa, 1987 ; Maiorella *et al.*, 1988 ; Hink, 1991 ; Hartig and Cardon, 1992 ; Chaabihi *et al.*, 1993).

- Study of developmental biology, in particular to analyse hormonal activity (Lynn, 1982 ; Péronnet *et al.*, 1986 ; Porcheron, 1991) and the regulation of transferred genes (Oberlander and Miller, 1987 ; Walker, 1989).

In order to analyse the differentiation of the wing from the imaginal disc in *Bombyx mori*, we undertook a study on the regulation of genes expressing at several stages. For this purpose, a disc cell line would be of great help. Several imaginal wing disc cell lines have already been obtained in *Drosophila* (Wyss, 1982 ; Currie *et al.*, 1988 ; Peel *et al.*, 1990 ; Cullen and Milner, 1991) as well as in several lepidopteran species which are rather distant from *Bombyx* : *Spodoptera frugiperda*, *Plodia interpunctella* (Lynn and Oberlander, 1983), *Trichoplusia ni* (Lynn *et al.*, 1982 ; Lynn and Oberlander, 1986 ; Lynn *et al.*, 1987).

This attempt showed, as reported by Cullen and Miller (1991), that initiating a primary culture remained an art rather than an exact science. Several lines were obtained using distinct — and sometimes original — preculture methods : cocultures in which the partners were separated by a

membrane or use of media conditioned by a pre-established line. These various techniques lead to an excellent reproducibility of the results. The characteristics of the line obtained depend on the companion cell line. After several characterisation tests, it appeared that the lines obtained probably did not originate from the epidermis but from haemocytes. This result raises the question of the origin of other pre-existing lines of *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

A. Biological material :

The animals used were *Bombyx mori* hybrids of the European strains, 200 and 300, supplied by the Unité nationale séricicole (La Mulatière, France) and reared on mulberry leaves at 22 °C or, during winter, on an artificial diet at 25 °C. The larvae were synchronised at the beginning of each instar.

The wing imaginal discs originate from the embryonic ectoderm. In the 5th instar, the disc includes the wing anlage proper, with two cellular layers giving the dorsal and ventral wing epithelia connected by a matrix, and the peripodial membrane also made up of a reflected epidermic base surrounding the anlage almost completely. The outer side of the peripodial membrane is lined with a connective lamina (Lavanseau, 1976 ; Mauchamp, 1979 ; Nardi, 1984 ; Nardi *et al.*, 1985 ; Kawasaki, 1988). This set is attached to the epidermis of the body wall. In the hilum region, which is linked to a big tracheal trunk, there is a large mass of tracheoles which, during the differentiation preceding pupation, will migrate into interepithelial gaps (Hasskarl *et al.*, 1973 ; Nardi *et al.*, 1985). The disc also contains cells which will form neurones (Nardi, 1984). At the end of the stage, haemolymph and haemocytes penetrate through the gaps.

In *Bombyx* (Akai and Sato, 1971), the haemopoietic organs, which are made up of several haemocyte stem cell clusters, are located near the hilum region. At the end of the 5th instar, these clusters increase in number and size. They undergo an intense mitotic activity which is accompanied by differentiation of the various types of haemocytes : prohaemocytes, granulocytes, spherulocytes and plasmocytes which pass into the blood. Haemopoietic organs are surrounded by a connective lamina which, with the tracheae, strongly attach them to the disc.

B. Preparation of the larvae :

All the manipulations were conducted under a laminar flow hood. The larvae were thoroughly washed by successive dippings into Teepol (V/V 2.5 %), sodium hypochlorite (V/V 2.5 %) and ethanol (V/V 70 %) solutions. A linear incision was made between the prothoracic spiracle and the first abdominal segment and the discs were collected after sectioning the big tracheal trunks. For several tests, discs were collected from larvae taken at the end of the 4th instar or at different times during the 5th instar, before or after the onset of spinning or even after 20-hydroxyecdysone injections. Positive results were obtained only with larvae taken on the 5th of 6th day of the 5th instar.

C. Preparation of the discs :

1) Rinsing :

The discs were placed into Petri dishes of 35 mm in diameter containing 3 ml of either Dulbecco PBS (Gibco) or culture medium supplemented with 0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fungisone (Gibco), 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicilline-streptomycine (Boehringer) and 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ phenylthiourea.

2) Fragmentation :

The big tracheal trunks and the fat body lobes collected during the dissection were removed from the discs under a magnifying lens. According to experiments, the discs were subjected to two types of treatment :

- either they were transferred into 50 μl of medium and immediately cut with scissors into about ten small fragments;
- or, after being dissected, they underwent ablation of about one third of their volume, on the hilum side, in order to remove tracheoles and haemopoietic organs. After being pooled in 50 μl , the remaining fragments were chopped as finely as possible with scissors. Contrary to the results obtained

by Lynn and Oberlander (1983), all attempts to initiate a culture at this stage of tissue dissociation remained unsuccessful.

3) Enzymatic dissociation :

In most cases, the disc fragments underwent one of the enzyme treatments indicated in the literature (Table I). The use of hyaluronidase was justified by the high content of hyaluronic acid in the inter-epithelial matrix (Nardi *et al.*, 1985). Mixtures of the different enzymes were used at the concentrations indicated (Table I). In each case, enzymes were prepared as stock solutions in UHQ water (Elga), aliquoted and stored at -20°C . Only trypsin proved very harmful for the cells.

To obtain the concentrations indicated the enzymes were added into 1 ml of basic medium for 12 discs. The tubes were placed at about 25°C on a rotary shaker turning at 1 revolution per second. The treatment was stopped by adding 3 ml of culture medium supplemented with 10 % foetal bovine serum. The tube was centrifuged 3 minutes at 100 g. The pellet was resuspended in 250 ml of the final medium. The whole set was pipetted gently and divided into 5 doses of 50 μl placed into five wells of a 24-well plate (Costar). The preparation was left to rest for 10 minutes to allow the disc and cell fragments to adhere (Lynn *et al.*, 1982).

As the activity of some of the enzymes used is modified by the presence or the absence of divalent cations, dissociation tests were made in PBS supplemented with Ca^{2+} or EDTA. These supplementations did not change the results.

D. Preparation of the wing disc cell lines :

All the cultures were conducted at 25°C in a dark atmospheric oven.

1) Media used :

Two basic media were used : Grace (Gibco) and IPL41 (Gibco). In some initial tests, they were modified to adjust the pH and osmolarity to the values of the haemolymph at the time of disc collection.

Several supplementations with nutrient [lactalbumin hydrolysate, yeast extracts, lipid complex (Goodwin, 1990)] or with various factors [insulin, 20-hydroxyecdysone (Wyss, 1982 ; Currie *et al.*, 1988)], were tested in preliminary experiments. Only four preparations were retained for the precultures.

- Grace medium (G1010) supplemented with 10 % foetal calf serum (Gibco (Yunker *et al.*, 1967) and 10 % *Bombyx* heated haemolymph.
- Grace medium (G101) supplemented with 10 % serum and 1 % bovine albumin (SIGMA).
- IPL41 medium (I10) supplemented with 10 % serum.
- IPL41 (Ic) (after Lynn, 1989) supplemented with 10 % serum, 1 % lipid complex (Gibco), 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lactalbumin (SIGMA) and 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ yeast extract (SIGMA).

The serum was heated for 35 minutes at 55°C and filtrated at $0.2\ \mu\text{m}$. A mixture of Penicillin-Streptomycin (Boehringer) at the concentration indicated by the manufacturer was added to all media.

2) Preparation of the haemolymph :

The haemolymph was collected from larvae taken on the 5th or 6th day of the 5th instar by cutting one of the prolegs. The haemolymph samples from 6 larvae were pooled in a tube placed in ice and immediately heated at 55°C for 40 minutes. The contents of four tubes were put together before centrifugation for 10 min. at 3 000 g, 0°C . The supernatant, divided into 10 ml doses, was stored at -20°C . Owing to the viscosity of the haemolymph, the mixture was filtered through a $0.2\ \mu\text{m}$ filter under nitrogen (Seitz EKS₂ filter) only after dilution in the medium.

3) Cocultures :

They were all conducted as follows : companion cells from pre-existing lines were cultured in an insert, 12 mm in diameter, with a porous bottom (pore diameter $0.4\ \mu\text{m}$) (Millipore Millicell PCF). This insert was placed into the well (24-well plate, Costar) where tissue fragments were cultured.

Companion cells belonged to three insert cell lines, two from *Bombyx*: Bm5, a line established by Grace (1967), SPC Bm36 (Quiot, 1982), and one from *Spodoptera*, SF9 (Vaughn *et al.*, 1977).

After the fragments were left to settle for 10 min., 600 μ l of the selected medium were added. The insert was placed and 450 μ l of a 4-day culture in the same medium as the chosen companion cells (3 to 4 $\cdot 10^5$ cells) were added. The insert, the companion cells and 500 μ l of the medium were changed every 4 to 5 days.

The dishes were kept closed with a transparent adhesive film (Titerpek Flow).

In all the experiments, a well containing the insert and the companion cells only was maintained as a control. Daily examinations were made to ensure that no cell had changed compartments.

4) Conditioned medium :

In another set of experiments, the companion cells were replaced by a medium conditioned by the same lines cultured under standard conditions (5 ml, 25 cm² flask) for 4 to 5 days. Floating cells were exceptional. Three ml of the medium were collected and centrifuged for 10 min. at 1 000 g at room temperature ; the upper half of the supernatant was recovered and immediately used in varying proportions with a fresh medium. The medium was renewed by halves every other day. A control well was supplemented with conditioned medium only. The conditioned medium was also subjected to several treatments : filtration (millex 0.22 μ m or 0.44 μ m - Millipore), ultracentrifugation (25 000 g, 0 °C, 90 min.), concentration (ultra-free PF, Millipore), freezing at -20 °C.

E) Blood cell culture :

Two larvae on the 5th day of the 5th instar were bled by cutting a proleg. The haemolymph was collected at room temperature in a tube containing 3 ml of lc medium supplemented with 6 μ g.ml⁻¹ phenylthiourea. This preparation was centrifuged (100 g, 3 min.). The pellet was resuspended in 3 ml of medium and centrifuged again. The cells were recovered in 150 μ l and distributed into 3 wells to which 500 μ l lc and 500 μ l of lc conditioned by Bm5 were added. The medium was renewed by halves every week.

F) Characterisation of the cell lines :

1) Growth curve :

Eight culture flasks (25 cm² flasks) containing 5 ml of medium were seeded from a 5-day culture at the rate of 10⁶ cells per flask. A count was made daily using a Malassez cell. This was carried out with two different media when required. The effects of 20-hydroxyecdysone were evaluated by adding the hormone to the final concentration of 10⁻⁶ M, either after 48 hours of culture or on subculturing.

2) Cell cloning :

A dilution of the culture was performed so as to obtain a final density of about 100 cells for 10 ml. This suspension was divided into aliquot parts of 100 μ l placed in the wells of a 96-well dish (Costar). After one month, the clones were transferred to in wells of a 6-well dishes with 2.5 ml medium per well.

3) Hybridisation of messenger RNAs :

The total mRNAs extracted from the 5-day cultures under hormonal conditions (10⁻⁶ M 20-hydroxyecdysone for 24 h.) or under anhormonal conditions were hybridised to the probes corresponding to genes whose expression in the disc was modified by the hormone (Charcyre *et al.*, 1993). Preparation of the total RNAs, labelling of the probes and hybridisation conditions were as previously described (Abraham *et al.*, 1993).

4) Presence of tyrosinase :

The technique of Okun (1969) (*in* Pearce, 1972) used in *Galleria* (Schmit *et al.*, 1976) was modified by decreasing the incubation temperature to 34 °C and replacing, for the controls, sodium

diethyldithiocarbonate by 6 µg/ml phenylthiourea, a selective inhibitor haemocyte tyrosinase (Richards, 1978).

5) Chitine synthesis :

The test of lectin WGA FITC-labelled (Sigma) used in *Pieris* (Mauchamp and Schrevel, 1977) was applied to cells which had been subcultured for 4 days on an 8-well Microtech dish, then treated or not with 10^{-6} M 20-hydroxyecdysone for 24 hours. WGA has a strong affinity for *N*-acetyl-D-glucosamine.

6) Culture on collagen substitute :

Cultures were made in dishes coated with collagen I (Corning). The media were as usual.

7) Phagocytosis ability :

Vegetable charcoal (Prolabo) was finely ground with a mortar and sterilised. Three to 5 mg of the powder were suspended in 5 ml of medium. After 6 hours of decantation, 25 µl of the superficial suspension were added to the 4-day-culture flasks. After 12 hours of contact, the flasks were shaken gently and rinsed twice with PBS and before microscopic examination.

RESULTS

A) Establishment of the cell lines :

1) Cultures from disc cells :

The lines obtained are first referred to by a temporary registration which is modified later in this report, according to the identification test results.

a) Line L₁ :

α. Primary culture :

This line was obtained from wing discs (5th instar, 5th day) cut with scissors, treated with collagenase and then cultured either in the presence of Bm5 cells or with the medium conditioned by the same cells. Only I10 medium gave a positive result.

The preparation placed into the well (24-well dish) first contained round, isolated cells and small cell bundles (further experiments showed that there were two types of bundles).

In the absence of companion cells or of conditioned medium, isolated cells changed in shape and took on a pseudo-fibroblastic aspect, became loaded with peri-nuclear inclusions and often formed a network in which the cellular structure disappeared (Fig. 1). This degradation was rapid, 4 to 5 days with G1010 medium, much less with I10. No proliferation was observed.

In the presence of Bm5 companion cells and with a haemolymph-free medium, some bundles developed into vesicles with only one layer of cells emitting many rays within the hollow sphere. The vesicles showed many characters which were common to those described in other lepidoptera, *Plodia* or *Spodoptera* (Lynn and Oberlander, 1983 ; Lynn *et al.*, 1982 ; Lynn *et coll.*, 1985), or in *Drosophila* (Currie *et al.*, 1988), in which they are characteristic of imaginal disc cultures. The size of these vesicles increased gradually. When they were dissociated, they reconstituted smaller vesicles, which suggests the secretion of cellular recognition molecules on their surface. These vesicles could remain undamaged for more than 6 weeks. They did not seem to release any cells ; this could be due to the presence of cytoplasmic rays inside the vesicle, a feature which does not exist in other species. Conversely, in the presence of haemolymph in the medium, these vesicles disappeared in less than a week.

From 10 to 15 days after the onset of the culture, cellular migrations started from those bundles which had not produced vesicles (Fig. 2). Several proliferation centres often appeared simultaneously. These cells showed two nucleoli which often were hardly visible. They gradually increased in size from 10 µm to 20-25 µm whereas the number of nucleoli increased to 5 or 6 and became more visible. The modifications could result from significant chromosomal transformations through

polyploidisation (McIntoch *et al.*, 1983), aneuploidisation (Inoue and Mitsuhashi, 1988) or chromosomal fragmentation, as frequently observed in cell cultures of lepidopterans (Lynn *et al.*, 1982 ; Oberlander and Miller, 1987).

The culture of dissociated disc fragments in the presence of Bm5-conditioned medium instead of companion cells led to the same results. No distinction could be made between the lines obtained either way.

β. Time span for culture establishment :

It corresponded to the time necessary to obtain a bed of confluent cells from a culture of disc fragments. It was then possible to transfer the culture to a well of a 6-well dish containing 3 ml of basic medium, without conditioned medium or companion cells. When 50 % conditioned medium was used for the primary culture, the time span was 18 days with an excellent reproducibility. This time was strongly dependent on the conditions of addition of companion cells or conditioned medium.

• Effect of a delay in the addition of companion cells :

When the insert was placed 24 hr or 48 hr after culture initiation, the time span for culture establishment increased to 19 and 20 days, respectively. Under those conditions, the cells kept the same proliferation ability. Conversely, when the insert was placed after 72 hr, no proliferation was observed and degradation processes occurred as in the control.

• Withdrawal of the insert after increasing presence times (Table II) :

Companion cells should be present for more than 2 days for proliferation to start. Proliferation was more intense when the insert was left for 4 days ; beyond this length of time it was no longer effective. These results suggest that companion cells produced a 'factor' received by an increasing number of cells which thus acquired an ability to proliferate and then became able to perform this function themselves.

• Effect of different concentrations of conditioned medium (Table III) :

When pure, the conditioned medium did not allow any proliferation, probably owing to exhaustion of an essential nutritional component. At concentrations of 75 or 90 %, the conditioned medium had the same stimulation effect. At lower concentrations, the time span for culture establishment increased. For concentrations lower than 12.5 % no proliferation occurred. The 18-day duration, which could not be shortened, was apparently necessary for the cellular changes which made proliferation possible. It was during this period that the increase in the cell size and the number of nucleoli was observed. It should be mentioned that addition of conditioned medium was necessary for about 12 days, whereas the presence of the insert and companiond cells was required for 4 days only.

- Effects of modifications of the conditioned medium :

When the conditioned medium was concentrated under pressure before being added to the cells, it did not stimulate proliferation. The same was observed when it was frozen at -20 °C or filtered at 0.22 µm. Conversely, the activity was maintained for pores whose diameter was 0.44 µm (this corresponds to the size of the insert pores). After centrifugation at 25 000 g, no biologically active pellet was found.

b) Line L₂ :

The treatment of the discs was identical. SPC Bm36 cells were used as companion cells or to condition the medium. Initial events were similar. The time span for subcultures in 6-well dishes was 28 days. Quiot (1982) reported a time span of 3 weeks for the first subculture of a culture under different conditions. Here again, both the insert and the conditioned medium led to the same results as regards the type of lines obtained.

c) Use of Line L₁ and L₂ as companion cells :

L₁ and L₂ cells after the 10th subculture were used as companion cells. The same results were obtained. They had therefore acquired the property to initiate proliferation of newly cultured cells.

d) Use of SF₉ as companion cells :

This line, which was derived from *Spodoptera*, did not cause proliferation under the conditions used for other lines.

e) Line L₃ :

It was obtained from discs (collected in the 5th instar, 6th day) which were subjected to ablation of the hilum region, very fine fragmentation and a hyaluronidase-protease 8 treatment (Table I). No companion cells were used. After a rest of 10 minutes, 20 µl of medium (G101) were added to the preparation. The same quantity was added on the three following days. Then, from the 5th day, half of the medium was replaced by fresh medium every seven days.

In this case, no vesicles were observed probably owing to the use of specific dissociation enzymes. Proliferation could be associated, or not, with the presence of cell bundles. The first possibility puts into question the actual total elimination of haemopoietic organs. The culture in a 6-well dish was performed after 25 days; the experiment was reproducible under the same conditions. This line was therefore the only one obtained without the involvement of factors produced by lines formerly established.

f) Maintenance and preservation :

α. Transfer to a flask :

L₁ : cell proliferation in a 6-well dish was rapid after renewal of half of the medium. After 3 days, the transfer to a flask (25 cm², 5 ml of medium) was possible 4 days later. G10, G1010 and Ic media were quite suited to this line which, like Bm5, tended to float partially as it aged. Subculturing was performed by loosening the cells which remained adhesive using a Pasteur pipette with a crooked end. Routinely, the medium was centrifugated for 3 minutes at 100 g and 4 ml of the supernatant were eliminated to concentrate the cells.

L₂ cells needed to remain 8 days in a 6-well dish before transfer, they grew well on either G10 or G1010.

The transfer of L₃ cells to a flask was done 15 days after seeding of the 6-well dish. This line was cultured on G101 medium. In all cases, subcultures were made weekly at 1/2 then after a few weeks at 1/4.

β. Cell preservation :

After the 10th transfer, the cells resisted quite well to gradual freezing in the basic medium with 7.5 % DMSO and preservation in liquid nitrogen. Any attempt in the early transfers led, as is usual, to the loss of the line. Resistance to a freezing-thawing cycle is a good test to ensure that the line is a permanent one. This feature was acquired early in the lines obtained.

2) Culture of circulating cells (L₄) :

This culture was obtained from circulating haemocytes with Ic medium, half of which was conditioned by Bm5. Preliminary experiments revealed that no proliferation was obtained, either with conditioned medium or with fresh medium used separately. When the culture was initiated, many cells became rapidly lytic, whereas others showed an irregular, indented outline, probably linked with the elimination of a large number of small cytoplasmic vesicles (Fig. 1). Correlatively, the cytoplasm cleared up. The nucleoli, in variable numbers, became quite visible. The cells were transferred to the well of a 6-well dish after about 50 days. The transfer to a flask was made 15 days later. Proliferation was rather slow. The experiment was repeated 3 times. The culture underwent 8 transfers with Ic or G1010 media, then it died. Freezing was attempted at the 8th transfer but, after thawing, the cells did not resume proliferation. Sang (1981) reported that haemocytes could be cultured only for a short time.

These results are reminiscent of the observations in vertebrates in which a medium conditioned by a line allows proliferation of another type of cell to which the first line provides growth factors. However, for L4, proliferation lasted for some time in the absence of conditioned medium.

B) Characteristics of the lines :

1) Morphology (Fig. 3) :

L1 cells looked very similar to Bm5. They showed some polymorphism and were more or less rounded, with large pseudopods. Their cytoplasm was coarsely granulous. Their morphology was very close to that of the granulocytes of *Bombyx* (Nittono, 1960) and of other lepidopterans (Saxena, 1992).

Likewise, Line L2 looked like Bm36. The cells were mostly rounded with a lighter cytoplasm and a less sharp nucleus. After 5 or 6 days of culture in G1010 medium, the cytoplasm was loaded with vesicles, the large size of which gave them a spherulocyte-like aspect (Nittono, 1960 ; Saxena, 1992). Huge cells with a very large-sized nucleus, or even two nuclei, were also observed. These cells did not divide and could not be subjected to selection.

Line L3 was made up of smaller, rounded, polymorphic or very clearly bipolar cells. They were morphologically very close to the forms described in the disc lines of *Drosophila* (Currie *et al.*, 1988) or other lepidopteran species (Lynn *et al.*, 1982) but they also resembled plasmocytes (Nittono, 1960). Their bipolar form is, according to Oberlander and Lynn (1984), quite characteristic of insect lines. Six subclones, each originating from a single cell, were obtained. At first they showed differences in their morphology and in their adherence to the support. After three transfers, these differences disappeared and the initial polymorphism was re-established, suggesting that they could be due to local micro-conditions and not to a distinct tissue origin (Peel and Milner, 1989). The cell morphology is particularly sensitive to the nature of the medium. L3 was established on G101, its transfer to I10 caused considerable changes even in the size (Fig. 4) (Hink *et al.*, 1985). When reverting to the first medium, 3 transfers were enough to recover the initial morphology. Transfer to G1010 was also associated with substantial changes in the shape, but the line disappeared after 3 consecutive transfers under these conditions.

As regards L4 cells, which were conditioned by Bm5, they also showed common characters with this line (Fig. 3).

For all the various strains, addition of 20-hydroxyecdysone later led to changes of lesser importance than those caused by the transfer to a different medium. It therefore appears that the cell morphology is an unreliable parameter in the definition of a line (Hink *et al.*, 1985). This morphology is defined not only by the nature of the cells but also by the medium and environment conditions to which it is subjected (Fig. 4).

2) Growth :

Lines L1, L2 and L4 (Fig. 5), although they are morphologically distinct, showed similar growth kinetics when cultured in G1010 medium. The duplication time was 36 hours from day 2. Addition of 20-hydroxyecdysone on subculturing only had a low effect on proliferation.

As regards line L3 (Fig. 6), the growth curve was obtained with G101. Cellular multiplication was slower, the duplication time being 48 hr. from day 2. Two selected clones had identical growths. This line responded badly to G1010 (G101 medium supplemented with *Bombyx* haemolymph), with which the culture died : after 3 transfers, growth on this medium was considerably reduced. The same curve was obtained when the cells were cultured with G101 in the presence of ecdysone (10^{-6} M). This suggests that G1010 medium could contain some hormones brought by the haemolymph. However, in an earlier work, we failed to detect ecdysone in this medium (Bosquet *et al.*, 1989).

3) Other features of characterisation :

a) mRNAs analysis :

mRNAs were extracted from cells which had been exposed to 20-hydroxyecdysone for 24 hours. The controls were cultured under hormone-free conditions. For all the strains, no hybridisation, even under conditions of low stringency, was obtained with the probes corresponding to genes whose

expression in the disc is dependent on the hormone (Chareyre *et al.*, 1993). One of them encodes for a particular collagen. It was thus clear that these genes were not expressed in our lines.

b) Chitin analysis :

Disc cells treated with ecdysone produce chitin both *in vivo* (Schnal, 1972) and *in vitro*, in organotypic cultures (Nardi and Willis, 1979) or in cell cultures (Peel *et al.*, 1990). This synthesis ability can be tested by the fixation of a fluorescent lectin. Except for a few erratic fluorescent spots located in the nuclei, especially in culture L₄, and irrespective of any previous hormone treatment, no line responded positively either at the cytoplasmic level or at the pericellular level. A control was carried out with IALTNDI cells (Lynn *et al.*, 1982) kindly provided by Dr Leach. This line is derived from discs of *Trichoplusia ni*. After a 24-hour hormone treatment, all these cells were labelled with the fluorescent lectin. It was clear, therefore, that none of our strains was able to synthesise *N*-acetyl-D-glucosamine.

c) Tyrosine oxidation (Fig. 7) :

All the lines, L₁, L₂, L₃ and L₄ as well as Bm5 and Bm36, oxidised the tyrosine supplied in the presence of Dopa in small quantities. On the contrary, all the controls (PBS alone, Dopa alone or a reaction carried out in the presence of phenylthiourea) were negative. All the lines possessed therefore a tyrosinase inhibited by phenylthiourea. This is a characteristic of blood cells (Richards, 1978). Conversely, line TNDI, which is an authentic imaginal disc cell line, gave totally negative results.

d) Phagocytosis ability for inert particles (Fig. 8) :

The four lines obtained as well as Bm5 and Bm36 were all able to absorb fine charcoal particles unlike TNDI which was found totally unable to do so.

e) Adhesion on collagen :

The culture attempts, with the same media, on dishes coated with collagen I, have led to floating cells whereas they have a good adherence to normal flasks.

DISCUSSION

The main results can be summarised as follows : two lines and a temporary culture were obtained owing to the addition of companion cells or conditioned medium. The first two (L₁ and L₂) were derived from cells which in the majority were differentiated. The last line (L₃) was obtained without companion cells or their products. Other differences in the experimental modalities corresponded to various treatments undergone by tissues after collection and to various culture media (composition, supplementation).

L₁ and L₄ cell lines, driven by Bm5 as companion cells, exhibited the characters of Bm5 cells and the cells of L₂ line, driven by Bm36, some of the characters of Bm36. L₃, which was obtained without any companion cells, does not resemble the other lines. It is worth mentioning that, in all the cases, several attempts were made (age of the larvae, dissociation enzymes, nature and supplementation of the media) and that only positive tests are reported here. In other words, combination of particular conditions enabled only one type of cells to be obtained. Two points will be considered successively : first, the tissue from which the cell lines originate ; second, the nature of the effects of companion cells and the existence of factors.

A) Tissue origin of the cell lines :

It appears clearly that the 3 lines derived from cultured discs, L₁, L₂ and L₃, exhibit properties of blood cells, properties which they share with the established lines, Bm5 and Bm36 : morphology, ability to oxidise tyrosine through a phenol oxidase susceptible to phenylthiourea and ability to phagocyte inert particles. They are unable to synthesise chitin and to adhere to a collagen substrate, and they do not respond to addition of 20-hydroxyecdysone by synthesis of wing disc specific mRNAs (Chareyre *et al.*, 1993). Furthermore, protein pattern analysis (results not shown here) reveals more differences between L₁, L₂ and L₃ than between L₁ and Bm5 or L₂ and Bm36. All these protein

patterns are markedly different from those of the discs but they share many features with L₄ cells which are derived from circulating haemocytes.

These results suggest that the new lines, although they were obtained from material collected with the discs and even, in some cases, from their most distal part (L₃) were not derived from the epidermis but more likely from the haemocytes.

It should be remembered that in the late 5th instar, haemopoietic organs, which are closely attached to the disc *sensu stricto*, enter a period of intense mitotic activity and form prohaemocytes (Akai *et al.*, 1971). Our hypothesis is therefore that only these cells and not those from the wing epithelia or the peripodial membrane proliferate. The impossibility to obtain cell lines from discs collected on young larvae, in which proliferation of haemocytes is not yet induced, strengthens this hypothesis. In the case of L₃, which was obtained from the distal region of the disc, haemocytes (or prohaemocytes) carried along in the interepithelial gaps might have initiated the proliferation, although the presence of some remaining haemopoietic organs should not be ruled out.

This raises the problem of the origin of cell lines Bm5 and Bm36 obtained from culture of ovary sheath. The properties shared by all the lines obtained here suggest that they also correspond to blood cells, modified at the chromosomal level but keeping part of their differentiation (granulocyte-like for Bm5, spherulocyte-like for Bm36). This is reminiscent of the prominent abundance of haemocyte-like cells in cultures derived from ovary sheath (Oberlander and Miller, 1987). Similarly, several lines derived from *Drosophila* embryos, Kc (Echalier and Ohanessian, 1969) or S2 (Schneider, 1972) seem to have a haemocyte origin (Andres and Cherbas, 1992): under the influence of 20-hydroxyecdysone, they express the genes EIP 40 and 28/29 according to a temporal pattern identical to that of lymph glands which are homologous to *Bombyx* haemopoietic organs. It is evident that these observations raise again the problem of the actual tissue origin of the various lines obtained from embryos or ovary sheath.

B) Existence of differentiation factors :

Companion lines Bm5 and Bm36 obviously determine the specific growth of L₁ and L₂ cells through the production of factors which are transferred to the medium. These factors are species-specific, as shown by the absence of effect of SF₉ from *Spodoptera frugiperda*. Data on Bm5 cells show that this factor must be present in a sufficient amount to act. This factor is labile, as shown by the need for sustained addition of conditioned medium, it is easily adsorbable on the filtration membranes and does not resist a freezing-thawing cycle. These characteristics tend to suggest a soluble factor rather than a viral particle.

Are these factors involved in cell proliferation, in their differentiation or in the immortalisation process? Our results do not provide definite evidence. Nevertheless, we can note that the factor produced by Bm5 cells acted both on haemopoietic cells and on blood cells to give rise to L₁ and L₄ cell lines, respectively. L₁ is a permanent line whereas L₄ is a transient one. We have indicated that haemopoietic cells have already acquired the ability to proliferate at the time of disc collection: if discs were picked earlier, there was no cell multiplication in the cultures. The factor produced by companion cells might therefore act on the differentiation processes rather than on proliferation. In this connection, it should be remembered that L₃, which proliferated without the involvement of any factor, might also originate from haemopoietic (or haemolymphatic) cells, as suggested by their phagocytosis ability. Various situations were reported in vertebrates, in which, coculture of a cell type allowed the differentiation of another type. In *Bombyx*, it seems that coculture led to the differentiation of an identical cell type. These data suggest that there may exist, in insects, factors of differentiation specific for the different categories of circulating cells, and that these factors might be produced *in vitro* by cultured cells once they have been established as permanent lines.

CONCLUSION

We have obtained new cell lines from cells collected with the wing imaginal disc *sensu stricto*. These cells were closely related to already established lines (Bm5 and Bm36) and had some of the characters of haemocyte cells but none of epidermic cells. The type of line obtained was influenced

by the presence of companion cells or the addition of medium conditioned by them. According to the nomenclature proposed by Hink (1980), these lines can be denominated as follows :

L₁ : BDI Bm HOa

(Insect developmental biology, *Bombyx mori*, haemopoietic organ, driven by Bm5).

L₂ : BDI Bm HOb (... , driven by Bm36).

L₃ : BDI Bm CH (haemocytes circulating in the disc).

L₄ : is not a permanently established line.

These results did not enable us to obtain characterised epidermic cell lines. Nevertheless, they open up new prospects concerning the possible existence of differentiation factors in insect blood cells.

THE NUTRITIONAL BEHAVIOUR OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MULBERRY SILKWORM (*BOMBYX MORI*) IN RELATION TO INSEGAR (FENOXYCARB)

O.M. ASSAL¹, R. BENEDETTI², L. CAPPELLOZZA² & S. CAPPELLOZZA^{2*}

1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Menafia University, Shebin El Kom, Egypt.

2. Sezione Specializzata per la Bachicoltura (I.S.Z.A.), via dei Colli 28, 35100 Padova, Italy.

*A laboratory experiment was carried out to evaluate the effect of the insecticide Insegar (25 % fenoxycarb) on three different strains of *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). In particular, food intake and utilization during the last instar are reported. The most important effect was on the consumption index (CI), growth rate (GR), approximate digestibility (AD), while the efficiency of conversion of ingested and/or digested food (ECI and ECD) was not affected in any significant manner. The behaviour of the three different strains varied.*

Keywords : *Bombyx mori*, fenoxycarb, three-moulter, food utilization efficiency.

INTRODUCTION

The present study was carried out to investigate the effect of the insecticide Insegar (25 % fenoxycarb) on certain physiological aspects such as food consumption, growth rate and food utilization in the fifth instar larvae of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. Fenoxycarb (ethyl 2-(p-phenoxyphenoxy) ethyl carbamate) belongs to the class of Insect Growth Regulators and is a carbamate with the action of a juvenile hormone analogue. The most important effect on *B. mori* is in the fifth instar, when the larva is disturbed in metamorphosis and is not able to spin the cocoon. The effectiveness of fenoxycarb against mulberry silkworms is very high, as reported in Italy and France (Cappelozza *et al.*, 1990 ; Plantevin *et al.*, 1991).

Insegar is widely used on fruit crops from the end of the winter to the end of May. The use of the insecticide affects silkworm rearing during springtime and produces considerable economic losses. It is believed that fenoxycarb seriously threatens the survival of sericulture in Europe.

Nevertheless, the dangers the insecticide produces in the worms differ according to the various strains of *B. mori* (authors' unpublished data). Weight and sex may be variables involved in the silkworm's response to very low dosages of fenoxycarb, as in other Lepidoptera (Robertson, 1982). For this reason, three strains of different larval weight were taken in consideration, and the effects of the insecticide on growth and feeding were investigated for a better understanding of the interdependence of these variables.

MATERIALS AND METHODS

Two Italian strains of *Bombyx mori*, "Alpe" and "Treotto rosa", and an Italian polyhybrid, (BG40 × BG2) × (CC × NC), were used in this study ; the strain "Alpe" and the polyhybrid have five larval instars, while "Treotto rosa" has only four, being a three-moulter.

* To whom correspondence should be addressed.

The larvae were reared in the laboratory at 25 °C and 70-75 % RH.

The newly hatched larvae were reared till the end of the penultimate instar in the same way. At the beginning of the last instar, the larvae were kept in groups of ten, and were enclosed in plastic trays sized 20 × 14 × 4 cm which were covered with muslin cloth. *B. mori* larvae were kept in the laboratory and fed with leaves of the same variety of mulberry.

In order to study the effect of Insegar during the last instar, three trays from each strain were fed on mulberry leaves which had been treated with a water solution of Insegar (8×10^{-5} ng/litre). 80 ml of this solution were sprayed on 400 g of leaves. The theoretical ingestion per larva varied from 2.9 to 6.5×10^{-8} ng of fenoxycarb according to the different strains.

Three other trays for each strain were reared on untreated leaves. To determine the effect of the above-mentioned treatment on nutritional coefficients, a known weight of fresh leaves was introduced to larvae weighed daily. To determine the water loss, similar samples of leaves were kept in two similar trays. The faeces and uneaten leaves were removed and weighed daily, till the end of the larval stage. The weight of fresh leaves, larvae, uneaten food and faeces were divided by the number of tested larvae to obtain the different values per larva.

The correct weight of consumed leaves (CW), the efficiency of conversion of ingested food to body substance (ECI) and the efficiency of conversion of digested food to body substance (ECD) were calculated according to Waldbauer (1968). Consumption index (CI), growth rate (GR) and approximate digestibility (AD) were defined according to the equation given by Soo Hoo and Fraenkel (1966).

Previous measurements were calculated both daily and as for the whole of the last larval instar; furthermore, any fluctuations of these measurements on successive days of the larval instar were recorded. To make the measurements homogenous both in the case of treated and untreated larvae, recorded values were taken from the beginning of the last instar until the insects started to show a decrease in body weight. The calculation of the indices was interrupted before this stage only in the event of obtaining negative values which were not recorded on the graphs.

The larval mortality percentage, cocoon weight, weight of cocoon shell, of pupae and number of eggs laid were also recorded.

A statistical analysis was carried out according to Andrewartha (1970).

RESULTS

The low dosage treatments with fenoxycarb did not completely impede cocoon spinning, but caused a delay in the mounting of treated larvae. This delay was on average of three, four and five days for "Treotto rosa", polyhybrid and "Alpe", respectively.

On a weight basis, any increase in the food consumed was recorded for those larvae fed on Insegar-treated leaves rather than untreated, and this increase proved significant in both the "Alpe" and "Treotto rosa" strains (Table I). The consumption index (CI) is a measure of the rate at which food enters the digestive system and is probably a better measurement for behavioural response to food; therefore the data represented in the same table show that the CI measurements for untreated leaves for the three races under investigation were significantly higher than the same values for the treated leaves.

Relative growth rate (GR) showed a remarkable decline in larvae fed on treated leaves, especially in "Alpe" and "Treotto rosa" strains, in which the decline was significant. The efficiency of their conversion of ingested and/or digested food to body substance (ECI) and (ECD), respectively, is an all-over indicator for the larvae's ability to utilize ingested or digested food for growth.

As shown in Table I, it may be generally concluded that the treated leaves had no significant effect on either ECI or ECD values. Absorption efficiency, defined as approximate digestibility (AD),

Table I. Mean values $\pm$ SE of different measurements on the larvae fed on Insegar-treated or untreated leaves.

Tableau I. Valeurs moyennes $\pm$ l'écart type de différentes mesures chez les larves nourries avec des feuilles traitées ou non à l'Insegar.

	Alpe		Polyhybrid / Polyhybride		Trecotto rosa	
	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>
CW						
Mean / <i>Moyenne</i>	11.23	8.76	16.27	12.60	7.29	4.72
SE / <i>Ecart type</i>	1.15	0.77	2.59	1.23	1.09	0.67
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		3.09		2.22		3.48
P		< 0.05*		> 0.05 ^{NS}		< 0.05*
CI						
Mean / <i>Moyenne</i>	0.545	0.624	0.634	0.768	0.897	1.133
SE / <i>Ecart type</i>	0.032	0.025	0.056	0.056	0.015	0.073
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		3.39		2.93		5.49
P		< 0.05*		< 0.05*		< 0.05*
GR						
Mean / <i>Moyenne</i>	0.126	0.183	0.137	0.187	0.195	0.292
SE / <i>Ecart type</i>	0.029	0.015	0.025	0.035	0.017	0.043
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		3.38		1.99		3.62
P		< 0.05*		> 0.05 ^{NS}		< 0.05*
AD %						
Mean / <i>Moyenne</i>	50.00	60.33	45.00	51.00	58.33	65.00
SE / <i>Ecart type</i>	3.00	0.58	2.64	1.00	1.52	3.46
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		5.86		3.67		3.05
P		< 0.01**		< 0.05*		< 0.05*
ECI %						
Mean / <i>Moyenne</i>	29.00	32.00	21.67	25.00	21.67	25.00
SE / <i>Ecart type</i>	3.60	3.46	2.08	2.00	2.31	2.64
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		1.04		2.00		1.64
P		> 0.05 ^{NS}		> 0.05 ^{NS}		> 0.05 ^{NS}
ECD %						
Mean / <i>Moyenne</i>	58.00	49.33	47.67	47.67	37.33	37.33
SE / <i>Ecart type</i>	3.60	2.08	5.77	2.08	3.05	3.79
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		3.60		0.00		0.00
P		< 0.05*		> 0.05 ^{NS}		> 0.05 ^{NS}
Cocoon weight / Poids du cocon (g)						
Mean / <i>Moyenne</i>	1.84	1.37	2.07	1.76	0.89	0.75
SE / <i>Ecart type</i>	0.04	0.09	0.16	0.07	0.05	0.03
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>		6.48		3.08		4.20
P		< 0.01**		< 0.05*		< 0.05*

Continued / Suite page suivante

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

	Alpe		Polyhybrid / <i>Polyhybride</i>		Treotto rosa	
	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>	Treated <i>Traitées</i>	Untreated <i>Non traitées</i>
Pupal weight / Poids de la chrysalide (g)						
Mean / <i>Moyenne</i>	1.63	1.19	1.57	1.38	0.79	0.70
SE / <i>Ecart type</i>	0.04	0.09	0.09	0.05	0.04	0.04
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>	6.51		3.32		3.05	
P	< 0.01**		< 0.05*		< 0.05*	
Cortex weight / Poids du cortex (g)						
Mean / <i>Moyenne</i>	0.195	0.171	0.381	0.338	0.099	0.063
SE / <i>Ecart type</i>	0.002	0.010	0.015	0.013	0.016	0.004
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>	3.20		3.68		3.85	
P	< 0.05*		< 0.05*		< 0.05*	
Larval mortality / Mortalité larvaire (%)						
Mean / <i>Moyenne</i>	80.00	13.33	83.33	13.33	53.33	26.67
SE / <i>Ecart type</i>	17.32	15.28	11.55	11.55	25.17	5.77
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>	5.00		7.42		1.79	
P	< 0.01**		< 0.01**		> 0.05 ^{NS}	
Number of eggs/batch / Nombre d'oeufs par lot						
Mean / <i>Moyenne</i>	351.50		415.00		170.50	183.75
SE / <i>Ecart type</i>	79.65		101.18		98.96	66.09
Variance ratio / <i>Taux de variance</i>					0.79	
P					> 0.05 ^{NS}	

NS : Not significant / *Non significatif.** = Significant at 0.05 P / *Significatif à P 0,05.*** = Significant at 0.01 P / *Significatif à P 0,01.*

showed a clearly significant increase in digestion in those larvae fed on untreated leaves as compared to those fed on treated leaves in all three strains. The data given in the same table represent the mean weights of cocoon, cocoon shell and pupa of treated and untreated samples; in the three silkworm strains, the weight of the cocoon, cocoon shell and pupae produced from larvae fed on treated leaves were significantly higher than in the larvae fed on untreated leaves. Only "Treotto rosa" treated females were able to mate and lay eggs, while in the other two strains either the emergence of the females was too late in comparison to the emergence of males, or the adults were unable to mate, or the females were not fertile. Hence no eggs were obtained from "Alpe" and polyhybrid treated groups.

The data given in Table I show that no significant difference was obtained between the numbers of eggs produced from "Treotto rosa" larvae reared on treated or untreated leaves.

The percentage of larval mortality was recorded in the same table in all the strains under investigation. It was seen that feeding larvae with leaves treated with Insegar during the last instar caused a significant increase in larval mortality, in comparison with those which consumed untreated leaves, and this percentage was higher in polyhybrid and "Alpe" than in the "Treotto rosa" strain.

As shown in Table II, the larval weight of the various strains at the beginning of the last larval instar differed considerably. Fig. 1 illustrates the fluctuation of CW values on different successive

days within the last instar of the three strains; the weight of consumed leaf increased with some fluctuations until the fifth day of the last instar and then decreased till the end of the larval instar, the same trend was observed while studying CI and GR (Fig. 2 and 3) with one exception, that values reached their maximum on slightly different days according to the race and type of leaf treatment.

Table II. Larval weight (g) at the beginning of the last instar.

Tableau II. Poids larvaire (g) au début du dernier âge larvaire.

	Alpe	Polyhybrid <i>Polyhybride</i>	Treotto rosa
Larval weight (g)	0.610	0.752	0.249
Poids larvaire (g)			
SE / Ecart type	0.022	0.034	0.009

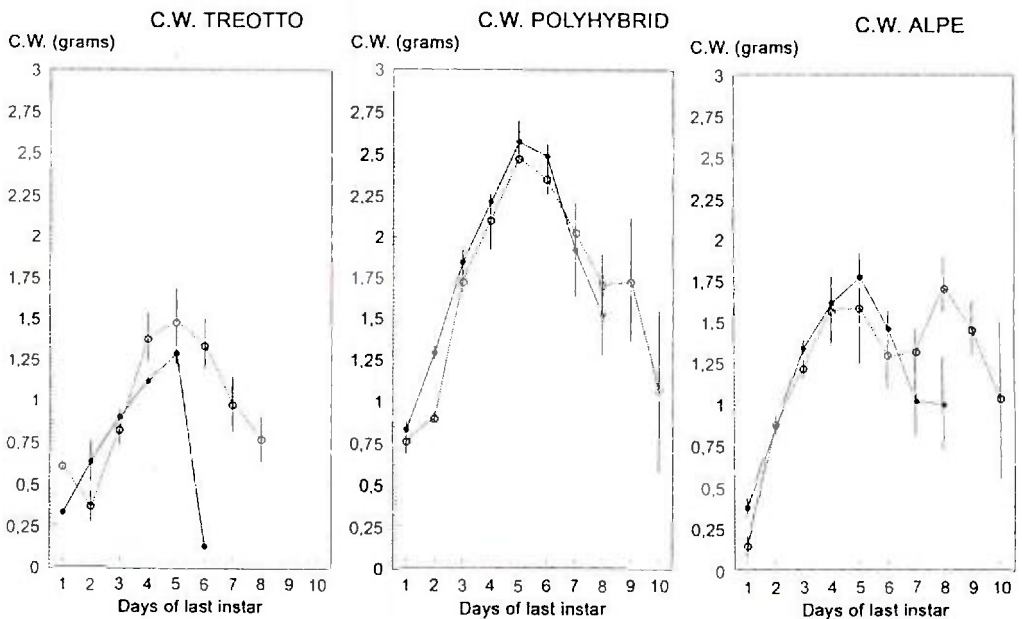


Fig. 1 : Daily fluctuations of CW during the last instar of the three strains under investigation. Note the peak on fifth days.

Fig. 1 : Fluctuations journalières du poids des feuilles consommées (CW) au cours du dernier âge larvaire chez les trois souches étudiées.

On peut observer un pic pour le 5e jour.

—●— Not treated / Non traités.
 ---○--- Treated / Traités.

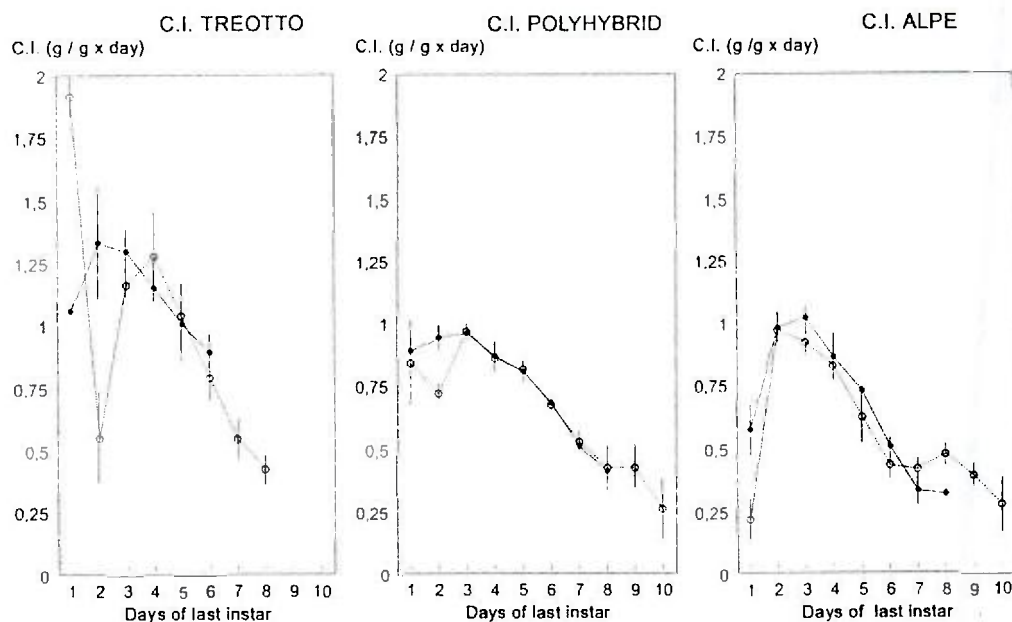


Fig. 2 : Daily fluctuations of CI during the last instar of the three strains under investigation.

Note the same trend as in Fig. 1.

Fig. 2 : Fluctuations journalières de l'indice de consommation (CI) au cours du dernier âge larvaire chez les trois souches étudiées.

On peut observer la même tendance que dans la Fig. 1.

—●— Not treated / Non traités.

- -○- - Treated / Traités.

Fig. 4 shows the daily fluctuations of AD percentage during the last instar : the values decreased from the first to the last day. Data representing ECI and ECD rates (Fig. 5 and 6) showed no significant trends.

DISCUSSION

Insecticides are known to affect the digestion and utilization of ingested food (Slama *et al.*, 1974 ; Ishaaya and Ascher, 1977 ; Radwan *et al.*, 1986 ; Radhakrishna and Delvi, 1992). Nevertheless, information concerning the effect of such chemicals on various physiological activities has not been fully explored. In the present study the highest amount of food actually consumed was observed in larvae fed on leaves treated with Insegar rather than larvae fed on untreated leaves ; this may be due to the increase of the last larval instar and the continuity of feeding, this finding being similarly confirmed by Radhakrishna and Delvi (1992). On the other hand, when the consumption was related to the weight and duration of the feeding of the larvae, consumption index (CI) values were the lowest in larvae fed on treated leaves ; the same trend was observed in different insects using different chemicals (Mulder and Gijswijt, 1973 ; Abid *et al.*, 1978).

Larvae fed on Insegar-treated leaves showed a remarkable decrease in the growth rate (GR) and approximate digestibility (AD) ; the same conclusion was recorded by Waldbauer (1968). No clear

effect of feeding larvae on Insegar-treated leaves has been observed in the present study as regards the efficiency of food conversion (ECI and ECD). This agrees with the findings of Delvi and Pandian (1972) and Muthukrishnan and Delvi (1974) and does not confirm those of Reese and Beck (1976), Dahlman (1977) and Naik (1985).

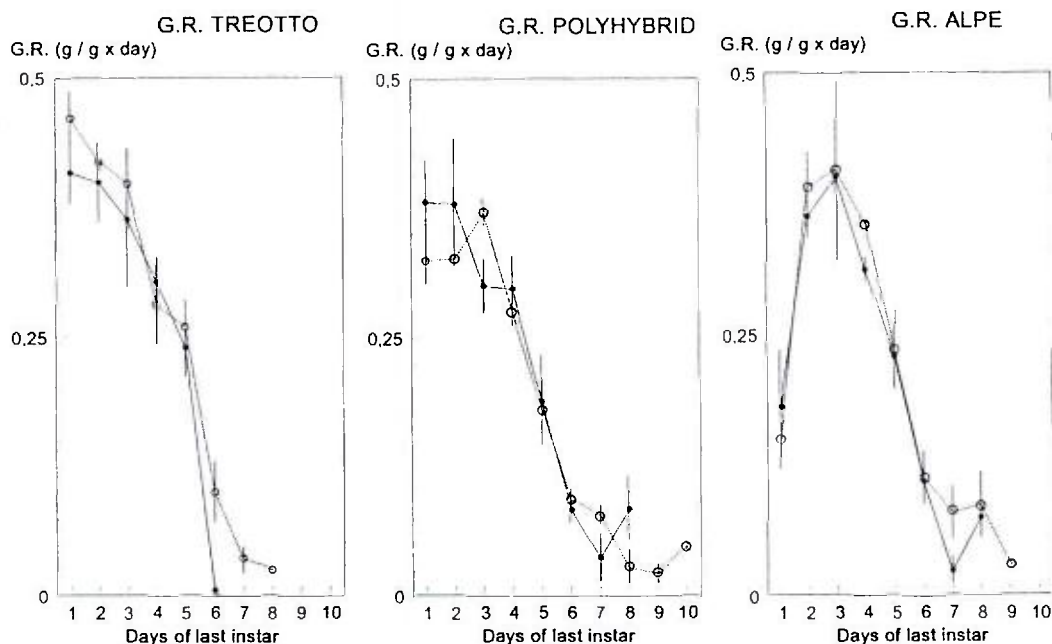


Fig. 3 : Daily fluctuations of GR during the last instar of the three strains under investigation.
Note the same trend as in Fig. 1-2.

Fig. 3 : Fluctuations journalières du taux de croissance (GR) au cours du dernier âge larvaire chez les trois souches étudiées.

On peut observer la même tendance que dans les Fig. 1 et 2.

—●— Not treated / Non traités.
---○--- Treated / Traités.

The highest weights of cocoons, pupae and cocoon shells produced by larvae fed on treated leaves during the present research may be due to the longer duration of the larval period.

The larvae of "Treotto rosa" which survived up to adult stage showed resistance to low dosages of fenoxycarb; however, Assal *et al.* (1981) found that strains resistant to insecticides of *Spodoptera littoralis* differ significantly in their food consumption and utilization, as compared to susceptible strains.

A very high percentage of larval mortality was recorded when polyhybrid and "Alpe" larvae were fed on treated leaves, while a smaller percentage was obtained with "Treotto rosa", which unlike the other two treated strains produced eggs. It may be clear from the previous results that the "Treotto rosa" strain (which is a three-moulter and has, therefore, only four larval instars) has a different behaviour towards Insegar; this finding may be helpful in adopting this strain for genetic studies in the field of sericulture.

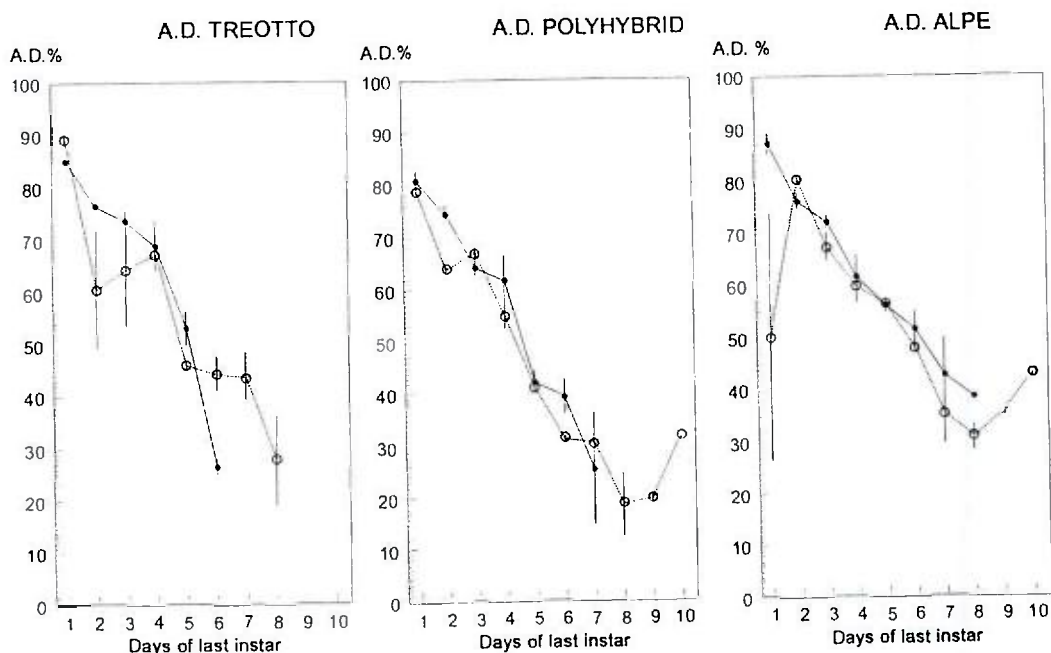


Fig. 4 Daily fluctuations of A.D.

The values decrease from first to last day.

Fig. 4 : Fluctuations journalières de la digestibilité approximative.

Les valeurs diminuent du premier au dernier jour.

—●— Not treated / Non traités.
 —○— Treated / Traités.

One hypothesis to explain the partial resistance of "Treotto rosa" to low dosages of insecticide may be the lower weight of its larvae in comparison to other strains. This lower weight is correlated to a lower food ingestion and, for this reason, less of the chemical is introduced. Nevertheless, the amount of fenoxycarb introduced per gram of body weight by the two strains and the polyhybrid is approximately the same. It has also to be taken into consideration that the effect of fenoxycarb in males of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera Tortricidae) was not proportional to their body weight; susceptibility increased drastically in heavier larvae (Robertson, 1982).

Another hypothesis may be differences in hormonal regulation between three-moulter and four-moulter silkworms. In fact, it is not well known yet how fenoxycarb acts upon the hormonal balance of *B. mori*. Further studies are required for a satisfactory explanation of the phenomenon.

The study of daily fluctuation of consumed food, consumption index, growth rate and approximate digestibility showed a slight increase in values within the last instar and then a notable decrease towards the end of the instar, this finding correlating to the conclusion obtained by Assal (1975) on the eri silkworm, *Philosamia ricini*, and Radwan *et al.* (1986) on *Spodoptera littoralis*. Gordon (1959) stated that digestion efficiency was expected to decline with growth since an animal increases its weight and volume more than the surface area of its digestive tract.

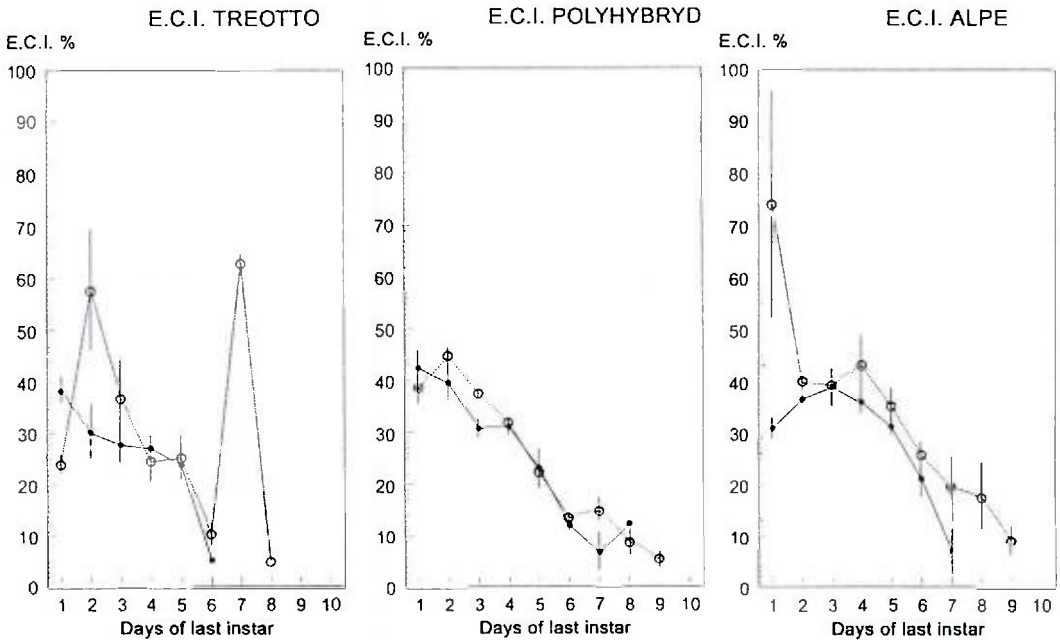


Fig. 5 : Daily fluctuations of ECI during the last instar of the three strains under investigation. No trend is noticeable.

Fig. 5 : Fluctuations journalières de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) au cours du dernier âge larvaire chez les trois souches étudiées.

On n'observe aucune tendance.

—●— Not treated / Non traités.
 ---○--- Treated / Traités.

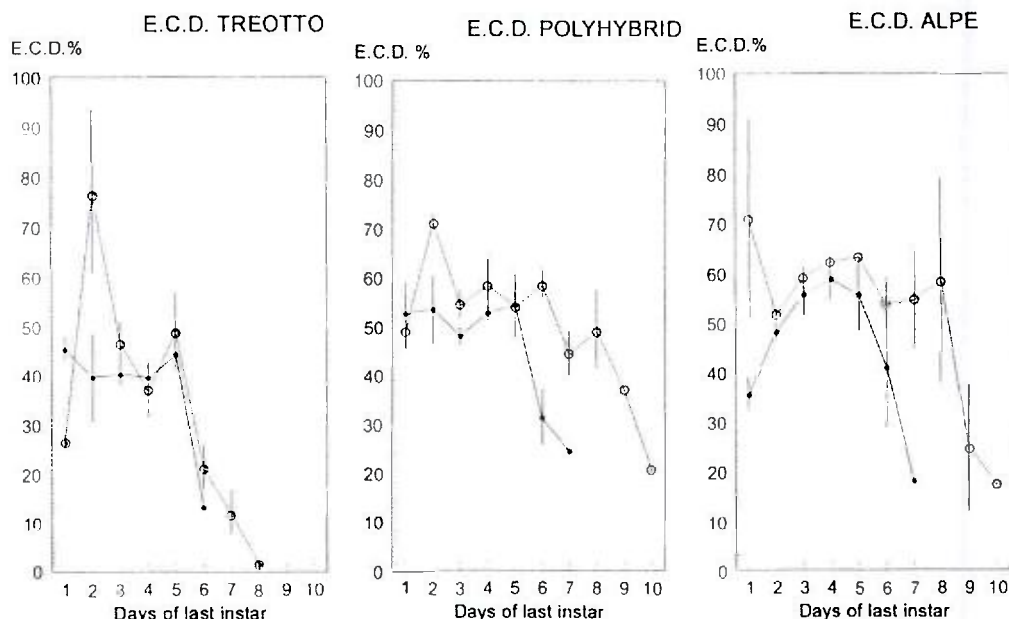


Fig. 6 : Daily fluctuations of ECD during the last instar of the three strains under investigation. No trend is noticeable.

Fig. 6 : Fluctuations journalières de l'efficacité de conversion de la nourriture digérée (ECD) au cours du dernier âge larvaire chez les trois souches étudiées.

On n'observe aucune tendance.

—●— Not treated / Non traités.
 ---○--- Treated / Traités.

The graphs show differences for certain indices already evident within the first 24 hours between treated and untreated groups, in relation to the action of fenoxycarb. This action was observed throughout the 24 hours following moulting (first day on the graphs).

REFERENCES

- ABID M.K., CHOBRIAL A., EL HAIDERI H.S., ABBAS S.A. (1978) Dimilin (TH-6040) : Effects on the spiny bollworm, *Earias insulana* Boisd. (Lepidoptera : Phalaenidae). Z. Am. Gew. Ent., 85, 321-324.
- ANDREWARTHA H.G. (1970) Introduction to the study of the animal population. 2nd Ed. 283 pp., Methuen and Co., Ltd., London.
- ASSAL O.M. (1975) Factors affecting silk production in the eri silkworm, *Philosamia cynthia ricini* Boisd. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, Ain-Shams Univ., Egypt.
- ASSAL O.M., EL-DEEB W.M., WABHA M.E. (1981) The consumption, utilization, growth and metabolism of susceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis* Boisd. Proc. 4th Pesticide Conf., (3A) 247-252, Tanta Univ., Egypt.

- CAPPELLOZZA L., MIOTTO F., MORETTO E. (1990) Effetti del fenoxycarb a basse concentrazioni sulle larve di *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). REDIA, LXXXIII(2), 517-529.
- DAHLMAN D.L. (1977) Effect of L. canavanin on the consumption and utilization of an artificial diet by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Entomologia Exp. Appl., 22, 123-131.
- DELVI M.R., PANDIAN T.J. (1972) Rates of feeding and assimilation in the grasshopper, *Poeciloceris pictus*. J. Insect Physiol., 18, 1829-1843.
- GORDON H.T. (1959) Minimal nutritional requirements of the German roach, *Blattella germanica* L. Ann. N.Y. Acad. Sci., 77, 290-351.
- ISHAAYA I., ASCHER K.R.S. (1977) Effect of diflubenzuron on growth and carbohydrate hydrolases of *Tribolium castaneum*. Phytoparasitica, 5, 149-158.
- MULDER R., GLJSWIJT M.J. (1973) The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. Pestic. Sci., 4, 737-745.
- MUTHUKRISHNAN J., DELVI M.R. (1974) Effect of ration levels on food utilization in the grasshopper, *Poeciloceris pictus* Berl. Oecologia, 16, 227-237.
- NAIK P.R. (1985) Effect of permethrin on the consumption and utilization of food and water in *Bombyx mori* and *Philosania ricini* Hutt. PhD Thesis, 120 p., Bangalore Univ., India.
- PLANTEVIN G., GRENIER S., CHAVANCY G. (1991) Effects of an insect growth regulator, fenoxycarb, on the post-embryonic development of *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). C.R. Acad. Sci., Paris, D., 313, 513-519.
- RADHAKRISHNA P.G., DELVI M.R. (1992) Effect of organophosphorus insecticides on food utilization in different races of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Sericologia, 32(1), 71-79.
- RADWAN H.S.A., ASSAL O.M., ABD-EL-GHAR G.E., RISKALLAH M.R., AHMED M.T. (1986) Some aspects of the action of diflubenzuron and trifluron on food consumption, growth rate and food utilization by *Spodoptera littoralis* larvae. J. Insect Physiol., 2(32), 103-107.
- REESE J.C., BECK S.D. (1976) Effects of allelochemicals on the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. Effect of benzoquinone, hydroquinone and duroquinone on larval growth, development and utilization of food. Ann. Ent. Soc. Am., 69, 68-72.
- ROBERTSON J.L. (1982) Effect of body weight on lethal effectiveness of a juvenile hormone analogue applied to male and female western spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) (Lepidoptera Tortricidae). Can. Entomol. 114, 1063-1068.
- SLAMA K., TOMANUK M., SORM F (1974) Insect hormones and bioanalogs. Springer, New York.
- SOO HOO C.F., FRAENKEL G. (1966) The consumption, digestion and utilization of food plants by a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). J. Insect Physiol., 12, 711-730.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Advances in Insect Physiol., 5, 229-282.

COMPORTEMENT NUTRITIONNEL DE TROIS SOUCHES DIFFÉRENTES DE VERS A SOIE DU MURIER (*BOMBYX MORI*) EN RELATION AVEC L'INSEGAR (FÉNOXYCARBE)

O.M. ASSAL¹, R. BENEDETTI², L. CAPPELLOZZA² & S. CAPPELLOZZA²

1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Menafia University, Shebin El Kom, Egypte.

2. Sezione Specializzata per la Bachicoltura (I.S.Z.A.), via dei Colli 28, 35100 Padova, Italie.

*Une expérience a été réalisée en laboratoire afin d'évaluer l'effet de l'insecticide Insegar (fénoxycarbe à 25 %) sur trois souches différentes de *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). L'ingestion et l'utilisation de la nourriture au cours du dernier âge sont plus particulièrement décrites. L'effet le plus important porte sur l'indice de consommation (CI), le taux de croissance (GR), la digestibilité approximative (AD), tandis que les efficacités de conversion de la nourriture ingérée et/ou digérée (ECI et ECD) ne sont pas affectées de manière significative. Le comportement varie selon les souches.*

INTRODUCTION

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'effet de l'insecticide Insegar (fénoxycarbe à 25 %) sur certains aspects physiologiques comme la consommation de nourriture, le taux de croissance et l'utilisation de la nourriture des larves du ver à soie *Bombyx mori* au cinquième âge. Le fénoxycarbe (carbamate d'éthyle 2-(p-phénoxyphénoxy) éthyle) appartient à la catégorie des régulateurs de croissance d'insectes et est un carbamate agissant comme un analogue d'hormone juvénile. L'effet le plus important chez *Bombyx mori* se manifeste au 5^e âge par perturbation de la métamorphose de la larve qui ne parvient pas à filer son cocon. L'efficacité du fénoxycarbe sur le ver à soie du mûrier est très élevée, comme on l'a observé en Italie et en France (Cappellozza et coll., 1990 ; Plantevin et coll., 1991).

L'Insegar est couramment utilisé sur les cultures fruitières de la fin de l'hiver à la fin du mois de mai. L'utilisation de cet insecticide affecte les élevages de vers à soie au printemps et occasionne des pertes économiques importantes. On pense que le fénoxycarbe menace gravement la survie de la sériciculture en Europe.

Néanmoins, les dommages que l'insecticide provoque chez les larves varient en fonction des races de *B. mori* (données non publiées). Le poids et le sexe constituent des variables impliquées dans la réaction du ver à soie à des doses très faibles de fénoxycarbe, comme chez d'autres lépidoptères (Robertson, 1982). C'est pourquoi trois souches présentant différents poids larvaires ont été prises en considération et les effets de l'insecticide sur la croissance et l'alimentation ont été étudiés afin de mieux comprendre l'interaction de ces variables.

MATERIELS ET METHODES

Deux souches italiennes de *Bombyx mori*, "Alpe" et "Treotto rosa", et un polyhybride italien, (BG × BG2) × (CC × NC), ont été utilisés dans cette étude ; la souche "Alpe" et le polyhybride ont cinq âges larvaires et "Treotto rosa", qui est un trimuant, seulement quatre.

Les larves ont été élevées en laboratoire à 25 °C et 70-75 % d'humidité relative.

Les larves nouvellement écloses ont été élevées jusqu'à la fin de l'avant-dernier stade de la même façon. Au début du dernier âge, les larves ont été réparties en groupe de 10 puis placées dans des claies en plastique de 20 × 14 × 4 cm recouvertes de mousseline. Les larves de *B. mori* ont été maintenues dans le laboratoire et nourries avec des feuilles d'une même variété de mûrier.

Afin d'étudier l'effet de l'Insegar au cours du dernier âge, trois claies de chacune des souches ont été nourries avec des feuilles de mûrier traitées avec une solution aqueuse d'Insegar (8×10^{-5} ng/litre). Quatre-vingt ml de cette solution ont été vaporisés sur 400 g de feuilles. L'ingestion théorique par larve varie de 2,9 à $6,5 \times 10^{-8}$ ng de fénoxycarbe suivant les souches.

Trois autres claies de chacune des souches ont été élevées sur des feuilles non traitées. Pour évaluer l'effet du traitement décrit ci-dessus sur les coefficients nutritionnels, un poids connu de feuilles fraîches a été donné aux larves quotidiennement. Pour déterminer la perte en eau, des échantillons identiques de feuilles ont été conservés dans des claies identiques. Les fèces et les feuilles non consommées ont été prélevées et pesées quotidiennement jusqu'à la fin du stade larvaire. Les poids des feuilles fraîches, des larves, de la nourriture non consommée et des fèces ont été divisés par le nombre de larves testées pour obtenir les différents valeurs par larve.

Le poids réel de feuilles consommées (CW), l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en substance corporelle (ECI) et l'efficacité de conversion de la nourriture digérée en substance corporelle (ECD) ont été calculés d'après Waldbauer (1968). L'indice de consommation (CI), le taux de croissance (GR) et la digestibilité approximative (AD) ont été définis d'après l'équation proposée par Soo Hoo et Fraenkel (1966).

Les mesures ont été calculées à la fois sur une base journalière et sur l'ensemble du dernier âge larvaire ; de plus, toutes les fluctuations éventuelles dans ces mesures à différents jours du dernier âge ont été relevées. Afin d'homogénéiser ces mesures entre les larves traitées et non traitées, on a pris en compte les valeurs relevées depuis le début du dernier âge jusqu'à observation d'une perte de poids chez les insectes. Le calcul des indices a été interrompu avant ce stade seulement lorsque des valeurs négatives ont été obtenues, valeurs qui ne sont pas représentées dans les graphiques.

Le pourcentage de mortalité larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et des chrysalides et le nombre d'oeufs pondus ont également été relevés.

Une analyse statistique a été réalisée d'après Andrewartha (1970).

RESULTATS

Les traitements au fénoxycarbe à faible dose n'arrêtent pas totalement le filage des cocons mais provoquent un retard de montée chez les larves traitées. Ce retard est d'en moyenne trois, quatre et cinq jours respectivement chez "Treotto rosa", chez le polyhybride et chez "Alpe".

Sur la base du poids, une augmentation de la nourriture consommée a été enregistrée chez toutes les larves nourries sur des feuilles traitées à l'Insegar, cette augmentation étant significative aussi bien chez "Alpe" que chez "Treotto rosa" (Tableau I). L'indice de consommation (CI) correspond à la mesure de la vitesse à laquelle la nourriture entre dans le système digestif et constitue probablement le meilleur indice de mesure de la réaction alimentaire ; les données présentées dans le même tableau montrent donc que les valeurs du CI obtenues avec les feuilles non traitées pour les trois races étudiées sont significativement plus fortes que celles obtenues avec les feuilles traitées.

Le taux de croissance relatif (GR) présente une diminution marquée chez les larves nourries avec des feuilles traitées, particulièrement chez "Alpe" et "Treotto rosa", chez lesquelles cette diminution est significative. Leurs efficacités de conversion de la nourriture ingérée et/ou digérée en substance corporelle (ECI et ECD respectivement) est un indicateur général de la capacité des larves à utiliser la nourriture ingérée ou digérée pour leur croissance.

Comme le montre le tableau I, on peut conclure que, d'une manière générale, les feuilles traitées n'ont pas d'effet significatif sur les valeurs de l'ECI et de l'ECD. L'efficacité d'absorption, définie comme étant la digestibilité approximative (AD), indique, chez les larves nourries avec des feuilles non traitées, une digestion significativement supérieure à celle des larves nourries avec des feuilles traitées, quelle que soit la souche. Les données présentées dans le même tableau présentent les poids

moyens du cocon, de la coque et de la chrysalide des échantillons traités et non traités ; chez les trois souches, le poids du cocon, le poids de la coque et le poids de la chrysalide obtenus chez les larves nourries avec des feuilles traitées sont significativement supérieurs à ceux obtenus chez les larves nourries avec des feuilles non traitées. Seules les femelles de "Treotto rosa" traitées sont capables de s'accoupler et de pondre des oeufs, tandis que, chez les deux autres souches, l'éclosion des femelles s'est produite plus tard que celle des mâles ou les adultes étaient incapables de s'accoupler ou encore les femelles n'étaient pas fécondées. Aucun oeuf n'a donc pu être obtenu chez les groupes traités de "Alpe" et du polyhybride.

Les données présentées dans le tableau I ne font apparaître aucune différence significative des nombres d'oeufs obtenus entre les larves de "Treotto rosa" élevées sur feuilles traitées et celles élevées sur feuilles non traitées.

Le pourcentage de mortalité larvaire est présenté dans le même tableau pour toutes les souches étudiées. On constate que le nourrissage des larves avec des feuilles traitées à l'Insegar au cours du dernier âge provoque une augmentation significative de la mortalité larvaire par rapport au nourrissage avec des feuilles non traitées, ce pourcentage étant plus élevé chez le polyhybride et chez "Alpe" que chez "Treotto rosa".

Comme le montre le tableau II, le poids des différentes souches au début du dernier âge larvaire varie considérablement. La figure 1 illustre la fluctuation des valeurs du CW à différents jours consécutifs du dernier âge chez les trois souches. Le poids de feuilles consommées augmente, avec quelques fluctuations, jusqu'au cinquième jour puis diminue jusqu'à la fin du dernier âge ; on observe la même tendance pour le CI et le GR (Fig. 2 et 3) avec une seule exception, le jour pic variant légèrement en fonction de la race et du type de traitement.

La figure 4 présente les fluctuations journalières du pourcentage d'AD au dernier âge larvaire : les valeurs diminuent du premier au dernier jour. Les données concernant les taux d'ECI et ECD (Fig. 5 et 6) ne font apparaître aucune tendance significative.

DISCUSSION

On sait que les insecticides affectent la digestion et l'utilisation de la nourriture ingérée (Slama et coll., 1974 ; Ishaaya et Ascher, 1977 ; Radwan et coll., 1986 ; Radhakrishna et Delvi, 1992). Néanmoins, l'effet de ces substances chimiques sur diverses activités physiologiques n'a pas été étudié de manière approfondie. Dans cette étude, la quantité maximale de nourriture effectivement consommée est obtenue chez les larves nourries de feuilles traitées à l'Insegar plutôt que chez les larves nourries avec des feuilles non traitées ; ceci pourrait être dû à l'augmentation de la durée du dernier âge larvaire et à la prolongation du nourrissage, ce résultat étant confirmé par Radhakrishna et Delvi (1992). Par ailleurs, lorsque la consommation est mise en relation avec le poids des larves et la durée de l'alimentation, les valeurs de l'indice de consommation sont minimales chez les larves nourries avec des feuilles traitées ; une tendance identique a été observée chez divers insectes avec différentes substances chimiques (Mulder et Glswijt, 1973 ; Abid et coll., 1978).

Les larves nourries avec des feuilles traitées à l'Insegar présentent une diminution marquée du taux de croissance (GR) et de la digestibilité approximative (AD) ; Waldbauer (1968) est parvenu à la même conclusion. Aucun effet distinct n'a été observé dans cette étude chez les larves nourries avec des feuilles traitées à l'Insegar pour ce qui concerne l'efficacité de conversion de la nourriture (ECI et ECD). Ces observations sont en accord avec les résultats de Delvi et Pandian (1972) et de Muthukrishnan et Delvi (1974) mais ne confirment pas ceux de Reese et Beck (1976), de Dahlman (1977) et de Naik (1985).

Les poids maximaux obtenus pour le cocon, la chrysalide et la coque issus des larves nourries avec des feuilles traitées pourraient être dus à une prolongation de la période larvaire.

Les larves de "Treotto rosa" ayant survécu jusqu'à l'âge adulte présentent une résistance au fénoxycarbe à faibles doses. Cependant, Assal et coll. (1981) ont observé que les souches résistantes aux insecticides de *Spodoptera littoralis* différaient fortement des souches sensibles dans leur consommation et leur utilisation de nourriture.

Un pourcentage de mortalité très élevé a été observé chez les larves du polyhybride et de "Alpe" nourries avec des feuilles traitées, un pourcentage de mortalité plus faible ayant été obtenu chez

"Treotto rosa" qui, à la différence des deux autres souches, a produit des oeufs. Ces résultats montrent clairement que la souche "Treotto rosa" (qui est un trimuant et n'a donc que quatre âges larvaires) présente un comportement distinct vis-à-vis de l'Insegar. Ce résultat peut permettre de conclure que cette souche pourrait être utilisée dans les études génétiques dans le domaine de la sériciculture.

Une hypothèse susceptible d'expliquer la résistance partielle de "Treotto rosa" à de faibles doses d'insecticide pourrait être le poids inférieur de ses larves par rapport à celles des autres souches. Ce poids inférieur est corrélé avec une faible ingestion de nourriture, entraînant une ingestion réduite de substance chimique. Néanmoins, la quantité de fénoxycarbe introduite par gramme de poids est approximativement la même pour les deux souches et le polyhybride. Il faut également tenir compte du fait que l'effet du phénoxycarbe chez les mâles de *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera Tortricidae) n'est pas proportionnel à leur poids ; la sensibilité augmentant de manière drastique chez les larves lourdes (Robertson, 1982).

Des différences de régulation hormonale entre les trimuants et les tétramuants pourraient également expliquer ce phénomène. En effet, on ne sait pas encore très bien si le fénoxycarbe agit sur l'équilibre hormonal de *B. mori*. Des études dans ce sens sont nécessaires pour obtenir une explication satisfaisante de ce phénomène.

L'étude des fluctuations journalières de la nourriture, de l'indice de consommation, du taux de croissance et de la digestibilité approximative fait apparaître une légère diminution des valeurs obtenues au dernier âge, avec une diminution marquée vers la fin du dernier âge, ce résultat étant en corrélation avec la conclusion obtenue par Assal (1975) chez le ver à soie cri *Philosamia ricini* et par Radwan et coll (1986) chez *Spodoptera littoralis*. Gordon (1959) a établi que l'efficacité de digestion devait nécessairement décliner puisque le poids et le volume de l'insecte augmentent plus vite que la surface de ses voies digestives.

Les graphiques présentent les différences obtenues pour certains indices, différences distinctes dès les 24 premières heures entre les groupes traités et non traités sous l'action du fénoxycarbe. Cette action a été observée pendant les 24 heures qui ont suivi la mue (premier jour sur les graphiques).

STUDY ON THE IDENTIFICATION OF REGION-SPECIFIC HETEROTIC CROSSES IN *BOMBYX MORI* L.

J.L. RAZDAN*, A.A. SIDDIQUI*, R.K. BALI* & P. MUKHERJEE**

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, 29-B/B, Gandhinagar Extension II, Jammu - 180 004, India.

*The combining ability of nine parents of *Bombyx mori* L., namely PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂, SH₆ and CC₁, were studied in the autumn season of 1991. PAM-109 showed significant general combining ability (GCA) effects in all the characters except larval duration and cocoon yield. CC₁ was found to be a good general combiner but failed to 'click' in specific combinations whereas NB₄D₂ and SF₁₉, being poor general combiners, manifested a high degree of heterosis in combinations with other parents. In general, the per se performance was correlated with combining ability effects. Highly significant specific combining ability (SCA) effects and their corresponding heterotic values were obtained in the crosses, viz. PAM-101 × NB₄D₂, PAM-109 × NB₄D₂, PAM-109 × SF₁₉. The F₁s included two parents from Pampore source, indicating these crosses may be region-specific. Among 36 F₁s, 14 heterotic crosses in relation to combining ability effects were identified under high-low (HL) group thus giving scope to produce high-yielding derivatives in advanced generations of breeding.*

Keywords : Combining ability, *Bombyx mori* L., region-specific, heterotic crosses.

INTRODUCTION

Japan was the first country to have given the concept of producing high quality silk (bivoltine) from commercial hybrids. In fact, hybrid breeding in Japan first began in 1911 by demonstrating the superiority of F₁ hybrids over the pure parents (Yokoyama, 1957). Extensive research followed thereafter and the works of Osawa *et al.* (1944), Katsumata (1948) and Harada (1949) in the field are well known.

In Jammu and Kashmir, production of high quality bivoltine silk from hybrid seed has been in vogue for decades. The commercial hybrid seed till 1983 used to be imported from Japan and South Korea. As a policy decision, the State stopped the import of hybrid seed from Japan in 1984 and National Silkworm Seed Project (NSSP) of Central Silk Board at Dehradun stepped in to fill up the gap. Ever since, NSSP, Dehradun, has been supplying the bulk of commercial hybrid seeds to the State involving five parents, viz. YS₃, NB₄D₂, SF₁₉, JD₆ and SH₆. Only one commercial rearing is conducted in J & K State during March-April in Jammu region, May-June in Kashmir Valley and temperate regions of Jammu region. Efforts are on to maximise the cocoon crop production by introducing one more commercial crop during autumn. The performance of the commercial hybrids to a great extent varies with the change in climatic conditions. Thus, there is an urgent need to identify

* Present address : Regional Sericultural Research Station, 29-B/B, Gandhinagar, Extension II, Jammu - 180 004, India.

** Present address : Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Central Silk Board, Thally Road, Hosur - 635 109, India.

highly adaptable and productive crosses suitable for the State. Consequently, CSR&TI, Pampore, has undertaken an extensive breeding programme to meet the challenge.

The present study as a first step was undertaken (i) to study the combining ability of five Dehradun races, three evolved lines of Pampore, one evolved line from CSR&TI, Mysore, and (ii) to identify the heterotic crosses suitable for J&K State.

MATERIALS AND METHODS

Nine established bivoltine races, viz. PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂, SH₆ and CC₁ were selected on the basis of high degree of phenotypic variability. The five parents, namely YS₃, NB₄D₂, SF₁₉, JD₆, SH₆ from Dehradun source, PAM-101, PAM-109 and PAM-111 evolved lines of CSR&TI, Pampore, and CC₁ from CSR&TI, Mysore, represented diverse genetic bases. This was further confirmed through the genetic divergence analysis carried out during spring and autumn 1991.

Disease-free seed in nine parents and their 36 F₁s was raised in spring 1991 as per Griffing's (1956) method and subjected to 90 days chilling followed by hot acid treatment (HCl) for 5 min. at 46 °C (Tazima, 1978). The treated layings in the 9 parents and 36 F₁s were reared cellularly in three replications (1 replication = 1 disease-free laying) in autumn 1991. The prescribed schedule of bivoltine silkworm rearing was followed in raising cocoon crops (Krishnaswami, 1978). Data were recorded on larval weight, larval duration, cocoon yield/10,000 larvae brushed by weight, cocoon weight, shell weight and filament length. Combining ability of the parents and their 36 F₁s was done as per Griffing's (1956) method. Heterotic crosses were identified as per the methods propounded by Arunachalam and Bandyopadhyay (1979).

RESULTS AND DISCUSSION

The choice of the parents for hybridisation is one of the critical and most difficult tasks for a breeder. It is a common experience that certain combinations 'rick' to produce many superior off-springs, whereas others, involving equally promising parents, produce disappointing progenies (Allard, 1960). The ability of the parents to combine well depends on complex interactions among genes, which may not be adjudged by mere *per se* performance and adaptation of the parents. Griffing (1956) has described methods of evaluating combining ability of parents and crosses of diallel progenies.

Choice of the parents :

In the present study, the analysis of variance for general and specific combining ability for larval and cocoon characters (Table I) revealed high to highly significant differences among the hybrids establishing the existence of genotypic differences for all the characters. Mean squares of parents versus hybrids were also highly significant, indicating the presence of heterosis. The D² analysis carried out (details not presented here) confirms considerable genetic divergence among the parents. It was noteworthy that Pampore lines formed distinct and separate clusters and as such it was indicative that crosses of Pampore lines with other parents will generate considerable heterosis.

The GCA variances for larval duration, shell weight and filament length were higher than SCA variances, indicating predominance of additive gene action. Sarkar *et al.* (1991) also reported higher contribution of additive gene action in the silkworm through diallel analysis. However, the variance ratio $\hat{\sigma}_a^2/\hat{\sigma}_s^2$ indicated control of overdominance for all the characters except cocoon yield, which is in conformity with Dutta and Prasad (1988).

Performance of the parents, crosses, combining ability effects and heterosis are depicted in Tables II and III. It is evident from the tables that the choice of the parents on the basis of the *per se* performance was almost identical to that obtained through GCA effects for most of the traits. Thus, the *per se* performance of the parents is correlated with the GCA effects of the parents in *Bombyx mori* L.

Combining ability effects :

The GCA estimates of the nine parents and their means are presented in Table III. Perusal of the table reveals that PAM-109 has significant GCA effects in the desired direction in larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length whereas CC₁ has positive significant GCA effects in cocoon yield/10,000 larvae brushed by weight, shell weight and filament length. PAM-101 and JD₆ has negative GCA effects for larval duration, indicating a shorter larval period compared to other parents. Comparison of the performances of the individual lines is also of considerable interest. The results from Table III indicate that PAM-101, PAM-109 and PAM-111 have significantly greater estimates of combining ability in the larval duration, shell weight and filament length than line NB₄D₂ which is taken as the standard. It may be mentioned here that line NB₄D₂ is the most popular line throughout India for the preparation of commercial F₁ seed, therefore to consider the line as a standard parent for comparison is essential. Additionally, the line CC₁ has significantly greater combining ability estimates in respect of cocoon yield/10,000 larvae brushed, larval duration, shell weight and filament length than the standard line NB₄D₂. Amongst the Pampore lines, PAM-109 has significantly higher combining ability estimates than PAM-101 and PAM-111.

Table I. Analysis of variance for GCA and SCA for six characters in *Bombyx mori* L.

Tableau I. Analyse de variance de la capacité combinatoire générale (GCA) et de la capacité combinatoire spécifique (SCA) pour six caractères de *Bombyx mori* L.

Character	Mean sum of squares				
	Hybrids	Parents vs hybrids	GCA	SCA	$\hat{\sigma}_g^2/\hat{\sigma}_s^2$
Caractère	Somme moyenne des carrés				
	Hybrids	Parents/hybrides	GCA	SCA	$\hat{\sigma}_g^2/\hat{\sigma}_s^2$
Larval weight (g) <i>Poids larvaire</i>	38.999**	1027.824**	18.689**	18.989**	0.002
Larval duration (days) <i>Durée larvaire (jours)</i>	2.385**	8.460**	1.470**	0.554**	0.189
Cocoon yield (kg) ⁽¹⁾ <i>Rendement en cocons (kg)⁽¹⁾</i>	8.359**	82.157**	1.686*	3.382**	-0.065
Cocoon weight (g) <i>Poids du cocon (g)</i>	0.042*	0.795**	0.015*	0.019**	0.032
Shell weight (g) <i>Poids de la coque</i>	0.002*	0.033**	0.002**	0.001**	0.250
Filament length (m) <i>Longueur de la bave (m)</i>	45737.127**	204750.417**	19275.797**	15556.853**	0.028

(1) Per 10,000 larvae by weight / *En poids pour 10 000 larves.*

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

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

Means of F₁s, their specific combining ability estimates, and heterosis percentage values are presented in Table II. Larval duration is one such important character to be studied from the economic

Table II. Mean, specific combining effects (SCA) and heterosis percentage (in parentheses) of 36 F₁s of *Bombyx mori* L.Tableau II. Moyennes, effets combinatoires spécifiques (SCA) et pourcentage d'hétérosis (entre parenthèses) de 36 F₁ de *Bombyx mori* L.

Sl no.	Cross	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10,000 larvae brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
N° de série	Croisement	Poids larvaire (g)	Durée larvaire (jours)	Rendement en cocons/10 000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur de la bave (m)
1	PAM-101 × PAM-109	42.33 ^a , -2.758 ^{b*} (+09.48**)	22.08, -0.438 (-05.71**)	16.18, +1.804 (+44.55**)	1.70, -0.037 (+14.32**)	0.34, -0.001 (+07.90)	812, -149.52** (-21.76**)
2	PAM-101 × PAM-111	41.00, -0.152 (+10.81**)	21.85, -0.811** (-06.65**)	14.74, +0.165 (+24.10**)	1.76, +0.067 (+15.13**)	0.34, +0.010 (03.59)	1042, +108.64* (-0.35)
3	PAM-101 × YS ₃	46.67, +2.970* (+23.89**)	22.06, -0.789** (-07.12**)	13.85, -0.765 (+04.09)	1.79, +0.083 (+02.92)	0.33, +0.013 (+0.70)	864, +12.36 (+04.64)
4	PAM-101 × SF ₁₉	40.33, -0.333 (+03.42)	23.84, +0.505 (+0.41)	12.93, -0.489 (+4.18)	1.61, -0.016 (+8.42)	0.31, -0.004 (+03.91)	865, -54.82 (+4.68)
5	PAM-101 × JD ₆	43.00, +0.697 (+16.22**)	22.06, -0.388 (-7.10**)	15.80, +2.022 (+25.40**)	1.70, +0.062 (+15.05**)	0.32, +0.020 (+13.61*)	1020, +122.15** (+31.30**)
6	PAM-101 × NB ₄ D ₂	47.00, +4.606** (+27.03**)	21.81, -1.178** (-8.14**)	14.62, +0.474 (+12.87*)	1.85, +0.153* (+19.02**)	0.35, +0.036* (+23.29**)	1036, +118.82* (+32.88**)
7	PAM-101 × SH ₆	47.00, +4.061** (+23.68**)	22.44, -0.223 (-4.46**)	15.09, +0.870 (+12.50*)	1.69, +0.033 (+10.11*)	0.33, +0.15 (+8.74)	924, +37.21 (+10.12)
8	PAM-101 × CC ₁	44.67, +2.364* (+15.52**)	22.48, -0.113 (-5.32**)	16.06, +1.385 (+26.12**)	1.80, +0.091 (+10.47*)	0.35, +0.018 (+3.94)	1146, +159.27** (+22.61**)
9	PAM-109 × PAM-111	48.33, +4.818** (+25.00**)	23.06, -0.084 (-1.45)	16.52, +2.169 (+39.09**)	1.93, +0.167* (+26.22*)	0.37, +0.008 (+14.36**)	1025, +9.18 (+2.04)
10	PAM-109 × YS ₃	50.00, +3.939** (+29.31**)	24.76, +1.428** (+5.75**)	15.14, +0.296 (+4.82)	1.67, -0.106 (-3.94)	0.34, -0.022 (0.00)	910, -23.42 (-12.39**)
11	PAM-109 × SF ₁₉	45.33, +2.303 (+16.24**)	22.72, -1.105** (-2.96*)	16.82, +3.182 (+24.71**)	1.95, +0.251 (+31.02**)	0.39, +0.038 (+23.39**)	1025, +23.73 (-1.25)

Continued / Suite page suivante

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

Sl no.	Cross	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10,000 larvae brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
N° de série	Croisement	Poids larvaire (g)	Durée larvaire (jours)	Rendement en cocons/10 000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur de la bave (m)
12	PAM-109 × JD ₆	45.33, +0.667 (+17.24**)	22.70, -0.241 (-3.07*)	14.10, +0.096 (+11.90)	1.86, +0.160* (+25.45**)	0.37, +0.037* (+18.73**)	994, +13.70 (+4.30)
13	PAM-109 × NB ₄ D ₂	48.67, +3.909** (+25.86**)	23.50, +0.019 (+0.37)	12.86, -1.508 (+0.69)	1.77, +0.210** (+27.17**)	0.39, +0.037* (+22.75**)	1161, +162.03** (+11.78*)
14	PAM-109 × SH ₆	49.33, +4.030** (+27.59**)	23.02, -0.130 (-1.68)	15.51, +1.067 (+15.66*)	1.89, +0.170* (+23.59**)	0.38, +0.026 (+20.63**)	962, -6.91 (-7.35)
15	PAM-109 × CC ₁	45.33, +0.667 (+17.24**)	22.82, -0.266 (-2.55*)	15.18, +0.279 (+19.21**)	1.81, -0.174* (-1.43)	0.37, -0.001 (+9.36)	1050, -18.18 (+1.12)
16	PAM-111 × YS ₃	39.67, -2.455* (+5.31)	23.85, +0.371 (+1.89)	14.54, -0.056 (+0.67)	1.74, +0.008 (+0.38)	0.36, +0.014 (+6.97)	992, +87.06 (5.16)
17	PAM-111 × SF ₁₉	41.67, +2.576* (+6.84**)	24.36, +0.416 (+4.19**)	14.34, +0.946 (+6.30)	1.73, +0.070 (+12.95**)	0.38, +0.40 (+16.51**)	996, -7.79 (-7.68)
18	PAM-111 × JD ₆	43.00, +2.273 (+20.56**)	23.37, +0.296 (+0.13)	14.46, +0.704 (+14.76*)	1.68, +0.020 (+9.90*)	0.33, +0.005 (+1.64)	1083, +131.18** (+3.54)
19	PAM-111 × NB ₄ D ₂	42.33, +1.515 (+18.69**)	23.50, -0.120 (+0.41)	14.05, -0.070 (+8.49)	1.71, -0.013 (+10.28**)	0.32, -0.020 (+2.05)	855, -115.49* (-18.25**)
20	PAM-111 × SH ₆	42.67, -1.303 (+12.28**)	23.80, +0.504 (+1.68)	14.73, +0.535 (+9.84)	1.75, +0.062 (+14.02**)	0.35, +0.008 (+7.69)	920, -21.42 (-12.10**)
21	PAM-111 × CC ₁	38.67, -2.061 (0.00)	22.42, -0.802** (-4.19**)	14.27, -0.390 (+12.01)	1.75, +0.009 (+7.35)	0.35, -0.011 (+2.96)	732, -308.03** (-30.00**)
22	YS ₃ × SF ₁₉	39.33, -2.303 (+0.85)	24.12, -0.039 (+0.15)	14.54, +0.660 (+0.69)	1.64, -0.027 (+5.48)	0.33, +0.001 (+1.00)	793, -97.73 (+12.40*)
23	YS ₃ × JD ₆	47.33, +4.061** (+25.66**)	23.13, -0.135 (-3.17**)	14.92, +0.681 (+3.35)	1.71, +0.043 (-1.25)	0.32, +0.004 (+3.78)	754, -115.42* (-16.74**)

Continued / *Suite page suivante*

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

Sl no.	Cross	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10,000 larvae brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
N° de série	Croisement	Poids larvaire (g)	Durée larvaire (jours)	Rendement en cocons/10 000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur de la bave (m)
24	YS ₃ × NB ₄ D ₂	45.67, +2.303 (+21.24**)	23.50, -0.311 (-2.42*)	14.30, -0.307 (+0.95)	1.62, -0.113 (+6.82)	0.31, -0.022 (+7.86)	830, -58.09 (+8.35)
25	YS ₃ × SH ₆	47.33, +3.424** (+24.56**)	22.47, -1.007** (-4.31**)	13.82, -0.865 (+4.32)	1.72, +0.025 (+0.96)	0.34, 0.005 (+1.49)	771, -87.03 (-14.83**)
26	YS ₃ × CC ₁	45.33, +2.061 (+17.24**)	23.06, -0.350 (-2.97*)	16.78, +1.634 (+16.18**)	1.85, +0.097 (+6.53)	0.36, +0.012 (+7.39)	1074, +116.03 (+14.91**)
27	SF ₁₉ × JD ₆	34.00, -6.242** (-12.82**)	24.13, +0.372 (+1.02)	6.88, -6.160 (+48.97**)	1.40, -0.197** (-5.94)	0.26, -0.054** (-13.41*)	1045, +107.39* (+26.49**)
28	SF ₁₉ × NB ₄ D ₂	43.33, +3.000* (+11.11**)	25.09, +0.793** (+3.92**)	14.29, +0.876 (+5.91)	1.75, +0.093 (+12.85**)	0.36, +0.035* (+20.67**)	1123, +166.73** (+35.93**)
29	SF ₁₉ × SH ₆	40.33, -0.545 (+3.42)	24.80, +0.824** (+5.58**)	12.86, -0.619 (4.65)	1.50, -0.120 (+2.17)	0.30, -0.029 (+1.64)	886, -41.21 (+5.52)
30	SF ₁₉ × CC ₁	41.00, +0.758 (+5.13)	23.14, -0.762** (-2.64*)	13.93, -0.013 (+3.26)	1.84, +0.157* (+12.35**)	0.38, +0.029 (+10.84*)	1196, +170.18** (+28.03**)
31	JD ₆ × NB ₄ D ₂	45.67, +3.697** (+30.48**)	22.13, -1.280** (-7.35**)	15.86, +2.084 (+22.41**)	1.63, -0.032 (+5.01)	0.31, +0.002 (+10.59)	872, -62.97 (+11.89)
32	JD ₆ × SH ₆	44.00, +1.485 (+15.79**)	22.07, -1.016** (-6.65**)	15.27, +1.429 (13.90*)	1.75, +0.125 (+14.02**)	0.34, +0.022 (+10.71)	1030, +128.09** (+22.75**)
33	JD ₆ × CC ₁	49.00, +7.121** (+26.72**)	23.37, +0.353 (-1.68)	15.06, +0.754 (+18.24**)	1.75, +0.072 (+7.35)	0.33, -0.002 (+2.27)	962, -42.52 (+2.96)
34	NB ₄ D ₂ × SH ₆	43.00, +0.394 (+13.16**)	24.10, +0.478 (+2.63*)	13.65, -0.566 (+1.76)	1.66, -0.018 (+7.37)	0.33, +0.005 (+9.29)	925, +0.76 (+10.16)
35	NB ₄ D ₂ × CC ₁	41.33, -0.636 (+6.90*)	24.09, +0.532 (+1.35)	16.07, +1.393 (+24.04**)	1.80, +0.057 (+10.10*)	0.35, +0.008 (+4.43)	1160, +136.82** (+24.14**)

Continued / *Suite page suivante*

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

Sl no.	Cross	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10,000 larvae brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
<i>N° de série</i>	<i>Croisement</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>	<i>Rendement en cocons/10 000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>
36	SH ₆ × CC ₁	38.67, -3.848** (0.00)	23.42, +0.193 (-0.27)	14.64, -0.105 (+9.17)	1.65, -0.052 (+1.12)	0.35, +0.002 (+3.94)	1097 ^a , +103.21 ^b (+17.37**)
	SE (S _{ij})	1.191	0.274	0.809	0.069	0.016	47.12
	SE (S _{ij} - S _{ik})	1.984	0.457	1.128	0.114	0.028	78.53
	SEDBP (Heterosis %)	0.28	1.202	0.816	0.07	0.017	47.55
	SEDBP (% d'hétérosis)						

a : Mean / *Moyenne* ; b = SCA effect / *Effet de la SCA.** Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*SE : Standard error / *Ecart type.*SEDBP : Standard error of difference over better parent / *Ecart type de la différence par rapport au parent meilleur.*

viewpoint in respect of the cost benefit ratio of a hybrid. Although there are nearly seven such F₁s which catch the eye when we peruse the results in Table II and have recorded significantly negative estimates, nevertheless, we shall restrict our concern only with those F₁s which are also showing significant estimates in the majority of the other economic characters as well. Scrutiny therefore reveals PAM-101 × NB₄D₂ is one such promising cross which has recorded significant SCA estimates in the desired direction in all the characters except cocoon yield/10,000 larvae brushed by weight.

Table III. Estimates of GCA effects and mean values of parents (in parentheses) in nine parents of *Bombyx mori* L.

Tableau III. Estimations des effets de la capacité combinatoire générale et des valeurs moyennes des parents (entre parenthèses) chez neuf parents de Bombyx mori L.

Parents	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10000 larvae brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
<i>Parents</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>	<i>Rendement en cocons/ 10000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>
PAM-101	+0.141 (37.00)	-0.648** (23.75)	-0.017 (11.19)	-0.015 (1.45)	-0.017** (0.25)	-35.01* (703.33)
PAM-109	+2.505** (38.67)	-0.158 (23.44)	-0.209 (10.91)	+0.055* (1.49)	+0.020** (0.32)	+46.78** (1038.67)
PAM-111	-1.434** (35.67)	-0.018 (23.40)	-0.039 (11.88)	+0.016 (1.53)	+0.009 (0.32)	+18.96 (1046.67)
YS ₃	+1.111** (37.67)	+0.170 (24.08)	+0.448 (14.44)	+0.022 (1.74)	+0.001 (0.34)	-63.76** (906.00)
SF ₁₉	-1.919** (39.00)	+0.662** (24.15)	-0.750* (13.49)	-0.051* (1.49)	-0.004 (0.30)	+4.75 (826.67)
JD ₆	-0.283 (35.00)	-0.228** (23.89)	-0.389 (12.60)	-0.048* (1.47)	-0.018** (0.28)	-16.87 (777.73)
NB ₄ D ₂	-0.192 (32.67)	+0.314** (24.49)	-0.021 (12.95)	+0.012 (1.55)	-0.005 (0.28)	+1.78 (779.67)
SH ₆	+0.354 (38.00)	-0.013 (23.49)	+0.050 (13.41)	-0.025 (1.53)	-0.001 (0.31)	-27.95 (839.67)
CC ₁	-0.283 (38.67)	-0.080 (23.77)	+0.511* (12.73)	+0.033 (1.63)	+0.016** (0.34)	+71.33** (934.67)
SE ($\hat{g}_i$)	0.418	0.096	0.284	0.024	0.006	16.56
SE ($\hat{g}_i - \hat{g}_j$)	0.627	0.144	0.426	0.036	0.008	24.83

SE : Standard error / *Ecart type*.

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

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

Another cross, viz. PAM-109 $\times$ SF₁₉, has recorded significant SCA estimates in the desired direction in respect of larval duration, cocoon weight and shell weight and is thus considered good. The third promising cross to be considered is PAM-109 $\times$ NB₄D₂ which has given significantly higher estimates in larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length. In ratings PAM-109 $\times$ SF₁₉ and PAM-101 $\times$ NB₄D₂ may be considered as best performers since their larval duration SCA estimates are significantly negative otherwise desirable and thus are considered exceedingly desirable for commercial utility. Although CC₁ showed significant GCA effects in cocoon yield/10,000 larvae brushed by weight, shell weight and filament length but in specific combinations such an expression is lacking in cocoon yield and shell weight, which could be attributed to the absence of non-allelic interaction under autumn conditions. In the case of filament length, it is interesting to note that CC₁ combined well with Dehradun races in general but not so with the Pampore lines, except with PAM-101. One such combination is SF₁₉ $\times$ CC₁ in which significant SCA effects in the desired direction were obtained in respect of larval duration, cocoon weight and filament length.

The popular hybrids presently exploited in J&K State are NB₄D₂ $\times$ SH₆ and YS₃ $\times$ SF₁₉. A close scrutiny of these crosses and their parents in respect of combining ability effects becomes necessary. Perusal of Table II will amply justify that none of the parents exhibited desirable general combining ability when all the characters were considered together. With regard to SCA effects it was observed that both these combinations were non-significant for all the characters. It indicates that these races deserve immediate attention for genetic improvement.

Going a little further, comparison of the SCA estimates of these promising crosses were made with those of the two popular crosses, viz. NB₄D₂ $\times$ SH₆ and YS₃ $\times$ SF₁₉, taken as controls. The differences were non-significant in respect of filament length between PAM-109 $\times$ SF₁₉ and NB₄D₂ $\times$ SH₆ and in respect of larval weight between PAM-109 $\times$ NB₄D₂ and NB₄D₂ $\times$ SH₆ (Table II). In all other characters the three promising crosses, viz. PAM-101 $\times$ NB₄D₂, PAM-109 $\times$ NB₄D₂ and PAM-109 $\times$ SF₁₉ have significantly scored over the two controls except for cocoon yield in which only PAM-109 $\times$ SF₁₉ is significantly greater.

Table IV. Classification of heterotic crosses in relation to combining ability in *Bombyx mori* L.

Tableau IV. Classification des croisements hétérotiques en fonction de la capacité combinatoire chez Bombyx mori L.

Parents	PAM-101	PAM-109	PAM-111	YS ₃	SF ₁₉	JD ₆	NB ₄ D ₂	SH ₆	CC ₁
PAM-101	L	HL	LL	HL	-	LL	LL	HL	HL
PAM-109		H	HL	HH	HL	HL	HL	HH	HH
PAM-111			H	-	LL	LL	LL	HL	-
YS ₃				H	-	HL	HL	HH	HH
SF ₁₉					L	-	LL	-	HL
JD ₆						L	LL	HL	-
NB ₄ D ₂							L	-	HL
SH ₆								H	-
CC ₁									H

H : High / Elevée.

L : Low / Faible.

Table V. Heterosis (%) and per cent gain of the three promising crosses of *Bombyx mori* L. over the commercial crosses.

Tableau V. Hétérosis (%) et pourcentage de gain chez les trois croisements prometteurs de *Bombyx mori* L. par rapport aux croisements commerciaux.

Crosses	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10000 larvac brushed by wt. (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)
Croisements	Poids larvaire (g)	Durée larvaire (jours)	Rendement en cocons/ 10000 larves levées (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur de la bave (m)
PAM-101 × NB₄D₂						
Mid / Moyen	34.93**	-09.55**	21.09**	23.14**	31.41**	39.72
Superior / Supérieur	27.03**	-08.14**	12.87*	19.02**	23.29**	32.88**
Best / Meilleur	20.51**	-06.79**	1.25	06.38	03.25	-01.02
Gain over C ₁ / Gain sur C ₁	09.30	-02.30	7.10	11.50	06.10	12.00
Gain over C ₂ / Gain sur C ₂	19.50	-02.30	0.55	12.80	06.10	30.00
PAM-109 × SF₁₉						
Mid / Moyen	16.74**	04.45**	37.90**	31.17**	26.85**	09.97*
Superior / Supérieur	16.24**	-02.96**	24.71**	31.02**	23.49**	-01.25
Best / Meilleur	16.24**	-02.91**	16.51**	12.39**	14.98**	-02.01
Gain over C ₁ / Gain sur C ₁	05.40	-05.70	23.22	17.40	18.20	10.90
Gain over C ₂ / Gain sur C ₂	15.30	-05.70	15.68	18.80	18.20	29.20
PAM-109 × NB₄D₂						
Mid / Moyen	36.45**	-01.89	7.81	29.92**	29.25**	27.70**
Superior / Supérieur	25.86**	00.36	0.69	27.17**	22.75**	11.78*
Best / Meilleur	24.79**	00.41	10.92	13.66**	14.29**	10.92*
Gain over C ₁ / Gain sur C ₁	13.20	-02.60	-05.79	18.60	18.20	25.50
Gain over C ₂ / Gain sur C ₂	23.70	-02.60	-11.55	20.10	18.20	46.20
SE ± mid / SE ± moyen	0.24	1.04	0.71	0.06	0.015	41.18
SE ± superior / SE ± supérieur	0.28	1.20	0.82	0.07	0.017	47.55
SE ± best / SE ± meilleur	0.28	1.20	0.82	0.07	0.017	47.55

C₁ : NB₄D₂ × SH₆. C₂ : YS₃ × SF₁₉. SE : Standard error / Ecart type.

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

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

Heterosis in relation to combining ability :

Based on the method developed by Arunachalam and Bandyopadhyay (1979), the GCA effects of the nine parents in respect of the characters studied (Table III) were classified as high (H) and low (L). Similarly, the SCA effects of the 36 F₁s (Table II) were also classified to detect whether a cross has H or L SCA over all the characters. Heterosis was considered only if the hybrid mean exceeded that of the superior parent. Based on the probability concept advocated by Arunachalam and Bandyopadhyay (1979) the overall heterotic crosses were identified and classified under HH, HL and

LL groups and are presented in Table IV. Out of the total F_1 s, 27 F_1 s were found heterotic based on the total score of all the characters taken together and the proportions of heterotic crosses in HH were 18.52 %, i.e. 5/27, in HL 51.85 %, i.e. 14/27, and in LL 29.63 %, i.e. 8/27. Therefore the results imply that the chances for a heterotic cross was high in the HL group.

Under the HL group, 14 such heterotic crosses were recorded which also included PAM-109 $\times$ NB₄D₂ and PAM-109 $\times$ SF₁₉. It was also worth noting that out of the 14 heterotic crosses nine combinations were such which involved Pampore races as one of the parents, further confirming that Pampore races combined well especially with Dehradun races. These 14 F_1 s thus provide the desirable heterogenous genetic base from which high yielding derivatives in advanced generations are possible to be isolated with an appropriate breeding programme.

Thus, from the combining ability analysis as also the analysis of heterotic crosses, three combinations, namely PAM-101 $\times$ NB₄D₂, PAM-109 $\times$ SF₁₉ and PAM-109 $\times$ NB₄D₂, emerged out as the best promising crosses. The heterosis pourcentages of these crosses vis-à-vis gain over the commercial crosses are presented in Table V. A perusal of the data in Table V reveals that all the three promising crosses have recorded appreciable gain in the characters studied over their respective mid, superior as also best parents, which could be attributed to the presence of overdominance. Further, the results reveal that the three promising crosses recorded gain in the desired direction over the popular hybrids in most of the characters studied. However, cocoon yield/10,000 larvae brushed by weight in PAM-109 $\times$ NB₄D₂ declined compared to the two popular hybrids. The reasons for such a decline may be attributed to low fecundity followed by hatchability. A higher performance of the crosses involving NB₄D₂ as one of the parents was also reported (Nahar *et al.*, 1989 ; Anonymous, 1990). Therefore, before performing crosses with NB₄D₂ and SF₁₉, which seems to be specific combiner only, SCA analysis should be adhered to.

Nevertheless, the results of the combining ability and heterosis showed that PAM-101 and PAM-109 combined well with all Dehradun races amongst them, especially NB₄D₂ and SF₁₉. Since these parents are well adapted to the conditions of J&K State, the crosses between these could be considered as region-specific for maximisation of bivoltine cocoon crop. Large-scale field trials of the three crosses, PAM-101 $\times$ NB₄D₂, PAM-109 $\times$ SF₁₉ and PAM-109 $\times$ NB₄D₂, selected from this study have been undertaken.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Shri S. Rai, Statistician, CSR&TI, Pampore, who has helped in the compilation and computation of the entire data.

REFERENCES

- ALLARD R.W. (1960) Principle of plant breeding. John Wiley and Sons, Inc. New York.
 ANONYMOUS (1990) Silkworm crop improvement. Annual Report, 1990-91, CSR&TI, Mysore, India, pp. 17-18.
 ARUNACHALAM V., BANDYOPADHYAY A. (1979) Are "multiple cross-multiple pollen hybrids" an answer for productive populations in *Brassica campestris* var. 'brown sarson' ? Theor. Appl. Genet., 54, 203-207.
 DUTTA R.K., PRASAD G.D. (1988) Combining ability among multivoltine $\times$ bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids. Sericologia, 28(1), 21-29.
 GRIFFING B. (1956) Concepts of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci., 9, 463-493.
 HARADA C. (1949) On the hybrid effect of economical characters in the silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 18.
 Katsumata K. (1948) On the study of hybrid vigour in the silkworm. Fuji-San, 1.
 KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSB, Bangalore.

- NAHAR K.U., DHURI A.V., DUMBRE R.B. (1989) Performance of some hybrids of mulberry silkworm, *Bombyx mori*, in Konkan. Indian J. Seric., 28(2), 145-149.
- OSAWA K., HARADA C. (1944) Studies on the F₁ hybrid of the silkworm 111. On the effect of heterosis. Bull. Sericult. Exp. Sta., 12.
- SARKAR A., DAS N.K., DAS B.C. (1991) A diallel cross analysis of the cocoon weight in the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 31(2), 301-306.
- TAZIMA Y. (1978) The silkworm : An important laboratory tool. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.
- YOKOYAMA T. (1957) On the application of heterosis in Japanese sericulture. Cytologia, suppl.

IDENTIFICATION DE CROISEMENTS HÉTÉROTIQUES GEOGRAPHIQUEMENT DÉFINIS CHEZ *BOMBYX MORI* L.

J.L. RAZDAN*, A.A. SIDDIQUI*, R.K. BALI* & P. MUKHERJEE**

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, 29-B/B, Gandhinagar Extension II, Jammu - 180 004, Inde.

*La capacité combinatoire de neuf parents de **Bombyx mori** L. (PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂, SH₆ et CC₁) a été étudiée en automne 1991. PAM-109 présente des effets significatifs de capacité combinatoire générale (GCA) pour tous les caractères, sauf la durée larvaire et le rendement en cocons. CC₁ donne de bonnes combinaisons générales mais ne permet pas d'obtenir de combinaisons spécifiques tandis que NB₄D₂ et SF₁₉, qui donnent des combinaisons générales médiocres, présentent un degré élevé d'hétérosis dans les combinaisons avec d'autres parents. En général, la performance per se est corrélée avec les effets de la capacité combinatoire. On a obtenu des effets fortement significatifs pour la capacité combinatoire spécifique (SCA) et les valeurs hétérotiques correspondantes chez les croisements PAM-101 × NB₄D₂, PAM-109 × NB₄D₂, PAM-109 × SF₁₉. Les F₁ comprennent deux parents issus de Pampore, ce qui indique que ces croisements pourraient être spécifiques de la région. Sur 36 F₁, 14 croisements hétérotiques considérés du point de vue des effets de la capacité combinatoire ont été classés dans le groupe élevé-faible (HL), ce qui donne un aperçu général qui permet d'envisager de produire des descendants performants aux générations ultérieures de sélection.*

INTRODUCTION

Le Japon a été le premier pays à introduire le concept de la production de soie de qualité supérieure (bivoltine) à partir d'hybrides commerciaux. En effet, la sélection des hybrides au Japon a débuté en 1911, avec la mise en évidence de la supériorité des hybrides F₁ par rapport aux parents purs (Yokoyama, 1957). Des recherches approfondies ont suivi et les travaux de Osawa et coll. (1944), Katsuma (1948) et Harada (1949) dans ce domaine sont bien connus.

Dans le Jammu-et-Cachemire, la production de soie bivoltine de qualité supérieure à partir de graines hybrides est pratiquée depuis plusieurs décennies. Jusqu'en 1983, les graines hybrides commerciales étaient importées du Japon et de la Corée du Sud. En 1984, une mesure gouvernementale a été prise visant à cesser l'importation de graines hybrides du Japon et le National Silkworm Seed Project (NSSP) du Central Silk Board à Dehradun a été mis en place pour remplir ce rôle. Depuis, le NSSP de Dehradun fournit la majorité des graines hybrides commerciales dans la totalité de l'Etat, ces graines étant issues de cinq parents : YS₃, NB₄D₂, SF₁₉, JD₆ et SH₆. Un seul élevage commercial est effectué dans l'Etat du Jammu-et-Cachemire : en mars-avril dans la région de Jammu et en mai-juin dans la vallée du Cachemire et dans les régions tempérées de la région de Jammu. On tente actuellement d'augmenter la production de cocons en introduisant une récolte commerciale supplémentaire en automne. La performance des hybrides commerciaux varie fortement

* Adresse actuelle : Regional Sericultural Research Station, 29-B/B, Gandhinagar Extension II, Jammu - 180 004, Inde.

** Adresse actuelle : Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Central Silk Board, Thally Road, Hosur - 635 109, Inde.

en fonction des fluctuations climatiques. Il devient donc urgent d'isoler des croisements à forte capacité d'adaptation et à productivité élevée appropriés à cet Etat. C'est pourquoi le Central Silk Research and Training Institute (CSR&TI) de Pampore a mis en place un programme de sélection étendu afin de résoudre ce problème.

Cette étude a été entreprise, en premier lieu, afin d'étudier la capacité combinatoire de cinq races de Dchradun, de trois lignées isolées de Pampore et d'une lignée isolée au CSR&TI de Mysore et, en deuxième lieu, afin d'identifier des croisements hétérotiques adaptés à l'Etat de Jammu-et-Cachemire.

MATERIELS ET METHODES

Neuf races bivoltines isolées (PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂, SH₆ et CC₁) ont été sélectionnées en raison de leur degré élevé de variabilité phénotypique. Les cinq parents, YS₃, NB₄D₂, SF₁₉, JD₆ et SH₆ originaires de Dchradun, ainsi que les lignées PAM-101, PAM-109 et PAM-111 isolées au CSR&TI de Pampore et CC₁ du CSR&TI de Mysore constituent des bases génétiques diverses. Ceci a été confirmé par une analyse de la divergence génétique réalisée au printemps et à l'automne 1991.

Des graines saines de neuf parents et de leurs 36 F₁ ont été élevées au printemps 1991 d'après la méthode de Griffing (1956), placées au froid pendant 90 jours puis soumises au traitement à l'acide chaud (HCl) pendant 5 minutes à 46 °C (Tazima, 1978). Les pontes traitées des 9 parents et des 36 F₁ ont été élevées en cellules de 3 réplicats (1 réplicat = 1 ponte saine) à l'automne 1991. On a suivi le planning recommandé pour l'élevage des vers à soie bivoltins lors de la récolte des cocons (Krishnaswami, 1978). Les données relevées portent sur le poids larvaire, la durée larvaire, le rendement en cocons (poids) pour 10 000 larves levées, le poids d'un cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave. La capacité combinatoire des parents et de leurs 36 F₁ a été déterminée d'après la méthode de Griffing (1956). Les croisements hétérotiques ont été identifiés selon les méthodes proposées par Arunachalam et Bandyopadhyay (1979).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le choix des parents destinés à l'hybridation est l'une des tâches les plus critiques de la sélection. Il est notoire que certaines combinaisons permettent de produire de nombreuses descendances supérieures tandis que d'autres, utilisant des parents tout aussi prometteurs, donnent des descendances décevantes (Allard, 1960). La capacité des parents à se combiner dépend d'interactions complexes entre les gènes et ne peut être identifiée par la seule performance *per se* et par l'adaptation des parents. Griffing (1956) a décrit des méthodes pour évaluer la capacité combinatoire des parents et des croisements des descendances dialléliques.

Choix des parents :

Dans cette étude, l'analyse de variance de la capacité combinatoire générale et spécifique pour les caractères de la larve et du cocon (Tableau I) révèle des différences fortes à fortement significatives entre les hybrides, démontrant l'existence de différences génotypiques pour tous les caractères. Les carrés moyens des parents par rapport aux hybrides sont également fortement significatifs, ce qui indique la présence d'une hétérosis. L'analyse D² réalisée (détails non présentés ici) confirme l'existence d'une divergence génétique importante entre les parents. Il est intéressant de noter que les lignées Pampore forment des groupes séparés et distincts, ce qui indique que les croisements des lignées Pampore avec d'autres parents génèrent une hétérosis importante.

Les variances de la GCA pour la durée larvaire, le poids de la coque et la longueur de la bave sont supérieures aux variances de la SCA, ce qui indique que l'action des gènes additifs est prédominante. Sarkar et coll. (1991) ont également observé une contribution supérieure de l'action des gènes additifs chez le ver à soie par analyse diallélique. Cependant, le rapport de variance $\frac{\sigma_g^2}{\sigma_s^2}$ indique que la superdominance gouverne tous les caractères, à l'exception du rendement en cocons, ce qui confirme les observations de Dutta et Prasad (1988).

La performance des parents et des croisements, les effets de la capacité combinatoire et l'hétérosis sont décrits dans les tableaux II et III. A la lecture de ces tableaux, il apparaît clairement que le choix des parents sur la base de la performance *per se* est pratiquement identique à celui défini par l'étude des effets GCA pour la plupart des caractères. La performance *per se* des parents est donc corrélée avec les effets GCA des parents chez *Bombyx mori* L.

Effets de la capacité combinatoire :

Les estimations de la GCA des neuf parents et de leurs moyennes sont présentées dans le tableau III. La lecture de ce tableau révèle que PAM-109 donne des effets GCA significatifs dans la direction voulue pour ce qui concerne le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave tandis que CC₁ présente des effets GCA positifs et significatifs pour le rendement en cocons, le poids de la coque et la longueur de la bave. PAM-101 et JD₆ donnent des effets GCA négatifs pour la durée larvaire, indiquant une réduction de la durée larvaire par rapport aux autres parents. La comparaison des performances des lignées individuelles s'avère également tout à fait intéressante. Les résultats présentés dans le tableau III indiquent que PAM-101, PAM-109 et PAM-111 donnent une capacité combinatoire estimée nettement supérieure pour la durée larvaire, le poids de la coque et la longueur de la bave à celle obtenue pour la lignée NB₄D₂, prise comme standard. Il faut souligner ici que la lignée NB₄D₂ est la lignée la plus couramment utilisée en Inde pour la préparation de graines commerciales F₁ et qu'il est donc essentiel de considérer cette lignée comme parent standard pour établir les comparaisons. De plus, la lignée CC₁ donne une capacité combinatoire estimée nettement supérieure pour ce qui concerne le rendement en cocons pour 10 000 larves levées, la durée larvaire, le poids de la coque et la longueur de la bave par rapport à la lignée standard NB₄D₂. Chez les lignées Pampore, PAM-109 donne une capacité combinatoire estimée nettement supérieure à celles de PAM-101 et PAM-111.

Les moyennes des F₁, leur capacité combinatoire spécifique estimée et les pourcentages d'hétérosis sont présentés dans le tableau II. La durée larvaire constitue un caractère important pour l'étude du rapport coût-rendement d'un hybride. Bien que la lecture du tableau II montre que près de sept F₁ donnent des estimations négatives significatives, nous nous en tiendrons à l'étude des F₁ présentant des estimations significatives dans la plupart des autres caractères économiques. L'examen des résultats révèle que PAM-101 × NB₄D₂ constitue l'un de ces croisements prometteurs avec des estimations SCA significatives dans la direction voulue pour tous les caractères, à l'exception du rendement en cocons pour 10 000 larves. Un autre croisement, PAM-109 × SF₁₉, donne des estimations SCA significatives dans la direction voulue pour ce qui concerne la durée larvaire, le poids du cocon et le poids de la coque et est donc considéré comme prometteur. Le troisième croisement prometteur est PAM-109 × NB₄D₂ qui donne des estimations nettement supérieures pour le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave. Si l'on établit un classement, on peut considérer PAM-109 × SF₁₉ et PAM-101 × NB₄D₂ comme les croisements les plus appropriés pour une exploitation commerciale, les estimations SCA obtenues pour leur durée larvaire étant par ailleurs fortement négatives. Bien que CC₁ présente des effets GCA significatifs pour le rendement en cocons (poids) pour 10 000 larves levées, le poids de la coque et la longueur de la bave, cette expression fait défaut dans les combinaisons spécifiques pour le rendement en cocons et le poids de la coque ; ceci pourrait être attribué à une absence d'interaction non allélique en automne. Pour ce qui concerne la longueur de la bave, il est intéressant de noter que CC₁ se combine facilement avec les races Dehradun en général mais pas avec les lignées Pampore, à l'exception de PAM-101. L'une de ces combinaisons est SF₁₉ × CC₁ chez laquelle des effets SCA significatifs dans la direction voulue ont été obtenus pour ce qui concerne la durée larvaire, le poids du cocon et la longueur de la bave.

Les hybrides les plus couramment utilisés actuellement dans l'Etat de Jammu-et-Cachemire sont NB₄D₂ × SH₆ et YS₃ × SF₁₉. Il est donc nécessaire de se livrer à un examen minutieux des effets de la capacité combinatoire chez ces croisements et chez leurs parents. La lecture du tableau II montre clairement qu'aucun de ces parents ne présente la capacité combinatoire générale recherchée si l'on considère l'ensemble des caractères. Pour ce qui concerne les effets SCA, les deux combinaisons sont

non significatives pour tous les caractères, ce qui indique que ces races doivent en priorité être soumises à une amélioration génétique.

De plus, on a établi une comparaison entre les estimations SCA obtenues pour ces croisements prometteurs et celles des deux croisements couramment utilisés $NB_4D_2 \times SG_6$ et $YS_3 \times SF_{19}$ considérés comme témoins. Les différences sont non significatives pour ce qui concerne la longueur de la bave entre $PAM-109 \times SF_{19}$ et $NB_4D_2 \times SH_6$ et pour ce qui concerne le poids larvaire entre $PAM-109 \times NB_4D_2$ et $NB_4D_2 \times SH_6$ (Tableau II). Pour tous les autres caractères des trois croisements prometteurs, $PAM-101 \times NB_4D_2$ et $PAM-109 \times SF_{19}$ donnent des résultats significativement supérieurs à ceux obtenus pour les deux témoins, sauf pour le rendement en cocons pour lequel seul $PAM-109 \times SF_{19}$ est nettement supérieur.

L'hétérosis en fonction de la capacité combinatoire :

A partir de la méthode élaborée par Arunachalam et Bandyopadhyay (1979), les neuf parents ont été classés en fonction des effets GCA pour les caractères étudiés, soit élevé (H) et faible (L) (Tableau III). De même, les effets SCA des 36 F_1 (Tableau II) ont été soumis à un classement afin de déterminer si un croisement avait une SCA élevée ou faible pour tous les caractères. L'hétérosis a été prise en considération seulement si la moyenne obtenue pour un hybride dépassait celle du parent supérieur. Sur la base du concept de probabilité proposé par Arunachalam et Bandyopadhyay (1979), les croisements hétérotiques ont été identifiés et répartis dans les groupes HH, HL et LL (Tableau IV). Les données obtenues pour tous les caractères pris dans leur ensemble révèlent que vingt-sept des F_1 étudiées présentent une hétérosis et que la proportion de croisements hétérotiques est de 18,52 %, soit 5/27, chez le groupe HH, de 51,85 %, soit 14/27, chez le groupe HL et de 29,63 %, soit 8/27, chez le groupe LL. Ces résultats impliquent donc que la probabilité d'un croisement hétérotique est élevée pour le groupe HL.

Quatorze croisements hétérotiques ont été identifiés chez le groupe HL, dont $PAM-109 \times NB_4D_2$ et $PAM-109 \times SF_{19}$. Il est également intéressant de noter que, sur les 14 croisements hétérotiques, neuf combinaisons ont un parent de race Pampore, ce qui confirme que les races Pampore donnent de bonnes combinaisons, particulièrement avec les races Dehradun. Ces 14 F_1 constituent donc une base génétique hétérogène pouvant permettre d'isoler des races performantes aux générations suivantes si l'on dispose d'un programme de sélection approprié.

L'analyse de la capacité combinatoire et des croisements hétérotiques révèle que les trois croisements les plus prometteurs sont $PAM-101 \times NB_4D_2$, $PAM-109 \times SF_{19}$ et $PAM-109 \times NB_4D_2$. Les pourcentages d'hétérosis de ces croisements pour ce qui concerne le gain par rapport aux croisements commerciaux sont présentés dans le tableau V. La lecture des données de ce tableau révèle que ces trois croisements prometteurs permettent d'obtenir un gain substantiel pour tous les caractères étudiés par rapport à leurs parents moyens et meilleurs respectifs, ce qui indique la présence d'une superdominance. De plus, ces résultats révèlent que les trois croisements prometteurs donnent une augmentation dans la direction voulue par rapport aux hybrides communément utilisés pour la plupart des caractères étudiés. Cependant, le rendement en cocons (poids) pour 10 000 larves levées chez $PAM-109 \times NB_4D_2$ diminue par rapport à celui des deux hybrides témoins. Cette diminution pourrait être causée par une faible fécondité entraînant un taux d'éclosion médiocre. La performance supérieure des croisements utilisant NB_4D_2 comme l'un des parents a déjà été observée (Nahar et coll., 1989 ; Anonyme, 1990). Il est donc nécessaire de procéder à une analyse SCA avant d'effectuer des croisements entre NB_4D_2 et SF_{19} , ce dernier semblant avoir une capacité combinatoire purement spécifique.

Néanmoins, les résultats obtenus pour la capacité combinatoire et l'hétérosis montrent que $PAM-101$ et $PAM-109$ se combinent bien avec toutes les races Dehradun, particulièrement NB_4D_2 et SF_{19} . Etant donné que ces parents sont bien adaptés aux conditions de l'Etat du Jammu-et-Cachemire, les croisements entre ces races pourraient être considérés comme spécifiques de cette région afin de maximiser la récolte de cocons bivoltins. Des tests à grande échelle des performances des trois croisements sélectionnés dans cette étude ($PAM-101 \times NB_4D_2$, $PAM-109 \times SF_{19}$ et $PAM-109 \times NB_4D_2$) ont été réalisés sur le terrain.

EFFECT OF DIFFERENT DISINFECTANTS ON THE PREVENTION OF NUCLEAR POLYHEDROSIS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

B.J. SARMA*, M.V. SAMSON**, M. BALAVENKATASUBBAIAH & R.K. DATTA

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

Five disinfectants, viz., 2 % formalin, 5 % bleaching powder, 2 % asiphor, 2 % steridol and 2 % aldepol, were tested to prevent the contamination of the nuclear polyhedrosis of silkworms and compared with two controls, viz., 1) tray with NPV contamination but without disinfection and 2) tray without NPV contamination or disinfection. All the disinfectants were found to be effective to prevent the contamination of the nuclear polyhedrosis with no adverse effect on larval and cocoon characters. When comparison was made between different disinfectants, formalin was found to be more effective followed by bleaching powder, asiphor, steridol and aldepol.

Keywords : *Bombyx mori* L., disinfectant, prevention, nuclear polyhedrosis.

INTRODUCTION

In spite of strict adherence to rearing techniques, it is difficult to obtain desirable cocoon yield if diseases affect the silkworm, *Bombyx mori* L. These diseases are caused by different types of pathogens, viz., viruses, fungi, bacteria and protozoa. Among viral diseases of silkworms, the nuclear polyhedrosis is very common, which accounts for considerable damage to cocoon production. In silkworm rearing, different methods for protecting worms from diseases are followed (Krishnaswami *et al.*, 1973). These methods include disinfecting the rearing house and appliances before rearing and during silkworm rearing, since larvae are more susceptible to diseases, disinfection of the larval body surface and rearing bed by some chemicals should be done right after each moult.

Several authors have tested different disinfectants, viz., phenolic compounds (Hegna, 1977), sodium hypochlorite and formalin (Vail *et al.*, 1968) and formalin (Ignoffo and Garcia, 1968) against several pathogens including viruses. Formalin has been used in silkworm rearing for disinfection or sterilization of the rearing room and appliances prior to brushing because it is bactericidal and sporicidal and is especially useful as a gaseous sterilizing agent (Hoffman, 1971). But the process suffers from disadvantages because residual traces of formaldehyde have an irritant effect on the nasal mucosa and a lachrymatory effect on the eyes of human beings (Finch, 1958). Further, rearing-cum-dwelling houses of most of the Indian sericulturists are not suitable for formalin disinfection. Keeping this in view, a few disinfectants were tested to find out an alternative disinfectant which is suitable to farmers' condition without creating any irritation or other health hazards compared to formalin.

* Assistant Director of Sericulture, Andhra Pradesh, India.

**Address for correspondence : Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Carmelram P.O., Bangalore - 560 035, India.

Table I. Effect of different disinfectants on the prevention of nuclear polyhedrosis and other diseases of the silkworm.

Tableau I. Effet de différents désinfectants sur la prévention de la polyédrose nucléaire et d'autres maladies du ver à soie.

Sl no.	Disinfectant	Season	ERR %	Incidence of diseases (%)		
				Nuclear polyhedrosis		Others
N° de série	Désinfectant	Saison	Taux effectif d'élevage	Incidence des maladies (%)		
				Polyédrose nucléaire		Autres
1.	2 % formalin <i>Formol à 2 %</i>	W	61.000 (51.367)	27.000	(31.288)	12.000
		S	54.000 (47.305)	30.000	(33.184)	16.000
		R	75.340 (60.259)	20.000	(26.532)	4.660
		Mean / Moyenne	63.446 (52.977)	25.670	(30.335)	10.889
2.	5 % bleaching powder <i>Chlorure de chaux à 5 %</i>	W	54.000 (47.314)	32.000	(34.399)	14.000
		S	51.000 (45.583)	34.000	(35.626)	15.000
		R	70.000 (56.829)	25.666	(30.404)	4.334
		Mean / Moyenne	58.333 (49.909)	30.556	(33.476)	11.111
3.	2 % asiphor <i>Asiphor à 2 %</i>	W	58.000 (49.870)	34.000	(35.431)	8.000
		S	43.000 (40.960)	38.000	(38.053)	19.000
		R	67.666 (55.361)	27.000	(31.288)	5.334
		Mean / Moyenne	56.220 (48.731)	33.000	(34.924)	10.778
4.	2 % steridol <i>Stéridol à 2 %</i>	W	50.000 (44.996)	39.000	(38.600)	11.000
		S	41.000 (39.778)	42.000	(40.377)	17.000
		R	64.000 (53.145)	30.333	(33.400)	5.667
		Mean / Moyenne	51.667 (45.973)	37.111	(37.459)	11.222
5.	2 % aldepol <i>Aldépol à 2 %</i>	W	47.000 (43.269)	39.000	(38.497)	14.000
		S	47.000 (43.269)	35.000	(36.255)	18.000
		R	60.667 (51.174)	34.000	(35.658)	5.333
		Mean / Moyenne	51.556 (45.907)	36.000	(36.803)	12.444
6.	Control 1 <i>Témoin 2</i>	W	27.000 (31.243)	59.000	(50.211)	14.000
		S	13.000 (21.072)	68.000	(55.573)	19.000
		R	42.667 (40.778)	53.000	(46.721)	4.334
		Mean / Moyenne	27.556 (31.031)	60.000	(50.835)	12.444
7.	Control 2 <i>Témoin 2</i>	W	58.000 (49.605)	22.000	(27.957)	20.000
		S	51.000 (45.573)	23.000	(28.655)	26.000
		R	72.333 (58.303)	18.000	(25.030)	9.667
		Mean / Moyenne	60.444 (51.161)	21.000	(27.214)	18.556

W : Winter. S : Summer. R : Rainy season. Control 1 : Contaminated control without disinfection. Control 2 : Control without contamination or disinfection. Figures in parentheses indicate angular transformed values.
 W : Hiver. S : Été. R : Saison pluvieuse. Témoin 1 : Témoin contaminé sans désinfection. Témoin 2 : Témoin sans contamination ni désinfection. Les chiffres entre parenthèses expriment les transformées angulaires.

Table I (continued). Analysis of variance / *Tableau I (suite). Analyse de variance.*

Source	ERR %	Incidence of diseases (%)	
		Nuclear polyhedrosis	Others
<i>Source</i>	<i>Taux effectif d'élevage</i>	<i>Incidence des maladies (%)</i>	
		<i>Polyédrose nucléaire</i>	<i>Autres</i>
1. Treatments / Traitements :			
a. Significance / Signification	NS	**	**
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	-	1.055	0.805
c. CD at 5 %	-	3.016	2.299
2. Seasons / Saisons :			
a. Significance / Signification	NS	**	**
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	-	0.691	0.527
c. CD at 5 %	-	1.974	1.505
3. Treatments $\times$ seasons interaction :			
3. Interaction traitements $\times$ saisons :			
a. Significance / Signification	**	NS	NS
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	2.195	-	-
c. CD at 5 %	6.273	-	-

** : Significant at 1 % / *Significatif au seuil de 1 %*. NS : Not significant / *Non significatif*.

MATERIALS AND METHODS

Larvae of a popular bivoltine race (NB₁₈) of silkworm were brushed and reared under ordinary condition up to the III moult. Immediately after the III moult, the larvae were counted and 100 larvae were kept in 1.5' diameter bamboo trays which were already contaminated and disinfected in the following way :

Contamination of rearing trays :

The 1.5'-diameter, round bamboo trays were smeared with cow dung and dried. Ten ml of polyhedral suspension having 7×10^4 polyhedra/ml were sprayed uniformly with a hand sprayer inside the tray which formed the rearing seat of silkworms.

Disinfection of contaminated trays :

After being contaminated with nuclear polyhedra, the trays were dried in the shade for 12 hours and then disinfected with the above-mentioned concentrations of disinfectants, viz., 2 % formalin, 5 % bleaching powder, 2 % asiphor (an alkyl phenoxy polyglycol ether iodine complex providing 1.6 % available iodine), 2 % steridol (a nonyl alkyl phenoxy ethylene oxide providing 1.66 % available iodine) and 2 % aldepol (a mixture of benzalkonium chloride 5 %, glutaraldehyde 7.5 %, formaldehyde 7.5 %, stabilizer 5 % and aqueous base 75 %), separately. For each disinfectant three trays, which served as replications, were contaminated and disinfected.

Table II. Effect of different disinfectants on larval and cocoon characters of the silkworm.

Tableau II. Effet de différents désinfectants sur les caractères de la larve et du cocon chez le ver à soie.

Sl no.	Disinfectant	Season	Weight of 10 larvae* (g)	Single cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Silk ratio (%)
N° de série	Désinfectant	Saison	Poids de 10 larves* (g)	Poids d'un cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
1.	2 % formalin <i>Formol à 2 %</i>	W	39.433	1.570	0.317	20.17
		S	29.300	1.512	0.303	20.05
		R	46.467	1.727	0.351	20.30
		Mean / Moyenne	41.733	1.603	0.324	20.17
2.	5 % bleaching powder <i>Chlorure de chaux à 5 %</i>	W	39.333	1.504	0.297	19.75
		S	39.167	1.447	0.287	19.80
		R	45.900	1.710	0.349	20.40
		Mean / Moyenne	41.467	1.554	0.311	19.98
3.	2 % asiphor <i>Asiphor à 2 %</i>	W	39.900	1.512	0.299	19.78
		S	38.000	1.481	0.297	20.00
		R	45.700	1.742	0.349	20.03
		Mean / Moyenne	40.867	1.578	0.315	19.94
4.	2 % steridol <i>Stéridol à 2 %</i>	W	39.133	1.518	0.298	19.65
		S	37.600	1.454	0.285	19.59
		R	45.400	1.741	0.351	20.17
		Mean / Moyenne	40.711	1.571	0.312	19.80
5.	2 % aldepol <i>Aldépol à 2 %</i>	W	38.533	1.485	0.297	19.98
		S	38.533	1.495	0.293	19.53
		R	44.417	1.671	0.334	20.00
		Mean / Moyenne	40.494	1.550	0.308	19.84
6.	Control 1 <i>Témoin 2</i>	W	37.533	1.505	0.297	19.70
		S	37.000	1.502	0.299	19.88
		R	45.050	1.666	0.332	19.92
		Mean / Moyenne	39.861	1.558	0.309	19.83
7.	Control 2 <i>Témoin 2</i>	W	37.600	1.497	0.298	19.91
		S	36.900	1.572	0.307	19.47
		R	45.900	1.740	0.348	20.00
		Mean / Moyenne	40.133	1.603	0.318	19.79

W : Winter. S : Summer. R : Rainy season. Control 1 : Contaminated control without disinfection. Control 2 : Control without contamination or disinfection. * Pre-spinning larvae.

W : Hiver. S : Été. R : Saison pluvieuse. Témoin 1 : Témoin contaminé sans désinfection. Témoin 2 : Témoin sans contamination ni désinfection. * Larves au stade pré-filage.

Table II (continued). Analysis of variance / Tableau II (suite). Analyse de variance.

Source	Weight of 10 larvae*	Single cocoon weight	Shell weight	Silk ratio %
Source	Poids de 10 larves*	Poids d'un cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
1. Treatments / Traitements :				
a. Significance / Signification	**	**	**	NS
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	0.330	0.006	0.003	-
c. CD at 5 %	0.942	0.018	0.008	-
2. Seasons / Saisons :				
a. Significance / Signification	**	**	**	*
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	0.216	0.004	0.002	0.092
c. CD at 5 %	0.617	0.011	0.005	0.262
3. Treatments $\times$ seasons interaction :				
3. Interaction traitements $\times$ saisons :				
a. Significance / Signification	NS	**	**	NS
b. SE $\pm$ / Ecart type $\pm$	-	0.011	0.004	-
c. CD at 5 %	-	0.031	0.014	-

** : Significant at 1 % / Significatif au seuil de 1 %. * : Significant at 5 % / Significatif au seuil de 5 %.
NS : Not significant / Non significatif.

The rearing was continued till spinning, but immediately after the IV moult once and on the 4th day of the V instar once these trays were again disinfected with the same concentrations of disinfectants. For comparison two controls were maintained. In one batch three trays were contaminated but without disinfection and in another batch three trays were smeared with cow dung without contamination or disinfection. During the larval stage, every day diseased silkworms were tested microscopically and the incidences of the nuclear polyhedrosis and other diseases were recorded. The rearing performance and other cocoon characters like larval weight, effective rate of rearing (ERR), single cocoon weight, single shell weight and silk ratios were also recorded. The experiment was repeated in three distinct seasons, viz., winter, summer and rainy, and the results are presented in Tables I and II.

RESULTS AND DISCUSSION

Season-wise and overall average of ERR and incidence of nuclear polyhedrosis and other diseases in the different disinfectant-treated batches are presented in Table I and the larval and cocoon economic characters are presented in Table II. The incidences of diseases were observed to be higher during the summer season than during the winter and rainy seasons. On an average, the lowest incidence of nuclear polyhedrosis was recorded in 2 % formalin disinfected batches (25.67 %) followed by 5 % bleaching powder (30.556 %), 2 % asiphor (33.00 %), 2 % aldepol (36.00 %) and 2 % steridol (37.111 %), whereas the contaminated control batch recorded 60.00 % and only cow dung smeared without contamination and disinfection recorded 21.00 %. The incidence of nuclear polyhedrosis was observed as a major component of the total diseases and the data do not provide

any trend on the other diseases. The highest ERR, which was highly significant when compared to other disinfectants was recorded in 2 % formalin (63.446 %) followed by 5 % bleaching powder (58.333 %), 2 % asiphor (56.220 %), 2 % steridol (51.667 %) and 2 % aldepol (51.556 %). Season-wise and overall average of larval and cocoon economic characters are presented in Table II. 41.733, 41.467, 40.867, 40.711 and 40.494 g of 10 larval weight were recorded in 2 % formalin, 5 % bleaching powder, 2 % asiphor, 2 % steridol and 2 % aldepol batches respectively, whereas in the contaminated control batch without disinfection, it was 39.861 g. The cocoon characters in the disinfectant-treated batches showed slight improvement over the contaminated control batches.

All the tested disinfectants were found to be effective to prevent the nuclear polyhedrosis and there was no adverse effect of these disinfectants on larval and cocoon characters. When comparison was made between different disinfectants, formalin was found to be more effective followed by bleaching powder and asiphor. Venkata Reddy *et al.* (1990) tested different concentrations of asiphor against all the pathogens of the silkworm and reported 2 % asiphor was found to be effective. 2 % formalin, 5 % bleaching powder and 2 % asiphor were tested as disinfectants when the *Nosema* spores, nuclear polyhedra and *B.t.* spores were exposed in rearing rooms and were found to be effective in inactivating these pathogens (Anonymous, 1989). The formalin disinfection requires a closed type of rearing house and it has an adverse effect on human health. Therefore, alternatively, 5 % bleaching powder can safely be used in sericulturists' rearing-cum-dwelling houses.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1989) Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 42.
- FINCH W.E. (1958) Disinfectants, their values and uses. Chapman and Hall, London, p. 156.
- HEGNA I.K. (1977) A comparative investigation of the bacterial and fungicidal effects of three phenolic disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 177-182.
- HOFFMAN R.K. (1971) Toxic gases, p. 226. In "Inhibition and destruction of the microbial cell". U.B. Hugo (ed.), London and New York, Academic Press.
- IGNOFFO C.M., GARCIA C. (1968) Formalin inactivation of nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 10, 430-432.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K., KUMARAJ S. (1973) Sericultural Manual. 2. Silkworm rearing. FAO Agricultural Services Bull., Rome, 15, 1-128.
- VAIL P.V., HENNEBERRY T.J., KISHABA A.N., ARAKAWA K.Y. (1968) Sodium hypochlorite and formalin antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.*, 10, 84-93.
- VENKATA REDDY S., SINGH B.D., BAIG M., SENGUPTA K., GIRIDAR K., SINGHAL B.K. (1990) Efficacy of asiphor as a disinfectant against incidence of diseases of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 29, 147-148.

EFFET DE DIFFERENTS DESINFECTANTS SUR LA PREVENTION DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

B.J. SARMA*, M.V. SAMSON**, M. BALAVENKATASUBBAIAH & R.K. DATTA

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

On a testé l'effet préventif de cinq désinfectants (formol à 2 %, chlorure de chaux à 5 %, asiphor à 2 %, stéridol à 2 % et aldepol à 2 %) sur la contamination de la polyédrose nucléaire du ver à soie par comparaison avec deux témoins (claire contaminée par le virus de la polyédrose nucléaire et non désinfectée et claire non contaminée et non désinfectée). Tous les désinfectants ont un effet de prévention sur la contamination par la polyédrose nucléaire sans affecter les caractères de la larve et du cocon. La comparaison des différents désinfectants montre que le formol est le plus efficace, devant le chlorure de chaux, l'asiphor, le stéridol et l'aldepol.

INTRODUCTION

Malgré la stricte observance des techniques d'élevage, il est difficile d'obtenir un bon rendement en cocons lorsque le ver à soie *Bombyx mori* est affecté par des maladies. Celles-ci sont provoquées par différents types d'agents pathogènes, virus, champignons, bactéries et protozoaires. Parmi les maladies virales des vers à soie, la polyédrose nucléaire est très répandue et occasionne des pertes importantes dans la production de cocons. En sériciculture, on utilise différentes méthodes de protection des vers à soie contre les maladies (Krishnaswami et coll., 1973) comprenant la désinfection du local et des appareils avant et pendant les élevages ; les larves étant plus sensibles aux maladies, la désinfection en surface de la larve elle-même et de la litière à l'aide de substances chimiques doit être réalisée après chaque mue.

Plusieurs auteurs ont testé différents désinfectants, comme les composés phénoliques (Hegna, 1977), l'hypochlorite de sodium et le formol (Vail et coll., 1968) et le formol (Ignoffo et Garcia, 1968), sur un certain nombre d'agents pathogènes, y compris les virus. Le formol est utilisé en sériciculture pour la désinfection et la stérilisation de la pièce et des appareils d'élevage avant la levée car il a un effet bactéricide et sporicide et est très pratique comme agent de stérilisation gazeux (Hoffman, 1971). Cependant, la suite de l'élevage subit les inconvénients des traces résiduelles de formaldéhyde qui ont un effet irritant sur les muqueuses nasales et un effet lacrymogène sur les yeux des humains (Finch, 1958). De plus, les pièces d'élevage qui, chez la plupart des sériculteurs indiens, se trouvent dans le local d'habitation ne sont pas toujours adaptées à la désinfection au formol. Compte tenu de ces observations, quelques désinfectants ont été testés afin de trouver une alternative adaptée aux conditions d'élevage chez les fermiers permettant d'éviter l'irritation et les divers risques liés à l'utilisation du formol.

* Directeur adjoint du Département de Sériciculture, Andhra Pradesh, Inde.

** Adresse de correspondance : Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Carmelram P.O., Bangalore - 560 035, Inde.

MATERIELS ET METHODES

Dés larves d'une race de ver à soie bivoltine communément utilisée (NB₁₈) ont été levées et élevées dans des conditions normales jusqu'à la 3^e mue. Dès leur sortie de 3^e mue, les larves ont été comptées et 100 larves ont été placées dans des claies en bambou de 1,5' de diamètre préalablement contaminées et désinfectées de la manière suivante :

Contamination des claies d'élevage :

Les claies en bambou, de 1,5' de diamètre, ont été recouvertes de bouse de vache et séchées. Dix ml de suspension polyédrique contenant 7×10^4 polyèdres/ml ont été vaporisés uniformément à l'aide d'un atomiseur mécanique à l'intérieur de la claie constituant le lieu d'élevage des vers à soie.

Désinfection des claies contaminées :

Après contamination avec des polyèdres nucléaires, les litières ont été séchées à l'ombre pendant 12 heures puis désinfectées séparément avec les désinfectants cités plus haut, soit formol à 2 %, chlorure de chaux à 5 %, asiphor à 2 % (un complexe d'éther polyglycol phénoxy alcoyle donnant 1,6 % d'iode), du stéridol à 2 % (un oxyde d'éthylène phénoxy non alcoyle donnant 1,66 % d'iode), de l'aldépol à 2 % (mélange contenant : chlorure de benzalconium à 5 %, glutaraldéhyde à 7,5 %, formaldéhyde à 7,5 %, stabilisant à 5 % et base aqueuse à 75 %). Pour chaque désinfectant, trois claies, utilisées comme témoins, ont été contaminées et désinfectées.

L'élevage a été réalisé jusqu'au filage, puis les claies ont été à nouveau désinfectées une fois dès la fin de la 4^e mue et au 4^e jour du 5^e âge avec les désinfectants aux mêmes concentrations. Deux témoins ont été réalisés pour la comparaison des données. Trois claies de l'un des lots ont été contaminées mais non désinfectées et trois claies de l'autre lot ont été recouvertes de bouse de vache non contaminée et n'ont pas été désinfectées. Au cours du stade larvaire, les vers à soie malades ont été examinés quotidiennement au microscope et l'incidence de la polyédrose nucléaire et des autres maladies a été enregistrée. La performance d'élevage et les autres caractères du cocon comme le poids larvaire, le taux effective d'élevage (ERR), le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse ont également été relevés. L'expérience a été répétée au cours de trois saisons distinctes, hiver, été et saison pluvieuse. Les résultats sont présentés dans les tableaux I et II.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les moyennes globales et en fonction des saisons pour ce qui concerne le taux effectif d'élevage et l'incidence de la polyédrose nucléaire et des autres maladies chez les lots traités avec les différents désinfectants sont présentées dans le tableau I et les caractères larvaires et économiques sont donnés dans le tableau II. L'incidence des maladies est plus forte en été qu'en hiver ou à la saison pluvieuse. De manière générale, l'incidence de la polyédrose nucléaire est minimale chez les lots traités avec du formol à 2 % (25,67 %), par rapport au chlorure de chaux à 5 % (30,556 %), à l'asiphor à 2 % (33,00 %), à l'aldépol à 2 % (36,00 %) et au stéridol à 2 % (37,111 %) tandis que le lot témoin contaminé donne une incidence de 60,00 % et le lot exposé à la bouse de vache sans contamination ni désinfection subit une incidence de 21,00 %. L'incidence de la polyédrose nucléaire est une composante majeure de l'ensemble des maladies et les données n'indiquent aucune tendance pour ce qui concerne les autres maladies. Le taux effectif d'élevage maximal est obtenu avec le formol à 2 % (63,446 %) et est significatif par rapport aux autres désinfectants : chlorure de chaux à 5 % (58,333 %), asiphor à 2 % (56,200 %), stéridol à 2 % (51,667 %) et aldépol à 2 % (51,556 %). Les moyennes des saisons et les moyennes globales pour ce qui concerne les caractères économiques de la larve et du cocon sont présentées dans le tableau II. Pour ce qui concerne le poids de 10 larves, les valeurs de 41,733 g, de 41,467 g, de 40,867 g, de 40,711 g et de 40,494 g sont obtenues pour les lots traités respectivement avec du formol à 2 %, du chlorure de chaux à 5 %, de l'asiphor à 2 %, du stéridol à 2 % et de l'aldépol à 2 %, tandis que, chez les lots témoins contaminés et non désinfectés, cette valeur est de 39,861 g. Les caractères du cocon chez les lots traités avec les désinfectants présentent une légère amélioration par rapport à ceux des lots témoins contaminés.

Tous les désinfectants testés ont un effet efficace de prévention contre la polyédrose nucléaire et n'ont aucun effet négatif sur les caractères de la larve et du cocon. La comparaison entre les différents désinfectants montre que le formol a une efficacité maximale par rapport au chlorure de chaux et à l'asiphor. Venkata Reddy et coll. (1990) ont testé l'effet de l'asiphor à différentes concentrations sur tous les agents pathogènes du ver à soie et ont observé que l'asiphor à 2 % avait un effet inhibiteur. Une expérience utilisant du formol à 2 %, du chlorure de chaux à 5 % et de l'asiphor à 2 % comme désinfectants après exposition des pièces d'élevages à des spores de *Nosema*, des polyèdres nucléaires et des spores de *B.t.* a démontré que ces désinfectants avaient un effet inactivant sur ces agents pathogènes (Anonyme, 1989). La désinfection au formol implique de disposer de pièces d'élevage fermées et a un effet nocif sur la santé humaine. Le chlorure de chaux à 5 % peut être utilisé comme désinfectant de substitution en toute sécurité par les sériciculteurs dont les locaux d'élevage sont situés dans les pièces d'habitation.

INFECTIVITY OF *SERRATIA MARCESCENS* TO THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE), AND ITS EFFECT ON CERTAIN BIOCHEMICAL CONSTITUENTS IN THE HAEMOLYMPH AND GUT

C. SAM DEVDAS*, T.O SASIDHARAN, M.V. SAMSON**, V. SIVAPRASAD & R.K. DATTA

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

Infectivity of Serratia marcescens to the bivoltine race (NB18) of the silkworm, Bombyx mori, and the effect of its infection on certain biochemical constituents in the haemolymph and gut were studied. The median lethal dose (LD₅₀) of the bacterium was determined to be approximately 70 bacteria/larva for the fifth instar larvae. Lipid and protein contents in haemolymph and gut were significantly reduced after inoculation with S. marcescens. The carbohydrate content was significantly reduced in the haemolymph, whereas in the gut it was increased after S. marcescens infection.

Keywords : *Serratia marcescens*, infectivity, biochemical constituents, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The bacterium, *Serratia marcescens*, is a small Gram-negative rod, classified as a member of the family Enterobacteriaceae. Different strains of *Serratia* are known insect pathogens and have been reported to be pathogenic to a variety of insects including the silkworms (Bracken and Butcher, 1967 ; Prinsloo, 1967 ; Steinhaus, 1969). *S. marcescens* has been reported to be infective to silkworms (Metalnikov and Chorine, 1928 ; Carbone and Fortuna, 1932). Experimentally, the silkworm is susceptible to *S. marcescens* by injection, but only rarely by ingestion. When ingested the bacterium is pathogenic in varying degrees depending upon the stage of the larvae (Steinhaus, 1959). More recently, several authors have ranked it as a potential insect pathogen capable of producing various enzymes such as chitinase and a group of extracellular proteases (Lysenko, 1976 ; Kaska, 1976). In silkworms, the bacterium is capable of producing a kind of fatal septicemia when introduced into the haemolymph and infections of this organism are occasionally reported from field. The mechanisms of pathogenicity of this organism have been studied in several insects by different workers (Podgwaite and Cosenza, 1976 ; Slatten and Larson, 1967 ; Mackauer and Albright, 1973). However, there is a paucity of information on the biochemical changes that occur during the course of *S. marcescens* infection in the silkworm. Changes in haemolymph proteins in the silkworm, *B. mori*, suffering from flacherie disease have been reported (Fuji, 1936 ; Miyoshi, 1959). Jolly *et al.* (1974) have reported changes in the amino acid composition in the fifth instar larvae of the tasar silkworm, *Antheraea*

* Inspector of Sericulture, Tamil Nadu, India.

** Address for correspondence : Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Carmelram P.O., Bangalore - 560 035, India.

mylitta, associated with diseases including flacherie. Samson (1987) studied the changes in proteins, free amino acids, carbohydrates, glycogen and free sugars in the haemolymph and gut of silkworms infected with two *Bacillus thuringiensis* strains.

In the present investigation a report on the infectivity of the bacterium to the fifth instar larvae of the NB₁₈ race of silkworm and the changes in the level of total proteins, carbohydrates and lipids in the haemolymph and gut associated with infection are presented.

Table I. Dose responses of V age silkworms to *Serratia marcescens* injection.

Tableau I. Doses-réponses des larves du cinquième âge à l'injection de *Serratia marcescens*.

Dose (No. of organisms/larva)	Number of larvae injected	Mortality due to infection (%)
<i>Dose (Nombre d'organismes/larve)</i>	<i>Nombre de larves injectées</i>	<i>Mortalité due à l'infestation (%)</i>
2	30	6.66
8	30	13.33
15	30	16.66
28	30	26.66
46	30	40.00
68	30	46.66
76	30	60.00
110	30	83.33
126	30	86.66
148	30	100.00

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the microorganism :

The bacterium was isolated from infected larvae collected from the field. Isolation of the bacterium was done by routine microbiological procedures as described by Samson (1987). Pure cultures were obtained on nutrient agar by serial dilutions and plating. The cultures were maintained at 37 °C.

Pathogenicity tests :

Silkworms of the bivoltine race, NB₁₈, were reared according to the method of Krishnaswami *et al.* (1973). The pathogenicity tests were conducted by intra-haemocoelic infection of the bacterium to fifth instar larvae. The dilutions of the bacterium were prepared in sterile physiological saline and the concentration of bacterial cells in the inoculum was determined by serial dilution and plate counting using a colony counter. The larvae immediately after the IV moult were inactivated by keeping on ice and each larva was injected 20 µl from each of the dilutions (10^1 - 10^{10}). The

10^1 dilution had a bacterial cell concentration of 7.4×10^3 /ml. Three replications of 30 larvae each were maintained for each dilution. The larvae were reared in small plastic boxes ($7'' \times 5'' \times 1.5''$).

Mortality due to *Serratia marcescens* infection was easily identified because of the deep red colour of the dead larvae. Mortality was recorded every day till spinning. The analysis of the data and calculation of the LD₅₀ was carried out by probit analysis as described by Finney (1952).

Estimation of the biochemical constituents :

For estimation of different biochemical constituents, fifth instar larvae were inoculated either orally or through intrahaemocoelic injections with the bacterium. The biochemical constituents were analysed in the gut tissue (oral inoculation) and in the haemolymph (intrahaemocoelic inoculation). The bacterial solution was smeared onto fresh mulberry leaves and fed to larvae out of IV moult before resumption of feeding. Each larva of a replication consumed a dose of approximately 2×10^6 bacterial cells. Three replications of 10 larvae each were maintained for the study. In another set of larvae the bacterium at the rate of 28 cells/larva in a volume of 10 μ l of physiological saline (approximately LD₃₀ value) was inoculated into the haemolymph using a sterile syringe with a 30-gauge sterile needle.

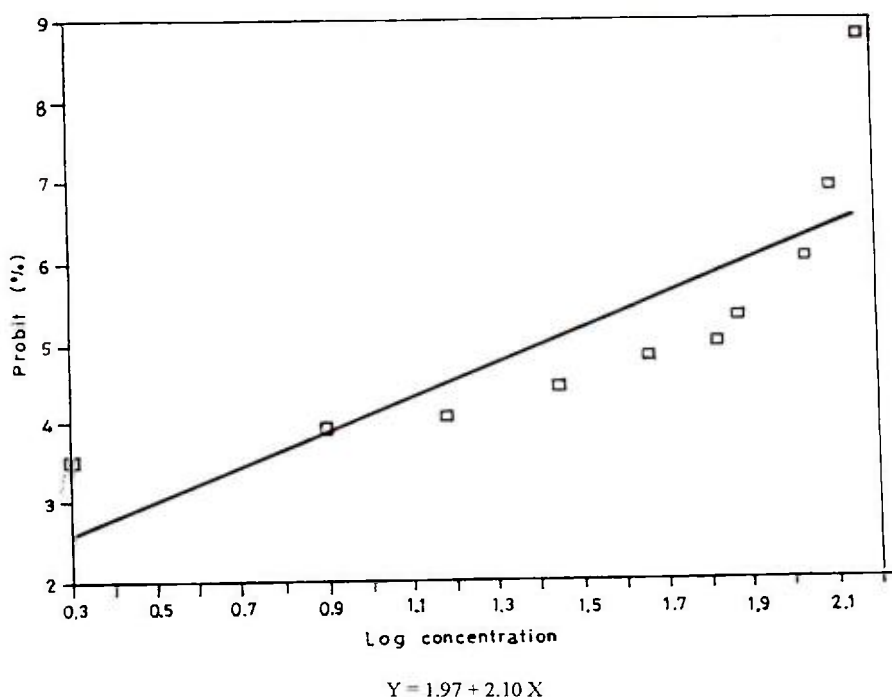


Fig. 1 : Regression curve drawn between probit percentage and log concentration.

Fig. 1 : Courbe de régression entre le pourcentage de probit et le logarithme de la concentration.

Haemolymph from the infected larvae was collected into small plastic vials containing a speck of phenylthiourea at 18, 24, 36 and 48 hrs after inoculation by cutting the caudal horn and samples from ten larvae were pooled together. Samples from control larvae which received 10 μ l of sterile physiological saline were also collected similarly. All the samples were frozen immediately till they were processed for analysis.

Table II. Changes in certain biochemical constituents in the haemolymph associated with infection of *Serratia marcescens*.

Tableau II. Modifications de certaines composantes biochimiques de l'hémolymph associées à l'infestation par *Serratia marcescens*.

Haemolymph constituents (mg/ml)	Sample	Hours after inoculation				
		0	18	24	36	48
Composantes de l'hémolymph (mg/ml)	Echantillon	Nombre d'heures après l'inoculation				
		0	18	24	36	48
Total proteins	H	31.00 ± 0.89	35.00 ± 2.20	36.16 ± 1.16	38.66 ± 1.03	53.00 ± 3.03
Protéines totales	I	-	19.83 ± 1.47**	23.16 ± 1.83**	27.16 ± 2.04**	31.16 ± 1.94**
Total carbohydrates	H	3.83 ± 0.26	4.20 ± 0.37	4.43 ± 0.25	4.75 ± 0.08	5.10 ± 0.12
Hydrates de carbone totaux	I	-	3.56 ± 0.15**	4.10 ± 0.20*	4.10 ± 0.10**	4.50 ± 0.16**
Total lipids	H	37.25 ± 0.36	39.13 ± 0.61	40.43 ± 0.27	42.24 ± 0.37	45.31 ± 0.87
Lipides totaux	I	-	36.04 ± 0.44**	32.24 ± 0.41**	29.18 ± 0.49**	25.68 ± 0.53**

Values are expressed as mean ± standard error / Les valeurs expriment la moyenne ± l'écart type.

** p < 0.01 ; * p < 0.05

H : Healthy / Sain.

I : Inoculated / Inoculé.

Table III. Changes in certain biochemical constituents in the gut tissue associated with infection of *Serratia marcescens*.Tableau III. Modifications de certaines composantes biochimiques du tissu intestinal associées à l'infestation par *Serratia marcescens*.

Gut constituents (mg/ml)	Sample	Hours after inoculation				
		0	24	48	72	96
Composantes de l'intestin (mg/ml)	Echantillon	Nombre d'heures après l'inoculation				
		0	24	48	72	96
Total proteins	H	13.41 ± 0.55	17.33 ± 1.21	20.50 ± 1.22	25.16 ± 1.60	30.50 ± 1.64
Protéines totales	I	-	15.00 ± 1.54**	15.50 ± 1.22**	12.50 ± 0.44**	9.50 ± 0.54**
Total carbohydrates	H	3.75 ± 0.22	4.43 ± 0.15	3.45 ± 0.05	3.10 ± 0.21	2.83 ± 0.15
Hydrates de carbone totaux	I	-	4.56 ± 0.19 ^{NS}	4.56 ± 0.05**	4.23 ± 0.20**	3.41 ± 0.16**
Total lipids	H	31.49 ± 0.47	32.62 ± 1.26	36.34 ± 0.52	39.50 ± 0.32	43.44 ± 0.41
Lipides totaux	I	-	30.66 ± 0.58*	29.93 ± 0.70**	28.38 ± 0.26**	25.87 ± 0.83**

Values are expressed as mean ± standard error / Les valeurs expriment la moyenne ± l'écart type.

** p < 0.01 ; * p < 0.05

NS : Not significant / Non significatif.

H : Healthy / Sain.

I : Inoculated / Inoculé.

The larvae from the orally inoculated group were dissected in physiological saline, midguts removed, pooled from 10 larvae and immediately frozen till processed for the estimation of biochemical constituents. Tissues from the larvae which received saline alone formed the controls and were processed similarly.

The lipid content in the haemolymph and gut samples were estimated gravimetrically following the method of Folch *et al.* (1951). Total carbohydrates were estimated by the phenol-sulphuric acid method described by Dubois *et al.* (1956). Total proteins were estimated by the method of Lowry *et al.* (1951).

RESULTS AND DISCUSSION

The dose responses of fifth instar silkworms to *S. marcescens* would reveal that the LD₅₀ of the bacterium is approximately 70 bacteria/larva (Table I). The computed LD₅₀ value of the bacterium is presented in Fig. 1. The extent of pathogenicity of *S. marcescens* to different lepidopteran insects has been reported to vary depending on the route of inoculation and, in *B. mori*, the intra-haemocoelic infection causes the highest mortality (Steinhaus, 1959). The LD₅₀ value calculated in the present study is observed to be on the higher side when compared to the values reported for adult boll weevils by Slatten and Larson (1967) and those reported for IV instar larvae of the gypsy moth by Podgwaite and Cosenza (1976). In the gypsy moth, these authors reported 68 % mortality in the IV instar, when infected with a dose of approximately 40 cells/larva.

With regard to the biochemical constituents, both haemolymph and gut protein contents were observed to be significantly reduced after inoculation, at all intervals of sampling (Tables II and III). The reduction percentage of protein in the haemolymph, unlike in the gut, was more immediately after inoculation of the bacterium, which improved gradually with time. Similar trends in change of haemolymph proteins were observed by Samson (1987) in silkworms infected with *Bacillus thuringiensis* and by Chadwick (1975) in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, infected with *Bacillus cereus*.

The lipid content in the haemolymph and gut were also significantly reduced after inoculation with the bacteria and the reduction percentage became more pronounced with the increase of time after inoculation. The carbohydrate content, however, showed a different trend. In the haemolymph, it was significantly reduced after inoculation with the bacterium, whereas, in the gut tissue, it was higher than in the control batches. This increase in the carbohydrate content in the gut may be due to the possible action of chitinase enzyme, reported to be secreted by the bacterium (Lysenko, 1976), on the gut wall.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Mrs Kshama Giridhar, Assistant Director, for her help in statistical analysis of the data.

REFERENCES

- BRACKEN G.K., BUTCHER G.E. (1967) Mortality of hymenopterous parasite caused by *Serratia marcescens*. J. Invertebr. Pathol., 9, 130-132.
 CARBONE D., FORTUNA E. (1932) La vaccinazione di bachi da seta. Terza nota preventiva. Bull. Ist. Sieroterap. Milan, 11, 204-210.
 CHADWICK J.S. (1975) Haemolymph changes with infection or induced immunity in insects and ticks. Invertebrate Immunity. Eds. K. Maramorosch and R.E. Shope), Academic Press, New York, pp. 241-271.
 DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350-356.
 FINNEY D.J. (1952) Probit Analysis. Cambridge University Press, England.

- FOLCH I., ASCOLI I., LEES M., MEATH J.A., BARON F.N. (1951) Preparation of lipid extracts from brain tissues. *J. Biol. Chem.*, 191, 833-841.
- FUJI O. (1936) Biochemical studies on silkworm flacherie. Report Sericult. Exp. Sta. Hyogo Prefect., 6, 1-77.
- JOLLY M.S., SEN S.K., ASHAN M.M. (1974) Disease of tasar silkworm. Tasar culture, Central Silk Board, Bombay, 1-266.
- KASKA M. (1976) The toxicity of extra-cellular proteases of the bacterium, *Serratia marcescens*, for larvae of *Lymantria dispar* : Characterization. *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 271.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K., KUMARARAJ S. (1973) Sericultural Manual 2. Silkworm rearing. FAO Agricult. Services Bull., 15, 1-128.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LYSENKOO. (1976) Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 385-386.
- MACKAUR M., ALBRIGHT L.J. (1973) The susceptibility of the pea aphid to intrahaemocoelic infection by *Serratia marcescens*. *J. Invertebr. Pathol.*, 22, 418-423.
- METALNIKOV S., CHORINE V. (1928) The infectious diseases of *Pyrausta nubilalis* Hb. Intern. Corn Borer Invest. Sci. Reports, 1, 41-69.
- MIYOSHI J. (1959) Physiological studies on the flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* L. The content of free amino acids and the refractive index of body fluid in flacherie and starved silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 28, 94-97.
- PODGEWAITE J.D., COSENZA B.J. (1976) A strain of *Serratia marcescens* pathogenic for larvae of *Lymantria dispar* : Characterization. *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 185-190.
- PODGEWAITE J.D., COSENZA B.J. (1976) A strain of *Serratia marcescens* pathogenic for larvae of *Lymantria dispar* : Infectivity and mechanisms of pathogenicity. *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 199-208.
- PRINSLOO H.E. (1967) The phospholipase and gelatinase activity of Gram-negative bacteria isolated from diseased insects and typing of strain of *Serratia marcescens*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 420-427.
- SAMSON M.V. (1987) Bacterial diseases of silkworm and their control. PhD thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- SLATTEN B.H., LARSON A.D. (1967) Mechanism of pathogenicity of *Serratia marcescens* : I. Virulence for the adult boll weevil. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 78-81.
- STEINHAUS E.A. (1959) *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. *Hilgardia*, 28, 351-380.

L'INFECTIVITE DE *SERRATIA MARCESCENS* VIS-A-VIS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE) ET SON EFFET SUR CERTAINS COMPOSANTS BIOCHIMIQUES DE L'HEMOLYMPHE ET DE L'INTESTIN

C. SAM DEVDAS*, T.O. SASIDHARAN, M.V. SAMSON**, V. SIVAPRASAD & R.K. DATTA

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

*On a étudié l'infectivité de *Serratia marcescens* sur la race bivoltine NB₁₈ du ver à soie *Bombyx mori* et l'effet de son infestation sur certains composants biochimiques de l'hémolymphe et de l'intestin. La dose létale médiane (DL₅₀) de la bactérie a été évaluée à environ 70 bactéries/larve pour les larves du cinquième âge. Les contenus en lipides et en protéines de l'hémolymphe et de l'intestin diminuent de manière significative après inoculation avec *S. marcescens*. Le contenu en hydrates de carbone diminue de manière significative dans l'hémolymphe et augmente dans l'intestin après infestation par *S. marcescens*.*

INTRODUCTION

La bactérie *Serratia marcescens* se présente sous la forme d'un petit bâtonnet Gram-négatif, classé dans la famille des entérobactériacés. Plusieurs souches de *Serratia* sont des agents pathogènes d'insectes connus et sont pathogènes pour un grand nombre d'insectes (Bracken et Butcher, 1967 ; Prinsloo, 1967 ; Steinhaus, 1969), y compris le ver à soie (Metelnikov et Chorine, 1928 ; Carbone et Fortuna, 1932). En laboratoire, le ver à soie est sensible à *S. marcescens* par injection mais rarement par ingestion. Lorsqu'elle est ingérée, le degré de pathogénicité de la bactérie varie suivant l'âge de la larve (Steinhaus, 1959). Par la suite, plusieurs auteurs ont établi que c'était un agent pathogène potentiel pour les insectes, susceptible de produire diverses enzymes comme la chitinase et un groupe de protéases extracellulaires (Lysenko, 1976 ; Kaska, 1976). Chez le ver à soie, cette bactérie peut provoquer une sorte de septicémie fatale lorsqu'elle est introduite dans l'hémolymphe et des cas d'infestation par cet organisme ont été observés dans les exploitations. Les mécanismes de la pathogénicité de cet organisme ont été étudiés chez plusieurs insectes par différents chercheurs (Podgwaite et Cosenza, 1976 ; Slatten et Larson, 1967 ; Mackauer et Albright, 1973). Cependant, on dispose de peu d'informations sur les modifications biochimiques survenant chez le ver à soie infesté par *S. marcescens*. On a décrit les modifications des protéines de l'hémolymphe chez le ver à soie *B. mori* atteint de flacherie (Fuji, 1936 ; Miyoshi, 1959). Jolly et coll. (1974) ont observé les modifications de la composition en acides aminés associées à certaines maladies, dont la flacherie, chez les larves du ver à soie tassar *Antheraea mylitta* au cinquième âge. Samson (1987) a étudié les modifications des protéines, des acides aminés libres, des hydrates de carbone et des sucres libres

* Inspecteur du Département de Sériciculture, Tamil Nadu, Inde.

** Adresse de correspondance : Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Carmelram P.O., Bangalore - 560 035, Inde.

dans l'hémolymphe et dans l'intestin de vers à soie infestés par deux souches de *Bacillus thuringiensis*.

Cette étude présente les résultats des observations réalisées sur l'infectivité de la bactérie sur les larves du cinquième âge de la race NB₁₈ du ver à soie et sur les modifications des teneurs en protéines totales, en hydrates de carbone et en lipides dans l'hémolymphe et dans l'intestin après infestation.

MATERIELS ET METHODES

Isolément du microorganisme :

La bactérie a été isolée à partir de larves infestées prélevées sur le terrain. L'isolement de la bactérie a été fait en suivant les protocoles microbiologiques habituels d'après Samson (1987). Des cultures pures ont été obtenues sur agar nutritif par dilutions en séries et par comptage des plaques. Les cultures ont été maintenues à 37 °C.

Tests de pathogénicité :

Des vers à soie de la race bivoltine NB₁₈ ont été élevés suivant la méthode de Krishnaswami et coll. (1973). Les tests de pathogénicité ont été réalisés par infestation intra-hémocélique de la bactérie sur les larves du cinquième âge. Les dilutions bactériennes ont été préparées dans une solution saline physiologique stérile et la concentration en cellules bactériennes dans l'inoculum a été déterminée par dilutions en série et numération des plaques à l'aide d'un compteur de colonies. Les larves en sortie de 4^e mue ont été immobilisées avec de la glace et chaque larve a reçu par injection 20 µl de chacune des dilutions (10^1 - 10^{10}). La dilution à 10^1 correspond à une concentration de cellules bactériennes de $7,4 \times 10^3$ /ml. Trois réplicats de 30 larves ont été traités pour chaque dilution. Les larves ont été élevées dans de petites boîtes en plastique (7" × 5" × 1,5").

La mortalité due à l'infestation par *Serratia marcescens* est facile à identifier en raison de la couleur rouge foncé des larves mortes et a été relevée quotidiennement jusqu'au filage. L'analyse des données et le calcul de la DL₅₀ ont été réalisés par analyse probit d'après Finney (1952).

Estimation des composants biochimiques :

Pour l'estimation des différents composants biochimiques, la bactérie a été inoculée sur les larves du cinquième âge soit par voie orale soit par injection intra-hémocélique. Les composants biochimiques ont été analysés dans le tissu intestinal (inoculation par voie orale) et dans l'hémolymphe (inoculation intra-hémocélique). Des feuilles de mûrier fraîches enduites de solution bactérienne ont été données aux larves en sortie de 4^e mue avant la reprise du nourrissage. Chaque larve d'un réplicat a consommé une dose d'environ 2×10^6 cellules bactériennes. Trois réplicats de 10 larves ont été traités pour cette étude. Dans chaque lot de larves, une quantité de 28 cellules/larve dans un volume de 10 µl de solution saline physiologique (valeur DL₃₀ approximative) a été inoculé dans l'hémolymphe à l'aide d'une seringue stérile comportant une aiguille stérile de calibre 30.

L'hémolymphe des larves infestées a été prélevée dans des petits flacons en plastique contenant une goutte de phénylthiourée 18, 24, 36 et 48 heures après l'inoculation en coupant l'éperon caudal et les échantillons de 10 larves ont été regroupés. Des échantillons issus de larves témoins ayant reçu 10 µl de solution saline physiologique ont été prélevés de la même manière. Tous les échantillons ont été gelés immédiatement jusqu'à ce qu'ils soient analysés.

Les larves du groupe inoculé par voie orale ont été disséquées dans une solution saline physiologique, les intestins moyens ont été prélevés, regroupés par lots de 10 et gelés immédiatement jusqu'à ce qu'ils soient soumis à l'analyse de leurs composants biochimiques. Les tissus des larves ayant reçu une solution saline non inoculée constituent les témoins et ont été conservés de la même façon.

Les contenus en lipides des échantillons d'hémolymphe et d'intestin ont été évalués selon la méthode gravimétrique de Folch et coll. (1951). Les hydrates de carbone totaux ont été évalués d'après la méthode utilisant le phénol-acide sulfurique décrite par Dubois et coll. (1956). Les protéines totales ont été évaluées selon la méthode de Lowry et coll. (1951).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les doses-réponses des larves du cinquième âge à *S. marcescens* révèlent que la DL₅₀ de la bactérie est d'environ 70 bactéries/larve (Tableau I). La valeur obtenue pour la DL₅₀ de la bactérie est présentée dans la figure 1. L'étendue de la pathogénicité de *S. marcescens* pour différents lépidoptères varie en fonction de la voie d'inoculation et, chez *B. mori*, l'infestation intra-hémocélisque provoque la mortalité maximale (Steinhaus, 1959). La valeur de la DL₅₀ obtenue dans cette étude semble être élevée par rapport aux valeurs obtenues pour l'anthronome du cotonnier adulte par Slatten et Larson (1967) et celles observées pour les larves du 4^e âge du zigzag par Podgwaite et Cosenza (1976). Chez le zigzag, ces auteurs ont observé une mortalité de 68 % au quatrième âge larvaire lorsqu'il est infesté avec une dose d'environ 40 cellules/larve.

Pour ce qui concerne les composants biochimiques, les contenus en protéines de l'hémolymph et de l'intestin diminuent de manière significative après inoculation chez tous les échantillons (Tableaux II et III). Le pourcentage de réduction des quantités de protéines dans l'hémolymph, contrairement à celui observé pour l'intestin, est plus élevé tout de suite après l'inoculation et diminue progressivement par la suite. Des tendances similaires pour la modification des protéines de l'hémolymph ont été observées par Samson (1987) chez le ver à soie infesté par *Bacillus thuringiensis* et par Chadwick (1975) chez la grande pyrale (*Galleria mellonella*) infestée par *Bacillus cereus*.

Les contenus en lipides de l'hémolymph et de l'intestin diminuent également de manière significative après l'inoculation bactérienne et le pourcentage de diminution s'accroît par la suite. Le contenu en hydrates de carbone fait néanmoins apparaître une tendance différente. Dans l'hémolymph, il diminue de manière significative après l'inoculation bactérienne tandis que, dans l'intestin, il est supérieur à celui des lots témoins. Cette augmentation du contenu en hydrates de carbone à l'intérieur de l'intestin pourrait être due à l'action de la chitinase qui est sécrétée par la bactérie (Lysenko, 1976) sur la paroi intestinale.

COMPARATIVE STUDIES BETWEEN EXFOLIATION REELING TENSION AND REELING PERFORMANCE OF INDIAN PURE AND HYBRID RACES

C. TAKABAYASHI¹, G. HARIRAJ^{**}, H. TSUBOI^{*} & M. TSUGHE^{*}

^{*} National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-4-8, Gohda, Okaya, Nagano Prefecture 394, Japan.

^{**} Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, BTM Layout, Madiwala, Bangalore - 560068, India.

It was thought that a relation exists between the agglutination force and the reeling performance of cocoons. The Indian bivoltine pure race and hybrid race cocoons, NB₄D₂ and KA × NB₄D₂, were studied for exfoliation reeling tension from the outer layer to the inner layer of the cocoon and the reelability of cocoons. The cocoons were examined to get continuously the moving average tension values, moving standard deviation values and moving coefficient of variation values of cocoon filament exfoliation tension. The moving coefficient of variation values of Indian pure race cocoons was observed to be higher than that of Indian hybrid race cocoons. In the case of Indian bivoltine hybrid cocoons the occurrence of exfoliation tension was observed to reduce gradually from the outer to the inner layer of the cocoons, whereas a similar tendency was not observed in the case of Indian bivoltine pure race cocoons. This was attributed to the better reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons compared with that of Indian bivoltine pure race cocoons cooked under the same conditions.

Keywords : Agglutination force, exfoliation reeling tension, moving average, moving standard deviation, moving coefficient of variation.

INTRODUCTION

Smooth unwinding of the cocoon filament from the cocoon shell depends on the easing of the agglutination force between the cocoon filament and cocoon shell, using the best possible cooking conditions. However, the agglutination force between the sericin crossing points depends on the silkworm spinning conditions and sericin characteristics. Breakage of the cocoon filament during reeling depends on the relation between the agglutination force and the weak points in the cocoon filament structure (Shimazaki, 1961).

Good cooking conditions soften the sericin suitably, thus reducing the agglutination force considerably. However, even then dropping of cocoons during reeling takes place if weak points are present in the cocoon structure and if the agglutination force is still more after cocoon cooking. In order to analyze the relationship between the agglutination force, which is measured by exfoliation tension and reeling performance, studies have been conducted using Indian bivoltine pure and hybrid race cocoons.

1. Author to whom correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

1. Raw material :

The single cocoon reeling tension studies and reelability test were carried out on Indian bivoltine cocoons, namely, NB₄D₂, a pure race, and KA × NB₄D₂, a hybrid race, raised during June 1993.

2. Cooking conditions :

A pressurized conveyor cooking machine was used for the study. The cooking conditions were kept constant as per the standard procedure followed in cocoon testing houses in Japan. The cooking conditions were,

- Retting part temperature : 40 °C
- Steaming for permeation temperature : 93 °C
- Low temperature permeation part : 57 °C
- Steaming cooking part temperature : 98 °C
- Water head pressure in steam cooking part : 10 mm H₂O
- Adjustment part temperatures : 98-93-85 °C
- Finishing part temperature : 55 °C
- Duration of cooking : 12 minutes

The cocoons were cooked in order to achieve the best possible reeling conditions.

3. Measurement of exfoliation cocoon filament reeling tension :

Fig. 1 shows the line diagram of the measuring instrument of a cocoon filament exfoliation reeling tension. The cocoon filament was brushed from the cooked cocoon and then passed through the slub catcher and tension detector to the reel. The passage was maintained perfectly straight to avoid tension developed by other variables. In the measuring instrument care was taken to measure only the exfoliation reeling tension produced by the cocoon filament.

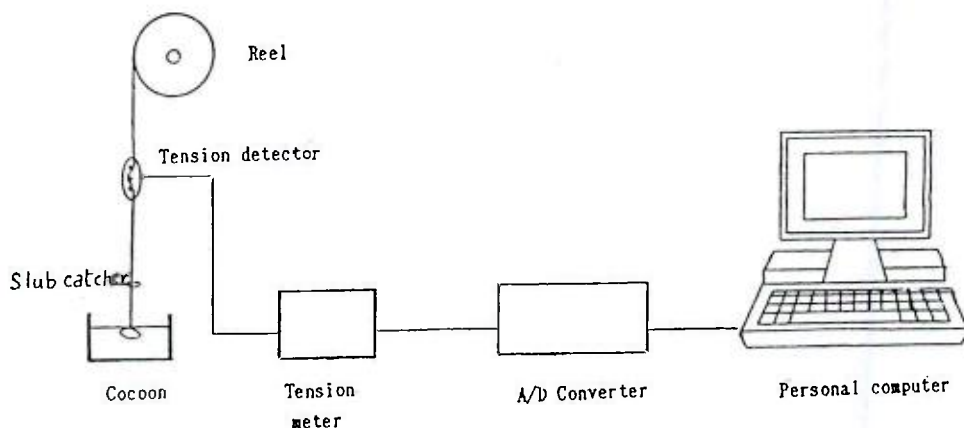


Fig. 1 : Block diagram of the measuring instrument of a cocoon filament exfoliation tension.

Fig. 1 : Bloc-diagramme de l'instrument de mesure de la tension de détachement d'une bave de cocon.

The tension measured by the tension detector was observed in the tension meter attached to it. (The tension meter named as Check Master was manufactured by M/s Kanai Company Ltd, Japan). The tension meter was adjusted to read 10 grams as 1 volt. The analog signal from the tension meter was transferred to A/D converter (AD 3000 manufactured by M/s Nippon Protection System Co. Ltd, Japan), to be converted into a digital signal. The digital signal was input into a personal computer and using the above system, data were collected.

The testing was conducted at the reel speed of 30 m/min. and the reeling bath temperature was maintained constant at 40 °C. The data in the A/D converter were also collected at an interval of 0.5 sec. The analysis of exfoliation tension was done at random interval L from the about 200 data collected in A/D converter. The duration of measurement of the 200 data was equal to 100 sec. (i.e., from a 50-meter filament length).

4. Reelability test :

From the same sample lot of cocoons, about 50 cocoons were conducted the reelability test in one end of the multiend reeling machine at a reel speed of 100 m/min. The other cooking and reeling conditions were kept constant as per the single cocoon reeling test. The reelability test was carried with 10 cocoons per end and the length of the cocoon filament reeled, number of castings made, weight of raw silk reeled, etc., were found. From the data of unreelable cocoons and carryover cocoons, the reelability of the cocoons was calculated. The reeling characteristics, namely, cocoon filament length, non broken filament length, filament denier, raw silk recovery, waste percentage, sericin loss were also calculated. During the reeling test the reeling tension was also measured.

5. Analysis method of exfoliation tension :

It was thought that a relation exists between variance of cooked cocoon exfoliation and agglutination force between cocoon filament and cocoon layer. Fig. 2 shows the analysis method of a cocoon filament exfoliation tension. The cooked cocoons were reeled from the outer to the inner layer and the exfoliation tension $X(t)$ was measured continuously during reeling. Initially, a random interval L was selected and the mean and standard deviation values were calculated over a period L . Then the random interval L was moved by one datum and the mean and standard deviation were calculated. This calculation was done continuously by moving one after another data from the outer to the inner layer of the cocoon filament and the results obtained were termed moving average, moving standard deviation and moving coefficient of variation.

Further, the calculation was also done to find $\mu + n\sigma$ (when $n = 3.5$) at the same random interval L . As per the above procedure, the random interval was moved by one data continuously and $\mu + n\sigma$ was calculated continuously. The results thus obtained were termed threshold level. Then the original data of exfoliation cocoon filament tension $X(t)$ were compared with the threshold level and the data, namely, $X(t) > (\mu + n\sigma)$ were calculated. These data indicate the sudden occurrence of exfoliation tension. These pulse signals were plotted and termed exfoliation tension pulses. The pulse wave signal from the outer to the inner layer of the cocoons depicts the hard points of agglutination force between cocoon filament and cocoon layer (Takabayashi *et al.*, 1963).

RESULTS AND DISCUSSION

1) Single cocoon reeling tension results :

While spinning its cocoon, the silkworm initially selects the convenient position and then starts spinning the cocoon filament. During spinning of the cocoon, the silkworm moves its head in shape of 8 and vomits fibroin and sericin from its silk glands. It has been inferred that in the case of a mulberry silk filament of 800 meters in length, the number of agglutination points observed at an interval of 2 mm space is about 400,000 points. For effective reeling of the cocoon filament, the agglutination points of sericin must be softened to a suitable degree. It can be seen from Fig. 3, which shows the exfoliation tension of a single cocoon filament measured at 1 mm/sec. speed. The cocoon filament exfoliation tension has sharp and random signal waves. If the cocoon filament Young's modulus is very large and if the filament will not easily stretch, the filament exfoliation tension and

agglutination force appearance will be more. Thus only at agglutination points, the force will be more and the pulse-like signal wave will be obtained.

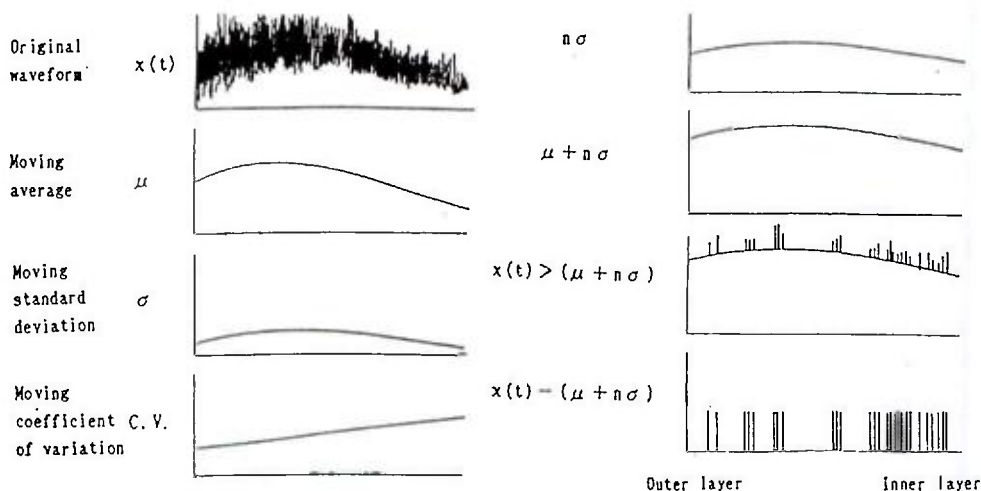


Fig. 2 : Analysis method of a cocoon filament exfoliation tension.

Fig. 2 : Méthode d'analyse de la tension de détachement d'une bave de cocon.

Though the reeling yarn force is kept constant, depending on the characteristics of the cocoon, the yarn tension differs. Further, the yarn peeling angle θ° is also different at various reeling stages. From Fig. 3 it can be observed that the agglutination force varies widely during peeling.

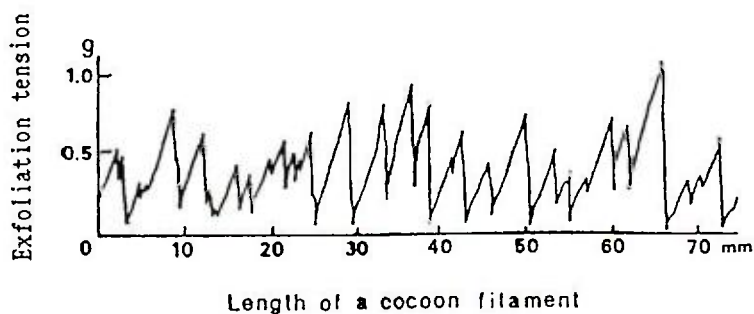


Fig. 3 : Signal waveform of a cocoon filament exfoliation tension (*Bombyx mori* silkworm's cocoon).

Fig. 3 : Forme d'onde de transmission de la tension de détachement d'une bave de cocon (ver à soie *Bombyx mori*).

Suppose the cocoon is held at one position and yarn is peeled from the cocoon and the force is measured as W_a (g), filament stretch as X % and the angle of peeling tension as θ° , then the exfoliation reeling tension can be measured as follows :

$$\text{Exfoliation reeling tension in GMs} = W_a / (1 - \cos.\theta + X/200)^{(1)}$$

The theoretical relation derived between filament Young's modulus and exfoliation is :

$$\text{Young's modulus in Kg/mm} \quad E = \frac{T}{A} / \frac{X}{100} \quad (2)$$

where A is the filament cross sectional area in mm.

By solving equations (1) and (2),

$$T = A * E [(1 - \cos.\theta)^2 + 2W_a / A * E]^{1/2} - (1 - \cos.\theta)]^{(3)} \text{ (Takabayashi, 1992)}$$

From equation (3) it can be observed that as the cocoon filament cross sectional area A and Young's modulus E becomes larger, the filament exfoliation tension also becomes larger. It is a fact that as the cocoon filament fineness is large and sericin is hard, the agglutinative force is large and the same results are obtained during trials.

Fig. 4 shows the comparison between Indian bivoltine pure and hybrid race cocoons exfoliation tension graphs and its analysis results of a single cocoon. (In the graph, agglutination force is measured as 1 volt as 1 gram). Table I shows the average results of the moving average, moving standard deviation, moving coefficient of variation of Indian pure and hybrid race bivoltine cocoons. It may be

Table I. Average results of exfoliation reeling tension of Indian bivoltine cocoons.

Tableau I. Résultats moyens de la tension de détachement au dévidage des cocons bivoltins indiens.

Exfoliation reeling tension characteristics	Indian hybrid race $KA \times NB_4D_2$	Indian pure race NB_4D_2
<i>Caractéristiques de la tension de détachement au dévidage</i>	<i>Race indienne hybride $KA \times NB_4D_2$</i>	<i>Race indienne pure NB_4D_2</i>
Moving average of exfoliation tension <i>Moyenne mobile de la tension de détachement</i>	0.0991	0.0968
Moving standard deviation of exfoliation tension <i>Ecart type mobile de la tension de détachement</i>	0.0253	0.0274
Moving coefficient of variation of exfoliation tension <i>Coefficient de variation mobile de la tension de détachement</i>	25.66	28.16

(KA X NB4D2)

(NB4D2)

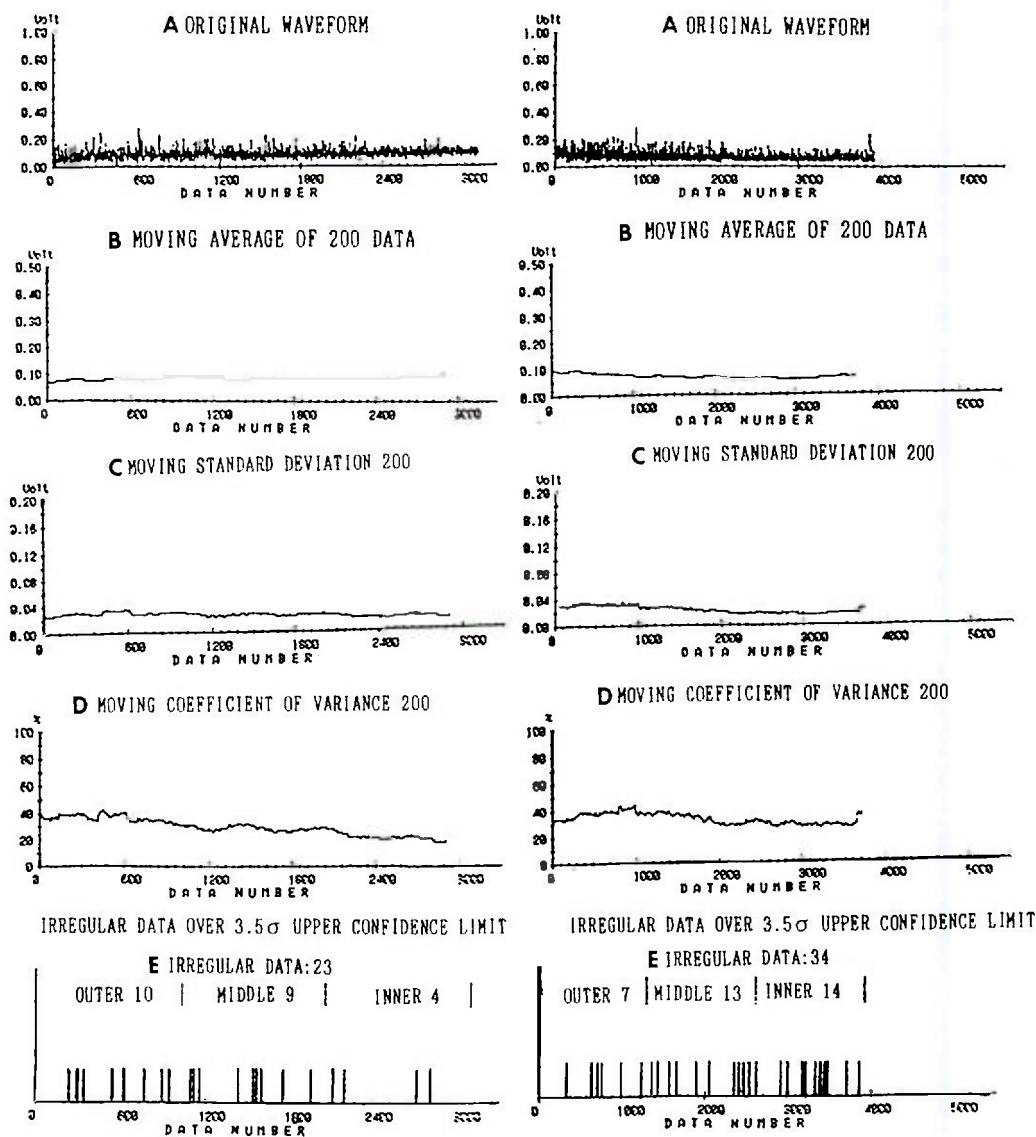


Fig. 4 : Comparison of analysis results of a cocoon filament exfoliation tension in Indian bivoltine pure and hybrid race cocoons.

Fig. 4 : Comparaison des résultats de l'analyse de la tension de détachement d'une bave de cocons chez des races indiennes pures et hybrides.

(A) : Original waveform / *Forme d'onde originale.*

(B) : Moving average tension / *Tension moyenne mobile.*

(C) : Moving standard deviation / *Ecart type mobile.*

(D) : Moving coefficient of variation / *Coefficient de variation mobile.*

(E) : Pulse of cocoon filament exfoliation tension / *Impulsion de la tension de détachement d'une bave de cocon.*

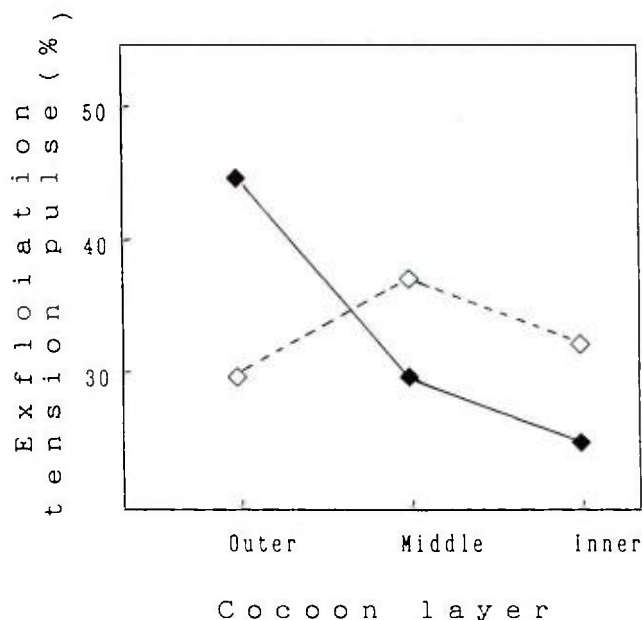
inferred from the signal wave form of Indian bivoltine cocoons that the exfoliation tension varies widely when the yarn is peeled from the cocoons. As indicated in equation (3), the random variation in agglutination force causes random variation in exfoliation tension. However, much deviation was not observed between the moving average and moving standard deviation values of the Indian pure and hybrid race bivoltine cocoons. But the moving coefficient of variation of Indian pure race cocoons is on the higher side compared to Indian hybrid race cocoons, which may also be seen from Table I, thus indicating that even after softening the agglutination force by cooking, the Indian pure race cocoons show a wide variation in cocoon layer exfoliation tension, which may lead to poor reelability of cocoons.

Further, it may be inferred from the exfoliation tension pulse of the outer to the inner layer of cocoon ($\mu + 3.5\sigma$) (Fig. 4) that in the case of Indian hybrid cocoons the appearance of the pulse rate is more in the outer layer of the cocoon and gradually decreases up to the inner layer whereas, in the case of Indian pure races, the middle to inner layer shows a higher pulse appearance rate. The same results can also be seen on the average results of all the cocoons which are plotted in Fig. 5. The pattern of the pulse appearance rate from outer to inner layers of the cocoon in the case of Indian bivoltine hybrid cocoons is similar to the Japanese bivoltine hybrid cocoons (Takabayashi, 1992). The increase in the agglutination force in the middle layers leads to more dropping of cocoons during reeling, resulting in a poor reeling performance.

Fig. 5 : Average results of exfoliation tension pulse of Indian bivoltine cocoons.

Fig. 5 : Résultats moyens de l'impulsion de la tension de détachement des cocons bivoltins indiens.

- ◆ Indian bivoltine hybrid race / *Race hybride bivoltine indienne* (KA × NB₄D₂).
- ◇ Indian bivoltine pure race / *Race pure bivoltine indienne* (NB₄D₂).



2. Reelability test results :

Table II shows the reeling characteristics of Indian bivoltine cocoons. It may be seen from the results that though the average cocoon filament length of Indian pure race and hybrid race cocoons taken for the study were almost identical, the non broken filament length of Indian bivoltine pure race cocoons were very less. This may be attributed to the more variations in the exfoliation reeling tension during peeling of yarn from Indian pure race cocoons, which was seen in the single cocoon reeling tension test also. The reelability of Indian bivoltine pure race cocoons was drastically lower than that

of Indian bivoltine hybrid race cocoons with the same cooking treatment. As could be seen from the pulse signal of exfoliation, the dropping of the Indian pure race cocoons was very high compared to the Indian hybrid race cocoons.

Table II. Reeling characteristics of Indian bivoltine cocoons.

Tableau II. Caractéristiques de dévidage des cocons bivoltins indiens.

Reeling characteristics	Indian hybrid race KA × NB ₄ D ₂	Indian pure race NB ₄ D ₂
Caractéristiques de dévidage	Race hybride indienne KA × NB ₄ D ₂	Race pure indienne NB ₄ D ₂
Filament length / Longueur de la bave (m)	867	820
Non-broken filament length / Longueur de bave sans rupture (m)	769	556
Filament denier / Titre de la bave (d)	2.26	2.32
Reelability (%) / Dévidabilité (%)	89.0	68.6
Raw silk (%) / Soie grège (%)	35.2	35.7
Raw silk recovery / Obtention de soie grège (%)	76.2	73.7
Waste % on silk wt. / Déchets sur le poids de soie (%)	11.9	11.5
Pelade weight / Poids de la pelle (g)	0.0177	0.0203
Reeling tension / Tension au dévidage (g/d)	0.3757	0.3759
Sericin loss / Perte de sérécine (%)	4.74	6.05

It is interesting to note that both Indian pure and hybrid race cocoons show the same yarn reeling tension during reeling. But since there was a difference between the crossing points of sericin and cocoon layers of cocoons, the reelability of cocoons was also different. Thus it may be inferred that the reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons was comparatively better than that of Indian bivoltine pure race cocoons due to the variations in the agglutination force of the Indian bivoltine pure race cocoons.

CONCLUSION

From the above discussion, it may be concluded that the Indian bivoltine pure race cocoons show more variations in the exfoliation reeling tension. The Indian bivoltine hybrid race cocoons show a gradual reduction in the exfoliation reeling tension pulse from the outer to the inner layer, whereas Indian bivoltine pure race shows a higher pulse in the middle layers. The reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons is better than that of Indian pure race cocoons under the same cooking conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge active support and encouragement from Mr Haruo Kinoshita, Chief, New Silk Materials Division, National Institute of Sericulture and Entomological Science, Okaya.

REFERENCES

- SHIMAZAKI A. (1961) Studies of statistical analysis method and control in silk reeling process. Bull. Sericult. Exp. Sta., 16, 403-522.
- TAKABAYASHI C. (1992) Dynamic analysis of the exfoliation tension of a cocoon filament and verification by stimulation experiments. J. Sericult. Sci. Japan, 62(1), 20-29.
- TAKABAYASHI C., TSUBOI H., TSUGHE M. (1993) Cocoon filament agglutinative force analysis with respect to cocoon cooking conditions. J. Silk Sci. Tech. Jan, 41, S3-S4.

ETUDES COMPARATIVES ENTRE LA TENSION DE DETACHEMENT DU FIL ET LA DEVIDABILITE LORS DU DEVIDAGE DE COCONS DE RACES INDIENNES PURE ET HYBRIDE

C. TAKABAYASHI*, G. HARIRAJ**, H. TSUBOI* & M. TSUGHE*

* National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-4-8, Gohda, Okaya, Nagano Prefecture 394, Japon.

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

On a émis l'hypothèse qu'une relation existait entre la force d'agglutination et la performance du dévidage des cocons. On a étudié la tension de détachement du fil au dévidage de la couche externe à la couche interne du cocon et la dévidabilité des cocons chez deux races indiennes : la race pure NB₄D₂ et la race hybride KA × NB₄D₂. Les cocons ont été soumis à un examen afin d'obtenir en continu les valeurs de la tension moyenne, de l'écart type et du coefficient de variation de la tension de détachement de la bave du cocon. Les valeurs du coefficient de variation des cocons de la race indienne pure sont supérieures à celles obtenues pour les cocons hybrides. Dans le cas des cocons hybrides bivoltins indiens, la tension de détachement du fil diminue progressivement de la couche externe à la couche interne, contrairement aux cocons bivoltins de race pure chez lesquels cette tendance n'a pas été observée. Nous avons attribué cela à une meilleure dévidabilité des cocons bivoltins indiens hybrides par rapport aux cocons bivoltins indiens de race pure cuits dans les mêmes conditions.

INTRODUCTION

Le dévidage régulier de la bave d'un cocon d'une coque soyeuse dépend du relâchement de la force d'agglutination entre la bave du cocon et la coque soyeuse dans les meilleures conditions de cuisson possibles. Cependant, la force d'agglutination aux points de croisement de la séricine est liée aux conditions de filage du ver à soie et aux caractéristiques de la séricine. La casse de la bave au cours du dévidage est fonction de la relation entre la force d'agglutination et les points faibles de la structure de la bave (Shimazaki, 1961).

De bonnes conditions de cuisson permettent d'obtenir un amollissement de la séricine, amollissement qui entraîne une diminution importante de la force d'agglutination. Cependant, il arrive quand même que des cocons tombent au cours du dévidage si la structure du cocon présente des points faibles et si la force d'agglutination est toujours supérieure après la cuisson des cocons. Afin d'analyser la relation entre la force d'agglutination, qui se mesure d'après la tension de détachement du fil et la performance de dévidage, des études ont été réalisées à partir de cocons bivoltins indiens de races pure et hybride.

MATERIELS ET METHODES

1. Matière première :

Les études concernant la tension de dévidage d'un cocon et le test de dévidabilité ont été effectuées sur des cocons bivoltins indiens de la race pure NB₄D₂ et de la race hybride KA × NB₄D₂ élevés en juin 1993.

2. Conditions de cuisson :

Une machine de cuisson pressurisée à convecteur a été utilisée pour cette étude. Les conditions de cuisson sont maintenues constantes suivant la procédure standard utilisée dans les locaux de test des cocons au Japon. Les conditions de cuisson sont les suivantes :

- Température de rouissage : 40 °C
- Température d'étuvage pour l'infiltration : 93 °C
- Basse température d'infiltration : 57 °C
- Température de cuisson par étuvage : 98 °C
- Pression principale de l'eau au cours de l'étuvage : 10 mm H₂O
- Températures d'ajustement : 98-93-85 °C
- Température de finition : 55 °C
- Durée de la cuisson : 12 minutes

Les cocons ont été cuits de façon à obtenir les meilleures conditions de dévidage possibles.

3. Mesure de la tension de détachement du fil au dévidage :

La figure 1 présente le diagramme de l'instrument de mesure de la tension de détachement d'une bave de cocon. La bave du cocon est broyée sur le cocon cuit puis passée à travers le lance-bout et le détecteur de tension jusqu'à la bobine. Le passage est maintenu parfaitement droit afin d'éviter un développement de tension par d'autres facteurs. Dans l'instrument de mesure, on a pris soin de mesurer uniquement la tension de détachement au dévidage produite par la bave du cocon.

La tension mesurée par le détecteur de tension a été obtenue dans le tensiomètre rattaché. (Le tensiomètre, appelé Check Master, est fabriqué par M/s Kanai Company Ltd, Japon). Le tensiomètre a été ajusté à 10 grammes pour 1 volt. Le signal analogique du tensiomètre est transféré vers un transformateur continu/alternatif (AD 3000 fabriqué par M/s Nippon Protection System Co. Ltd, Japon) afin d'être converti en signal digital. Le signal digital est saisi sur un micro-ordinateur où les données sont collectées.

Le test de dévidage est réalisé à la vitesse de 30 m/minute, la température du bain de dévidage étant maintenue constante à 40 °C. Les données issues du transformateur continu/alternatif sont également relevées à intervalles de 0,5 seconde. L'analyse de la tension de détachement est réalisée à intervalles aléatoires sur la base d'environ 200 données relevées dans le transformateur. La durée de la mesure des 200 données est égale à 100 secondes (soit une longueur de bave de 50 m).

4. Test de dévidabilité :

Environ 50 cocons d'un même échantillon sont soumis au test de dévidabilité sur l'un des bouts d'une machine à dévider multibouts à la vitesse de dévidage de 100 m/minute. Les autres conditions de cuisson et de dévidage sont maintenues constantes selon le test de dévidage d'un cocon. Le test de dévidabilité est réalisé avec 10 cocons par bout ; on a ensuite déterminé la longueur de la bave dévidée, le nombre de jets réalisés, le poids de la soie grège dévidée, etc. La dévidabilité des cocons a été calculée sur la base des cocons non dévidables et reportés. On a également calculé les paramètres du dévidage, à savoir : la longueur de la bave d'un cocon, la longueur d'un fil sans casse, le titre de la bave, le pourcentage de soie grège, le pourcentage de déchets, la perte en sérécine. La tension de dévidage est également mesurée au cours du test de dévidage.

5. Méthode d'analyse de la tension de détachement :

On a émis l'hypothèse qu'il existait une relation entre la variance de la tension de détachement des cocons cuits et la force d'agglutination entre la bave et la coque soyeuse. La figure 2 présente la méthode d'analyse de la tension de détachement au dévidage d'une bave de cocon. Les cocons cuits sont dévidés depuis la couche externe jusqu'à la couche interne et la tension de détachement $X(t)$ est mesurée de manière continue au cours du dévidage. Un intervalle aléatoire L a tout d'abord été sélectionné et les valeurs de l'écart type et de la moyenne ont été calculées sur une durée L . L'intervalle aléatoire L est ensuite déplacé d'une donnée et la moyenne et l'écart type sont déterminés. Ce calcul est fait de manière continue en déplaçant une donnée après l'autre de la couche externe à

la couche interne de la bave et les résultats ainsi obtenus ont été dénommés moyenne mobile, écart type mobile et coefficient de variation mobile.

Par ailleurs, un calcul a également été réalisé afin de déterminer $\mu + n\sigma$ (pour $n = 3,5$) au même intervalle aléatoire L . Selon la procédure décrite ci-dessus, l'intervalle aléatoire est déplacé d'une donnée à l'autre de manière continue et $\mu + n\sigma$ est calculé en continu. Les résultats ainsi obtenus sont dénommés niveau du seuil. Les données originales obtenues pour la tension de détachement du fil au dévidage $X(t)$ sont ensuite comparées au niveau du seuil et les données $X(t) > (\mu + n\sigma)$ sont calculées. Ces données révèlent une apparition soudaine de la tension de détachement. Ces signaux différentiels sont repérés et dénommés différentiels de tension de détachement. L'onde différentielle de la couche externe à la couche interne du cocon décrit les points durs de la force d'agglutination entre la bave et la coque soyeuse (Takabayashi et coll., 1963).

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Résultats de la tension de dévidage d'un cocon :

Avant le filage, le ver à soie choisit la position la plus appropriée puis commence à filer sa bave. Au cours du filage, la tête du ver à soie dessine un 8 et dégurgite la fibroïne et la sérécine contenues dans ses glandes séricigènes. Il a été calculé que, pour une bave de soie mûrier de 800 mètres de long, le nombre de points d'agglutination à intervalles de 2 mm est d'environ 400 000. Pour le dévidage, les points d'agglutination de sérécine doivent être assouplis à un degré convenable, comme le montre la figure 3 qui présente la tension de détachement d'une bave de cocon mesurée à la vitesse d'1 mm/seconde. La tension de détachement de la bave donne des ondes avec des signaux marqués et aléatoires. L'apparition de la tension de détachement de la bave et la force d'agglutination seront d'autant plus élevés que le module de Young pour la bave est important et la bave peu élastique. C'est donc seulement aux points d'agglutination que la force sera plus importante et que se trouveront les différentielles.

Bien que la force du fil au dévidage soit maintenue constante, suivant les caractéristiques des cocons, la tension du fil varie. De plus, l'angle θ° d'arrachement du fil varie en fonction du stade du dévidage. La figure 3 montre que la force d'agglutination varie fortement au cours du dévidage.

Soient un cocon tenu selon une certaine position et un fil en cours de dévidage, la force $Wa(g)$, l'élasticité de la bave $X\%$ et l'angle de la tension de dévidage θ° , la tension de détachement au dévidage peut se mesurer selon la formule suivante :

$$\text{Tension de détachement au dévidage en Gms} = Wa / (1 - \cos.\theta + X/200) \quad (1)$$

La relation théorique dérivée entre le module de Young pour la bave et le détachement est :

$$\text{Module de Young en Kg/mm} \quad E = \frac{T}{A} / \frac{X}{100} \quad (2)$$

où A est la surface de section de croisement du fil en mm.

En résolvant les équations (1) et (2), on obtient :

$$T = A * E \{ [1 - \cos.\theta]^2 + 2Wa / A * E \}^{1/2} - (1 - \cos.\theta) \quad (3) \quad (\text{Takabayashi, 1992})$$

A la lecture de l'équation (3), il apparaît que la tension de détachement de la bave augmente en même temps que la surface de section de croisement de la bave A et le module de Young E . Ceci démontre que plus la bave est fine et la sérécine dure, plus la force d'agglutination est importante, des résultats identiques ayant été obtenus au cours des tests.

La figure 4 présente des graphiques établissant une comparaison de la tension de détachement entre les cocons bivoltins indiens purs et hybrides. (Dans les graphiques, la force de détachement est exprimée sous la forme 1 volt = 1 gramme). Le tableau I donne les résultats obtenus pour la moyenne

mobile, l'écart type mobile, le coefficient de variation mobile des cocons bivoltins indiens purs et hybrides. D'après la forme de l'onde des cocons bivoltins indiens, on peut déduire que la tension de détachement varie fortement lorsque le fil est détaché des cocons. Comme l'indique l'équation (3), la variation aléatoire de la force d'agglutination provoque une variation aléatoire de la tension de l'arrachage. Cependant, on n'a pas observé d'écarts importants de la moyenne mobile et de l'écart type mobile entre les cocons bivoltins indiens purs et les hybrides. Le coefficient de variation mobile obtenu pour les cocons de race indienne pure est supérieur à celui des cocons de race indienne hybride (Tableau I), ce qui indique que, même après diminution de la force d'agglutination par cuisson, les cocons indiens de race pure présentent une forte variation de la tension de détachement de la coque soyeuse pouvant entraîner un dévidage médiocre.

De plus, on peut déduire des différentielles de tension de détachement de la couche externe à la couche interne du cocon ($\mu + 3,5\sigma$) (Fig. 4) que, dans le cas des cocons indiens hybrides, l'apparition de pulsations est plus élevée dans la couche externe et diminue progressivement jusqu'à la couche interne, tandis que, dans le cas des races indiennes pures, les couches médianes à internes présentent un taux plus élevé d'apparition de pulsations. Les données moyennes obtenues pour l'ensemble des cocons et présentées dans la figure 5 donnent les mêmes résultats. La courbe du taux d'apparition de pulsations de la couche externe à la couche interne du cocon obtenue pour les hybrides bivoltins indiens est semblable à celle obtenue pour les conditions bivoltins hybrides japonais (Takabayashi, 1992). L'augmentation de la force d'agglutination dans les couches intermédiaires entraîne un accroissement de la chute des cocons au cours du dévidage se traduisant par une performance de dévidage médiocre.

2) Résultats du test de dévidabilité :

Le tableau II présente les paramètres de dévidage des cocons bivoltins indiens. Ces résultats montrent que, bien que la longueur moyenne de la bave soit pratiquement la même pour les cocons de race pure que pour les cocons hybrides sélectionnés pour cette étude, la longueur d'un fil sans casse est nettement moins élevée pour les cocons de race pure. Ceci pourrait être attribué à une variation supérieure de la tension de détachement au cours du dévidage des cocons de race pure, variation qui a également été constatée lors du test de la tension au dévidage d'un cocon. La dévidabilité des cocons de race pure est fortement inférieure à celle des cocons hybrides soumis au même traitement de cuisson. Comme le montrent les pulsations de détachement, la chute des cocons de race pure est très élevée par rapport à celle des cocons de race hybride.

Il est intéressant de noter que les cocons de race pure et les cocons de race hybride présentent la même tension de dévidage du fil au cours du dévidage. Cependant, la différence existant entre les points de croisement de la séricine et la coque soyeuse entraîne une différence de dévidabilité des cocons. On peut donc en conclure que la performance de dévidage des cocons hybrides est comparativement supérieure à celle des cocons de race pure, supériorité qui est due à des variations de la force d'agglutination des cocons de race pure.

CONCLUSION

La discussion qui précède permet de conclure que les cocons bivoltins indiens de race pure présentent des variations supérieures de la tension de détachement au dévidage. Les cocons bivoltins indiens de race hybride présentent une diminution progressive des pulsations de la tension de détachement de la couche externe à la couche interne, tandis que les cocons de race pure présentent des pulsations plus nombreuses dans les couches intermédiaires. La performance de dévidage des cocons bivoltins indiens hybrides est supérieure à celle des cocons bivoltins indiens de race pure soumis aux mêmes conditions de cuisson.

EFFECTS OF HOST PLANTS ON HAEMOCYTE POPULATIONS AND BLOOD VOLUMES OF *ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

L.K. HAZARIKA*, S. BARDOLOI & A. KATAKY

Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat 785013, Assam, India.

*Total haemocyte counts (THCs), larval body weights and head capsule widths of various instars of **Antheraea assama** Westwood reared on two different host plants, **Machilus bombycina** King and **Litsaea polyantha** Juss (Lauraceae), were determined in order to correlate quantitative changes in haemocyte populations, weights and head capsule widths with development and host plants. Weights and head capsule widths of the 5th instar were significantly higher on larvae reared on **L. polyantha** in comparison with those reared on **M. bombycina**. We found that THCs increased progressively during the 4th and 5th instars. Host plants might regulate the variation and it was related to difference in leaf moisture content ; the higher the moisture content (**L. polyantha**), the higher the blood volume but the lower the THCs and vice versa.*

Keywords : Insecta, *Antheraea assama*, total haemocyte counts, blood volume, *Machilus bombycina*, *Litsaea polyantha*.

INTRODUCTION

Diet influences body water contents of phytophagous insects. Body water, on the other hand, directly alters the blood volume (BV) of insects (Mellanby, 1939) which ultimately affects the qualitative (differential haemocyte counts, DHC) and quantitative changes (total haemocyte counts, THC) of a haemocyte population (Nittono, 1964 ; Gupta, 1979, 1985 ; Hazarika and Gupta, 1987). Essentially to test this hypothesis, we intend to study the effects of host plants on BV as well as quantitative changes of the haemocyte population of the 5th instar *Antheraea assama*, an exclusively outdoor sericigenous insect native to northeastern India. It is a polyphagous insect, feeding primarily on leaves of woody trees, *Machilus bombycina* King and *Litsaea polyantha* Juss (Lauraceae). Furthermore, these two host plants are known to induce differential effects on the biology of *A. assama* ; *M. bombycina* improves the silk producing ability whereas *L. polyantha* enhances fecundity.

It has frequently been demonstrated that haemograms change markedly during the active growth period (Tauber and Yeager, 1934 ; Smith, 1938 ; Bahadur and Pathak, 1971 ; Hazarika and Gupta, 1987) and THCs increase progressively during the larval life (Bahadur and Pathak, 1971 ; Shapiro, 1979) culminating prior to pupation. Therefore, we also determined the THCs of five instars (48 h post-moult) of *A. assama* reared separately on two different host plants. Here we compare the body weights and head capsule widths of larvae feeding on *M. bombycina* and *L. polyantha* as well.

* To whom correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Several generations of *A. assama* have been continuously maintained in our laboratory from disease-free eggs obtained from the Central Silk Board, Jadugar Unit, Jorhat, Assam, India.

The larvae were reared on naturally grown trees of *M. bombycina* (2.61-3.00 m tall, 24.17-28.00 cm in diameter of the trunk at the base, bearing 11-18 branches with thick foliage) and *L. polyantha* (approximately 3.0-4.0 m tall, 33.82-35.0 cm in diameter of the trunk at the base, bearing 14-16 branches with thick foliage). Trees were of equal age and planted in adjacent plots in the orchard of the Department of Horticulture (Assam Agricultural University, India).

The leaf moisture content of both types of host plants was estimated from those trees where larvae were reared by following the standard method of AOAC (1970). The body water content of larvae was determined by following Lee (1961). Fresh weights were taken on the larvae of 48 h post-moult, 1st through 5th instars.

Similarly, head capsule widths of all the instars were measured using a binocular microscope equipped with an ocular micrometer disc. This method has been followed by Jobin *et al.* (1992).

By fixing the haemolymph in hot water (56-58 °C for 3-4 min., Rosenberger and Jones, 1960), total haemocyte counts (THC) of the 48 h post-moult, 1st through 5th instar larvae reared on both host plants were counted as per the method of Hazarika and Gupta (1987).

Blood volumes (BV) of the 48 h post-moult 5th instar larvae were measured as per the dye dilution technique of Yeager and Munson (1950) modified by Lee (1961) using 0.3 % amaranth red dye.

The data were subjected to a complete randomized design analysis of variance (ANOVA). Means of THCs were compared by the least significant difference (LSD, Gomez and Gomez, 1984) procedure ($P < 0.05$). Likewise, means of moisture content, body water content, BVs of the 5th instar larvae were compared by Student's 't' test to find out if there was any significant difference between the two host plants. Similar types of analyses were performed on weight and head capsule width of the various instars.

RESULTS

Table I shows the moisture content of the leaves of *M. bombycina* and *L. polyantha*, correspondingly it also shows the body water content, BVs and THCs of the 5th instar *A. assama* fed on its respective host plants.

It was apparent from Table I that the moisture content of *L. polyantha* leaves (64.31 ± 1.02 %) was significantly higher than that of *M. bombycina* leaves (58.89 ± 0.4 %). Likewise, the 5th instar *A. assama* reared on *M. bombycina* contained significantly lower BWs and BVs in comparison with those reared on *L. polyantha*. A similar trend of difference in THCs was also evident (Table I and Fig. 1).

The figure represents the THCs ($\times 100$) of the 1st through 5th instar *A. assama* reared on *M. bombycina* and *L. polyantha* which are shown instarwise on *M. bombycina* and *L. polyantha*, respectively (1st = 29.4 ± 0.39 , 24.2 ± 1.67 ; 2nd = 39.2 ± 0.37 , 34.2 ± 5.78 , 3rd = 33 ± 2.40 , 50.8 ± 2.34 , 4th = 135 ± 17.09 , 94.8 ± 26.82 , 5th = 273.6 ± 11.78 , 166.6 ± 3.54). It is evident from the figure that the instar conditioned the haemocytes to change in both groups, irrespective of host plants. However, during the initial three instars in *M. bombycina*-reared larvae and the 1st and 2nd instars in *L. polyantha*-reared larvae THCs were not significantly different from each other. But the number of cells changed significantly during the later instars (4th-5th) of *M. bombycina*- and 3rd-5th of *L. polyantha*-reared larvae (Fig. 1). The same figure also depicts the significant difference in THCs between the 3rd, 4th and 5th instar larvae reared on either of the hosts. THCs of the 3rd instar larvae reared on *L. polyantha* were significantly higher in comparison with those reared on *M. bombycina*. Conversely, THCs were significantly higher in the 4th and 5th instars of *M. bombycina*-reared larvae than in those reared on *L. polyantha*. The interaction of host plants and instars on THCs is also evident in Fig. 1. It shows that in the first three initial instars the different food plants did not induce any significant change in the total number of haemocytes between the two different groups. But towards

the later instars, during 4th and 5th, *M. bombycina*-reared larvae generated a significantly higher number of haemocytes than *L. polyantha*-reared larvae.

Table I. Per cent leaf moisture content of host plants, body water content (BW) and blood volumes (BV) in percentages of body weight and total haemocyte counts (THC/mm³) of the 5th instar *A. assama* fed on respective host plants.

*Tableau I. Pourcentage d'humidité des feuilles des plantes hôtes, contenu en eau du corps (EC) et volumes sanguins (VS) en pourcentage du poids larvaire et numération des hémocytes totaux (NHT/mm³) chez les larves d'*A. assama* au cinquième âge en fonction de la plante nourricière.*

Host plant	Mean ± SE			
	Moisture	BW	BV	THC
<i>Plante hôte</i>	<i>Moyenne ± écart type</i>			
	<i>Humidité</i>	<i>EC</i>	<i>VS</i>	<i>NHT</i>
<i>M. bombycina</i>	58.89 ± 0.04 (5)	79.77 ± 0.42 (3)	14.52 ± 0.52 (3)	27375 ± 1771.87 (5)
<i>L. polyantha</i>	64.31 ± 1.02 (5)	84.65 ± 0.63 (3)	27.08 ± 1.30 (3)	166121 ± 357.62 (5)
't' value / Valeur "t"	5.40 (df=8, P=0.05)	4.99 (df=4, P=0.05)	6.93 (df=4, P=0.05)	6.93 (df=8, P=0.05)

df : Degree of freedom / Degré de liberté.

Figures in parentheses indicate sample size / Les chiffres entre parenthèses indiquent la taille l'échantillon.

Table II shows the body weights and head capsule widths of the different instars of *A. assama* reared on the two different host plants. Weight followed a characteristic pattern of consistent, significant and progressive increase as the larvae passed from one instar to another throughout the larval period irrespective of host plants ($F = 805.72$, $df = 1,4$, $P = 0.05$). However, the host plant produced significant effects on body weight; weights being significantly higher in the 5th instar larvae reared on *L. polyantha* in comparison with those reared on *M. bombycina*.

Increase in the head capsule widths between instars was stepwise but significant ($F = 41.16$, $df = 1,4$, $P = 0.05$). Unlike the weight, there was no significant difference between the head capsule widths of the 4th and 5th instar larvae reared on *M. bombycina* and *L. polyantha*.

DISCUSSION

As evident from Table I, the increased moisture content of *L. polyantha* leaves is accompanied by an increase in the BW content of *A. assama* larvae fed on them. A reverse situation existed for

M. bombycina-fed larvae. Such a direct relationship between the dietary water and the body water content has been shown for many phytophagous insects (Scriber and Slansky, 1981; for a review, see Mattson and Scriber, 1987), including *A. assama* (Bardoloi and Hazarika, 1992) as well as for omnivorous insects as *Periplaneta americana* (L.) (Wharton *et al.*, 1965). This dietary water which influences BW may in turn influence the haemolymph volume (BV) which serves as a reservoir of water (McLanby, 1939). Earlier, Bardoloi and Hazarika (1992) have also shown that seasonal variation of the BV in this insect is related to corresponding seasonal variation in BW content, which, on the other hand, is affected by the leaf moisture content of *M. bombycina*.

Fig. 1 : Mean THC's of the 1st through 5th instars reared on :

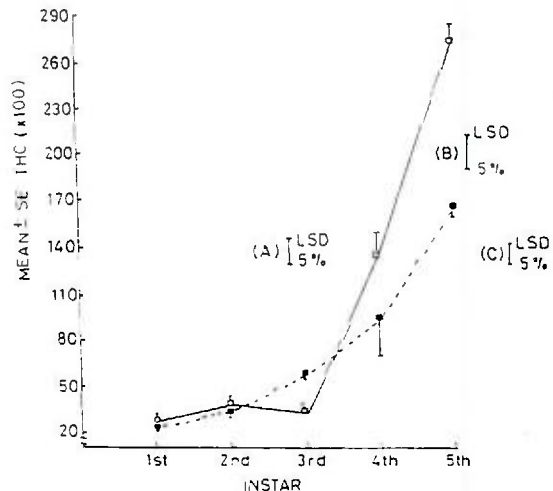
M. bombycina □ — □
L. polyantha ■ — ■

Vertical bars represent LSD 5% ($\times 100$) values between host plants (B) and between instars (A) within the same host and interaction (C).

Fig. 1 : NHT moyens des larves du 1er au 5^e âge élevées sur :

M. bombycina □ — □
L. polyantha ■ — ■

Les barres verticales représentent les valeurs de la différence la moins significative à 5 % ($\times 100$) entre les plantes hôtes (B) et entre les âges (A) à l'intérieur d'un même hôte et leur interaction (C).



The difference in BV, on the other hand, might have influenced the THC's (circulating haemocytes) in the two sets of larvae (*L. polyantha*-fed and *M. bombycina*-fed). *L. polyantha*-reared larvae having higher BW and BV contained lower THC's, whereas *M. bombycina*-reared larvae with lower BW and correspondingly lower BV contained higher THC's. Similar inverse relationships have also been reported by Bardoloi and Hazarika (1992) in *A. assama*, Wheeler (1963) in *P. americana* and by Nittono (1960) in *B. mori*. From this study it is clearly evident that the host plant may directly alter the blood picture including quantitative variation of haemocytes (THCs) in the larval stages.

The continuous increase in THC during the different larval stages of *A. assama* feeding on any one of the host plants is a widespread phenomenon commonly observed in insects. This has previously been observed in *B. mori* (Nittono, 1960), *P. americana* (Wheeler, 1963), *Hyalophora cecropia* (L.) (Lee, 1964), *Halys dentata* (F.) (Bahadur and Pathak, 1971), *Galleria mellonella* (L.) (Shapiro, 1979). Likewise, Hazarika and Gupta (1987) observed a linear increase in THC's during the developmental stages of *Blattella germanica* (L.).

Unlike the linear increase in THC's, the increase in the head capsule width reflecting the true growth of the cuticle follows a stepwise pattern in *A. assama* irrespective of host plants, similar to that of many other insects (Chapman, 1982). However, it follows an isometric pattern when compared with body weight, as the standard. Comparison of larval weights and head capsule widths of the 1st through 5th instars shows a significant difference in growth during the late instars between the two sets of larvae suggesting a nutritional effect on the growth and development of the larvae. Scriber and Slansky (1981) have also previously reported that variation in food quality affects larval growth and development in insects.

Table II. Comparison of body weights and widths of the head capsules of various instars (1st through 5th) reared on *Machilus bombycina* (SM) and *Litsaea polyantha* (SL).

Tableau II. Comparaison des poids larvaires et des largeurs des capsules céphaliques à différents âges (1er à 5e) entre les larves élevées sur *Machilus bombycina* (SM) et celles élevées sur *Litsaea polyantha* (SL).

Host plants Plantes hôtes	Weight (g) Poids (g)					Width of head capsule (mm) Largeur de la capsule céphalique (mm)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
SM	0.029 (.001)	0.104 (.012)	0.628 (.001)	4.395 (.085)	11.937 (.627)	1.290 (.026)	2.267 (.035)	3.833 (.098)	6.033 (.027)	7.467 (.027)
SL	0.026 (.001)	0.132 (.001)	0.759 (.026)	3.895 (.289)	15.336 (.266)	1.403 (.007)	2.173 (.017)	3.767 (.199)	5.600 (.047)	8.033 (.027)
t	NS	NS	NS	NS	t=4.09 (df=4) (P=0.05)	NS	NS	NS	t=6.32 (df=4) (P=0.05)	t=4.0 (df=4) (P=0.05)

Figures in parentheses indicate standard error of mean, SEM / Les chiffres entre parenthèses indiquent l'écart type.

This study shows that the body weight of the 5th instars were significantly greater in the case of *L. polyantha*-fed larvae than in *M. bombycina*-fed ones. Similarly, the head capsule also showed a higher increase in the 5th instars of *L. polyantha*-fed larvae over that of *M. bombycina*-fed ones. This shows that *L. polyantha* influences higher growth in the matured worms in comparison with *M. bombycina*. However, the results of the 4th instars showing less increase in the *L. polyantha*-fed set of larvae can be explained by the earlier observations of Velasco and Walter (1992), that a given host plant species may be suitable only for growth of a particular stage or for a particular aspect of the biology of insects. Nevertheless, this requires further investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Mr K.N. Dutta for his assistance in statistical analyses. Financial support given by the Assam Science Technology and Environmental Council is duly acknowledged.

REFERENCES

- AOAC (1970) Official methods of analysis. 11th ed., Association of Official Analytic Chemists, Washington, D.C.
 BAHADUR J., PATHAK J.P.N. (1971) Changes in the total haemocyte counts of the bug, *Halys dentata*, under certain conditions. J. Insect Physiol., 17, 329-334.
 BARDOLOI S., HAZARIKA L.K. (1992) Seasonal variations of body weight, lipid reserves, blood volumes and haemocyte population of *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera : Saturniidae). Environ. Entomol. 21(6), 1398-1403.

- CHAPMAN R.F. (1982) The insects, structure and function. 3rd ed., Harvard University Press, Cambridge.
- GOMEZ K.A., GOMEZ A.A. (1984) Statistical procedure for agricultural research. 2nd ed., Wiley, New York.
- GUPTA A.P. (1979) Insect haemocytes. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- GUPTA A.P. (1985) Cellular elements in the hemolymph. In Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert eds., Vol. 3, Pergamon Press, Oxford.
- HAZARIKA L.K., GUPTA A.P. (1987) Variations in hemocyte populations during various developmental stages of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera : Blattellidae). Zoo. Sci., 4, 307-313.
- JOBIN L., HERBERT C., BOURASSA J.P. (1992) Head capsule width of larval populations of the gypsy moth (Lepidoptera : Lymantriidae) in Quebec, with reference to Dyar's hypothesis. Environ. Entomol., 21, 89-93.
- LEA M.S. (1964) A study of the hemocytes of the silkworm, *Hyalophora cecropia*. PhD dissertation, Northwestern University Illinois (Original not seen, taken from D. Fier (1979) Multiplication of hemocytes. In Insect hemocytes. A.P. Gupta ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge).
- LEE R.M. (1961) The variation of blood volume with age in the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). J. Insect Physiol., 6, 36-51.
- LONG D.B. (1953) Effects of population density on larvae of Lepidoptera. Trans. R. Ent. Soc. London, 104, 543-584.
- MATSON W.J., SCRIBER J.M. (1987) Nutritional ecology of insect folivores of woody plants : nitrogen, water, fibre and mineral considerations. In Nutritional ecology of insects and mites, spiders and related invertebrates. F. Slansky Jr & J.G. Rodriguez eds., John Wiley, New York.
- MELLANBY L. (1939) The function of insect blood. Biol. Rev., 14, 243-260.
- NITTONO Y. (1960) Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* (L.). Bull. Sericult. Exp. Sta. Tokyo, 16, 171-266.
- ROSENBERGER R.C., JONES J.C. (1960) Studies on total blood cell counts of the southern army worm larvae, *Prodenia eridania* (Lepidoptera). Ann. Ent. Soc. Amer., 53(3), 351-355.
- SCRIBER J.M., SLANSKY Jr F. (1981) The nutritional ecology of immature insects. Ann. Rev. Entomol., 26, 183-211.
- SHAPIRO M. (1979) Changes in hemocyte populations. In Insect hemocytes. A.P. Gupta ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- SMITH H.W. (1938) The blood of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). Cell structure and degeneration and cell counts. Studies on contact insecticides. Tech. Bull. New Hampshire Agric. Exp. Sta., 71, 1-23.
- TAUBER D.E., YEAGER J.F. (1934) On the total blood (hemolymph) cell count of the field cricket, *Gryllus assimilis pennsylvanicus* Gurm. Iowa State Coll. J. Sci., 9, 13-24.
- VELASCO L.R.I., WALTER G.H. (1992) Availability of different host plant species and changing abundance of the polyphagous bug, *Nesara viridula* (Hemiptera : Pentatomidae). Environ. Entomol., 21, 751-759.
- WHARTON D.R., WHARTON M.L., LOLA J. (1965) Blood volume and water content of the male American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). Methods and the influence of age and starvation. J. Insect Physiol., 11, 391-404.
- WHEELER R.E. (1963) Studies on the total hemocyte count and hemolymph volume in *Periplaneta americana* (L.) with special reference to the last molting cycle. J. Insect Physiol., 9, 223-235.
- YEAGER J.F., MUNSON S.C. (1950) Blood volume of the roach, *Periplaneta americana*, determined by several methods. Arthropoda, 1, 255-265.

EFFETS DES PLANTES HOTES SUR LES POPULATIONS D'HEMOCYTES ET SUR LE VOLUME SANGUIN D'*ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

L.K. HAZARIKA*, S. BARDOLOI & A. KATAKY

Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat 785013, Assam, Inde.

*La numération des hémocytes totaux (NHT), le poids larvaire et la largeur de la capsule céphalique à différents âges chez des larves d'*Antheraea assama* Westwood élevées sur deux plantes différentes, *Machilus bombycina* King et *Litsaea polyantha* Juss (Lauraceae), ont été déterminés afin de corrélérer les modifications quantitatives des populations d'hémocytes, des poids et des largeurs des capsules céphaliques avec le développement et les plantes hôtes. Le poids larvaire et la largeur de la capsule céphalique au 5e âge sont nettement supérieurs chez les larves élevées sur *L. polyantha* à ceux des larves élevées sur *M. bombycina*. Les NHT augmentent progressivement au cours du 4e et du 5e âge. Les variations liées aux plantes nourricières pourraient être dues à la différence du contenu en eau des feuilles : le volume sanguin est d'autant plus élevé et les NHT d'autant plus faibles que le contenu en eau est élevé (*L. polyantha*) et inversement.*

INTRODUCTION

Le type d'aliment influe sur les contenus en eau des insectes phytophages. Par ailleurs, l'eau contenue dans le corps affecte directement le volume sanguin (VS) des insectes (Mellanby, 1939), entraînant des modifications qualitatives (numération des hémocytes différentiels, NHD) et quantitatives (numération des hémocytes totaux, NHT) dans une population d'hémocytes (Nittono, 1964 ; Gupta, 1979, 1985 ; Hazarika et Gupta, 1987). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les effets des plantes hôtes sur le volume sanguin ainsi que les modifications qualitatives de la population d'hémocytes chez les larves du 5e âge d'*Antheraea assama*, insecte séricigène élevé uniquement à l'air libre et originaire du nord-est de l'Inde. C'est un insecte polyphage dont la nourriture primaire est constituée par les feuilles des plantes ligneuses *Machilus bombycina* King et *Litsaea polyantha* Juss (Lauraceae). On sait que ces deux plantes hôtes induisent des effets différentiels sur la biologie d'*A. assama* : *M. bombycina* améliore la capacité de production de soie tandis que *L. polyantha* favorise la fécondité.

On a fréquemment démontré la modification marquée des hémogrammes au cours de la période de croissance active (Tauber et Yeager, 1934 ; Smith, 1938 ; Bahadur et Pathak, 1971 ; Hazarika et Gupta, 1987) et l'augmentation progressive des NHT durant la vie larvaire (Bahadur et Pathak, 1971 ; Shapiro, 1979), augmentation culminant avant la nymphose. Nous avons donc déterminé les NHT à cinq âges (48 heures après la mue) chez des larves d'*A. assama* élevées séparément sur deux plantes hôtes différentes. Nous comparons ici les poids larvaires et les largeurs des capsules céphaliques des larves nourries avec *M. bombycina* et *L. polyantha*.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

Plusieurs générations d'*A. assama* ont été élevées de manière continue dans notre laboratoire à partir d'œufs sains fournis par le Central Silk Board, Jadguar Unit, Jorhat, Assam, Inde.

Les larves ont été élevées sur des arbres non cultivés de *M. bombycina* (hauteur : 2,61 à 3,00 m ; diamètre de la base du tronc : 24,17 à 28,00 cm ; nombre de ramifications à feuillage : 11 à 18) et de *L. polyantha* (hauteur approximative : 3,0 à 4,0 m, diamètre de la base du tronc : 33,82 à 35,0 cm, nombre de ramifications à feuillage : 14 à 16). Les arbres sont tous du même âge et plantés dans des parcelles adjacentes au verger du Department of Horticulture (Assam Agricultural University, Inde).

Le contenu en eau des feuilles des deux types de plantes hôtes a été évalué chez les arbres sur lesquels les larves ont été élevées suivant la méthode standard de l'AOAC (1970). Le contenu en eau des larves a été déterminé d'après Lee (1961). Les poids frais des larves ont été relevés 48 heures après la mue, du 1er au 5e âge.

De même, les largeurs des capsules céphaliques ont été relevées à tous les âges à l'aide d'un microscope binoculaire équipé d'un micromètre oculaire. Cette méthode a été suivie par Jobin et coll. (1992).

La numération des hémocytes totaux (NHT) a été effectuée à tous les âges 48 heures après la mue chez les larves élevées sur les deux types de plantes en fixant l'hémolymphé dans l'eau chaude (56 à 58 °C pendant 3 à 4 minutes, d'après Rosenberger et Jones, 1960). Les hémocytes ont été comptés suivant la méthode d'Hazarika et Gupta (1987).

Les volumes sanguins (VS) des larves du cinquième âge 48 heures après la mue ont été mesurés suivant la technique de dilution au colorant de Yeager et Munson (1950) modifiée par Lee (1961) en utilisant du rouge d'amarante à 0,3 %.

Les données ont été soumises à une analyse de variance. Les moyennes des NHT ont été comparées sur la base de la différence la moins significative (DMS, Gomez et Gomez, 1984) ($P < 0,05$). De même, les moyennes des contenus en eau des feuilles, des contenus en eau des larves, des VS chez les larves du 5e âge ont été comparées à l'aide du test "t" de Student pour déterminer les éventuelles différences significatives entre les deux plantes hôtes. Ces mêmes analyses ont été réalisées pour le poids et la largeur de la capsule céphalique aux différents âges.

RESULTATS

Le tableau I présente le contenu en eau des feuilles de *M. bombycina* et *L. polyantha* ainsi que le contenu en eau des larves, les VS et les NHT des larves du 5e âge d'*A. assama* nourries avec leurs plantes respectives.

La lecture de ce tableau révèle que le contenu en humidité des feuilles de *L. polyantha* ($64,31 \pm 1,02$ %) est significativement supérieur à celui des feuilles de *M. bombycina* ($58,89 \pm 0,4$ %). De même, les larves d'*A. assama* au 5e âge élevées sur *M. bombycina* présentent un poids et des VS significativement inférieurs à ceux des larves élevées sur *L. polyantha*. Cette tendance est également évidente pour les NHT (Tableau I et Fig. 1).

La figure représente les NHT ($\times 100$) des larves d'*A. assama* (1er au 5e âge) élevées sur *M. bombycina* et *L. polyantha* respectivement (soit : 1er âge = $29,4 \pm 0,39$, $24,2 \pm 1,67$; 2e âge = $39,2 \pm 0,37$, $34,2 \pm 5,78$, 3e âge = $33 \pm 2,40$, $50,8 \pm 2,34$, 4e âge = $135 \pm 17,09$, $94,8 \pm 26,82$, 5e âge = $273,6 \pm 11,78$, $166,6 \pm 3,54$). La figure montre clairement que l'âge conditionne la modification des hémocytes chez les deux groupes quelle que soit la plante hôte. Cependant, aux trois premiers âges chez les larves élevées sur *M. bombycina* et aux 1er et 2e âges chez les larves élevées sur *L. polyantha*, les NHT ne présentent pas de différence significative. Le nombre de cellules change de manière significative aux derniers âges : 4e et 5e chez les larves élevées sur *M. bombycina* et 3e à 5e chez les larves élevées sur *L. polyantha* (Fig. 1). Cette figure fait également apparaître une différence significative des NHT entre les larves des 3e, 4e et 5e âges quelle que soit leur plante hôte. Les NHT des larves du 3e âge élevées sur *L. polyantha* sont nettement supérieures à celles des larves élevées sur *M. bombycina*. A l'inverse, les NHT des larves des 4e et 5e âges élevées sur *M. bombycina* sont nettement supérieures à celles des larves élevées sur *L. polyantha*. L'interaction entre les plantes hôtes

et les âges pour les NHT est également évidente dans la figure 1. Celle-ci montre que, chez les trois premiers âges, les différentes plantes hôtes n'induisent aucun changement significatif du nombre total d'hémocytes entre les deux groupes. Cependant, aux derniers âges (4e et 5e), les larves élevées sur *M. bombycina* donnent des nombres d'hémocytes nettement supérieurs à ceux obtenus pour les larves élevées sur *L. polyantha*.

Le tableau II présente les poids larvaires et les dimensions des capsules céphaliques des larves d'*A. assama* à différents âges élevées sur les deux plantes hôtes. Le poids présente une augmentation régulière, significative et progressive, caractéristique du passage d'une larve d'un âge à l'autre sur l'ensemble de la période larvaire quelle que soit la plante hôte ($F = 805,72$, $dl = 1,4$, $P = 0,05$). Cependant, le type de plante hôte produit des effets significatifs sur le poids larvaire, celui-ci étant nettement plus élevé chez les larves du 5e âge nourries avec *L. polyantha* que chez celles nourries avec *M. bombycina*.

L'augmentation de la largeur de la capsule céphalique entre les âges est en paliers mais significative ($F = 41,16$, $dl = 1,4$, $P = 0,05$). A l'inverse du poids, on ne constate aucune différence significative pour ce qui concerne les largeurs des capsules céphaliques entre les larves des 4e et 5e âges élevées sur *M. bombycina* et celles élevées sur *L. polyantha*.

DISCUSSION

Comme le montre le tableau I, le fait que le contenu en eau soit plus élevé chez les feuilles de *L. polyantha* entraîne une augmentation du contenu en eau des larves d'*A. assama* nourries avec cette plante hôte. On constate une relation inverse pour les larves nourries sur *M. bombycina*. Une relation aussi directe entre l'eau contenue dans l'aliment et le contenu en eau des larves a été démontrée chez de nombreux insectes phytophages (Scriber et Slansky, 1981 ; voir également la revue de Mattson et Scriber, 1987), y compris *A. assama* (Bardoloi et Hazarika, 1992) ainsi que chez des insectes omnivores comme *Periplaneta americana* (L.) (Wharton et coll., 1965). Le contenu en eau de l'aliment, qui affecte le poids du corps (PC) de l'insecte, pourrait également avoir une influence sur le volume sanguin (VS) qui sert de réservoir d'eau (Mellanby, 1939). Bardoloi et Hazarika (1992) ont également démontré que la variation saisonnière du poids du corps chez cet insecte était corrélée à la variation saisonnière du contenu en eau qui, par ailleurs, est affectée par le contenu en eau des feuilles de *M. bombycina*.

Il se peut que les différences de VS aient affecté les NHT (hémocytes circulants) chez les deux lots de larves (lot nourri avec *L. polyantha* et lot nourri avec *M. bombycina*). Les larves élevées sur *L. polyantha* présentent un poids et un volume sanguin supérieurs et contiennent moins de NHT. Des relations inverses identiques ont été observées par Bardoloi et Hazarika (1992) chez *A. assama*, par Wheeler (1963) chez *P. americana* et par Nittono (1960) chez *B. mori*. Cette étude montre clairement que la plante hôte affecte directement la composition sanguine et entraîne une variation quantitative des hémocytes (NHT) au stade larvaire.

L'augmentation continue des NHT chez les larves d'*A. assama* à différents âges quelle que soit leur plante nourricière est un phénomène commun chez les insectes. Il a été observé chez *B. mori* (Nittono, 1960), *P. americana* (Wheeler, 1963), *Hyalophora cecropia* (L.) (Lee, 1964), *Halys dentata* (F.) (Bahadur et Pathak, 1971), *Galleria mellonella* (L.) (Shapiro, 1979). De même, Hazarika et Gupta (1987) ont observé une augmentation linéaire des NHT au cours du développement chez *Blattella germanica* (L.).

Contrairement à l'augmentation des NHT, l'augmentation de la largeur de la capsule céphalique, qui reflète la croissance réelle de la cuticule, suit une courbe en paliers chez *A. assama*, quelle que soit la plante hôte, comme chez de nombreux autres insectes (Chapman, 1982). Cependant, elle suit une courbe isométrique par rapport au poids larvaire pris comme standard. La comparaison des poids larvaires et des largeurs des capsules céphaliques du 1er au 5e âge fait apparaître une différence significative de la croissance aux derniers âges entre les deux lots de larves, suggérant un effet nutritionnel sur leur croissance et leur développement. Scriber et Slansky (1981) ont observé que la variation de la qualité de l'aliment affectait la croissance et le développement larvaires chez les insectes.

Cette étude montre que le poids larvaire au 5e âge est nettement supérieur chez les larves nourries avec *L. polyantha* à celui des larves nourries avec *M. bombycina*. De même, la capsule céphalique présente une augmentation plus marquée au 5e âge chez les larves nourries avec *L. polyantha* que chez celles nourries avec *M. bombycina*. Ceci prouve que *L. polyantha* permet une croissance supérieure chez les larves matures à celle obtenue avec *M. bombycina*. Cependant, les résultats obtenus pour le 4e âge, qui révèlent une augmentation moins prononcée chez le lot nourri avec *L. polyantha*, peuvent s'expliquer par les études de Velasco et Walter (1992) montrant qu'une espèce nourricière donnée pouvait favoriser la croissance d'un stade précis ou un aspect donné de la biologie des insectes. Ceci demande néanmoins des études plus poussées.

EVALUATION OF SALINE TOLERANCE IN MULBERRY VARIETIES BY EXPLOITING ROOTING POTENTIAL

S. SHAIK MOHAMED ANAS & M. VIVEKANANDAN

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

Nine mulberry varieties were taken for critical analysis of rooting performance in response to different concentrations of salinity (NaCl). The mulberry varieties used in the present study were TR₁₀, TR₄, Mysore local, MR₂, S₅₄, C₁, Kosen, M₅ and Ichinose. The mulberry cuttings were cultured using aqueous solutions containing different concentrations of NaCl (10 to 100 mM) whose EC values ranged from 2.7 to 9.5 mS/cm with a pH value of 7.0. Based on shoot and root tolerance indices, Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, S₅₄, Kosen and MR₂ varieties were found to be comparatively saline-tolerant. Sprouting was found to be more susceptible than rooting. Concentrations higher than 50 mM NaCl were found to be toxic to both rooting and sprouting in all the varieties. M₅, C₁ and Ichinose varieties were found to have low tolerance for salinity.

Keywords : Sodium chloride, shoot and root tolerance indices, rooting ability and sprouting, saline tolerance.

INTRODUCTION

Salinity is one of the major problems in agriculture, limiting plant growth and crop productivity in many parts of the world. Soluble salts beyond a critical limit adversely affect the early stages of plant development. Survival of plants under saline conditions depends on their ability to maintain a normal level of metabolic activities (Bernstein, 1975 ; Pasternak, 1985 ; Cheeseman, 1988). Root is the primary organ to be directly exposed to salinity and therefore, growth and mineral uptake of roots are immediately reduced and stopped altogether under severe salinity (Waisel, 1972 ; Weinburg *et al.*, 1984 ; Chauhan, 1987).

Mulberry is an important cash crop and is widely advocated for extensive cultivation in Tamil Nadu to boost silk production. Mulberry leaves form the chief food of the silkworm (*Bombyx mori*). Mulberry does not grow well under rainfed conditions and salinity. Although a lot of research is being done on recommendation of suitable mulberry varieties for rainfed conditions (Dorcus and Vivekanandan, 1991 ; Susheelamma, 1990), relatively little or no work has been done on salinity which deserves immediate concern (Raghunath *et al.*, 1992) for most of the agriculturally productive land has already been brought to use maximally and, moreover, the cultivable land is becoming saline day by day (Ponnamperuma, 1984). An estimated area of 33 % of irrigated land worldwide has been reported to be affected by salinity (Carter, 1975). There is a general consensus that the genetic potential of different cultivars should be exploited, as reclamation and drainage practices are generally considered to be a costly process towards economic utilization of salt-affected soils. Gene-transfer technology is also being advocated to improve quality of mulberry leaves under stress conditions, although the genetics of pure mulberry species is poorly understood (Gopinathan, 1992). Therefore, there is an impending necessity to cultivate mulberry even in saline soils by employing saline-tolerant mulberry varieties in the vast stretch of available coastal regions of our country to enable us to become one of the leading nations in silk production. Taking a cue from the ever-increasing salinity on

cultivable land and since reclamation of the land on a large scale is a cost-involving process, a few seemingly promising mulberry varieties have been employed in the present study. To evaluate comparative saline tolerance in mulberry variety to rooting, as roots are the immediate organ to be exposed to salinity, induction of rooting to NaCl salinity has been taken up in the present study. As many as 9 mulberry varieties including triploids were employed to find out the rooting potential to increasing concentrations of NaCl to select more promising varieties for plantation in saline soils to evaluate favourable agrobotanical characters and quality of leaves for cocoon production.

MATERIALS AND METHODS

To test the rooting ability of different mulberry varieties, a standard culture solution was prepared (Hewitt, 1966). The pH of the culture solution was adjusted to 7.0 to which different concentrations of NaCl (10 to 100 mM) (2.7 to 9.5 mS/cm) were added. The culture solution without NaCl served as the control. Cuttings of woody branches (25 per variety) of Tr₁₀, Tr₄, Kosen, Mysore local, M₅, MR₂, C₁, S₅₄ and Ichinose of 15 cm in length with 4 to 5 live buds were prepared and planted (Krishnaswamy, 1978) with the basal 'chisel' cut end dipped into the experimental solution in plastic trays (28 cm × 9 cm). The culture solution was changed at regular intervals. After the 35th day, the rooting performance of different mulberry cuttings was evaluated. The experiments were conducted during 1991-92 in the laboratory of School of Life Sciences (Sericulture), Bharathidasan University (Tiruchirapalli, Tamil Nadu, India), and the cuttings of mulberry were raised in hydroponics under white light intensity up to 600 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ with a maximum temperature of $32 \pm 1^\circ\text{C}$ and a relative humidity of about 60 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Data on the rooting percentage, number of roots, length of shoots and roots, number of sprouting leaves, root/shoot ratio, fresh and dry weight of shoots and roots of different mulberry varieties were recorded after 35 days of NaCl treatment and are shown in Tables I and II. The shoot and root tolerance indices are given in Table III. Nine mulberry varieties were examined so far in this study out of which a significant rooting performance (100 %) was observed in Tr₁₀ up to 50 mM NaCl. There was no rooting or sprouting at 100 mM NaCl in any of the varieties tested. Apart from Tr₁₀, Tr₄ also responded to 100 % rooting in 10 mM, 20 mM and 30 mM NaCl. Besides Tr₁₀ and Tr₄, Mysore local, Kosen and MR₂ showed moderate response to rooting. Our observations are further supported by similar findings in barley varieties by Alka *et al.* (1981) and *Triticum aestivum* by Beohar (1984). The effect of increasing concentrations of NaCl on shoot and root length of different mulberry varieties was also examined. Relative to the control, shoot and root length decreased in all varieties and at 50 and 100 mM NaCl a drastic reduction was observed. The observations of Azhar and McNeilly (1987) in *Sorghum bicolor* on a marked decrease in the length of root at 50 mM NaCl concentration lends further support to the present observation.

At low salinity (10 mM) there was no significant toxicity. Cornish (1984) observed that sodium salts supplied at low concentrations resulted in increased elongation of roots, which is similar to our observation as depicted in Table I. The average length of the root was either increased or similar to that of the control in varieties like Tr₁₀, Mysore local, Kosen, MR₂, M₅, S₅₄ and C₁ but was found to be affected by increasing concentrations of NaCl. The present finding also derives indirect support by the observation of Gyggenheim and Waisel (1972) on *Chloris gayana*, a halophytic forage grass, that root growth is positively affected by low levels of salinity and negatively by high salinity. Hassan Azaizah and Neumann (1990) reported salinity to affect maize root growth drastically. Similarly, weight of the root was either equal or higher than the values of the control in varieties of Tr₁₀, Tr₄, Kosen, MR₂, S₅₄ and C₁ at lower concentrations of NaCl (Table II). This is further supported by the observation of Sathiyamoorthy and Vivekanandan (1989) that the treatment of soybean seeds with NaCl at low concentrations increased plant growth and dry matter production. Waisel (1972) pointed out that Na⁺ and Cl⁻ have specific stimulatory effects on growth of several plant species.

Table I. Growth parameters of shoot and root in different mulberry varieties in relation to NaCl treatment.

Tableau I. Paramètres de croissances de la pousse et de la racine chez différentes variétés de mûrier après traitement au NaCl.

Mulberry varieties	Strength of NaCl (mM)	Rooting (%)	Average number of roots	Average number of sprouting leaves	Length of shoot Mean $\pm$ SD (cm)	Length of root Mean $\pm$ SD (cm)	Root/shoot ratio
<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Concentration en NaCl (mM)</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Nombre moyen de racines</i>	<i>Nombre moyen de bourgeons</i>	<i>Longueur de la pousse Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Longueur de la racine Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Rapport racine/pousse</i>
Tr ₁₀	0	100	16	9	16.3 $\pm$ 2.5	16.4 $\pm$ 2.6	1.01
	10	100	17	9	15.1 $\pm$ 2.0 (93)	18.5 $\pm$ 2.9 (113)	1.22
	20	100	12	7	13.1 $\pm$ 1.9 (80)	14.5 $\pm$ 1.6 (88)	1.11
	30	100	10	6	10.9 $\pm$ 1.1 (67)	13.5 $\pm$ 1.5 (82)	1.24
	50	100	10	5	2.2 $\pm$ 0.1 (13)	11.4 $\pm$ 1.3 (69)	5.18
	100	0	0	0	0	0	0
Tr ₄	0	100	17	16	19.0 $\pm$ 2.0	19.6 $\pm$ 2.4	1.03
	10	100	19	12	15.9 $\pm$ 1.9 (81)	17.9 $\pm$ 2.0 (91)	1.12
	20	100	16	10	13.8 $\pm$ 1.3 (73)	16.4 $\pm$ 2.1 (84)	1.19
	30	100	14	10	10.4 $\pm$ 1.0 (55)	15.3 $\pm$ 1.2 (78)	1.47
	50	75	13	10	6.6 $\pm$ 0.8 (31)	13.2 $\pm$ 1.3 (67)	2.20
	100	0	0	0	0	0	0
Mysore Local	0	100	12	14	9.0 $\pm$ 0.8	20.5 $\pm$ 2.8	2.50
	10	100	11	12	9.3 $\pm$ 0.6 (103)	25.5 $\pm$ 3.1 (125)	2.74
	20	75	11	11	8.7 $\pm$ 0.9 (97)	22.7 $\pm$ 2.9 (111)	2.61
	30	75	9	11	5.9 $\pm$ 0.2 (65)	21.3 $\pm$ 2.6 (104)	2.87
	50	50	7	5	5.6 $\pm$ 0.3 (62)	16.1 $\pm$ 2.0 (78)	3.61
	100	0	0	0	0	0	0

Continued / Suite page suivante

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

Mulberry varieties	Strength of NaCl (mM)	Rooting (%)	Average number of roots	Average number of sprouting leaves	Length of shoot Mean $\pm$ SD (cm)	Length of root Mean $\pm$ SD (cm)	Root/shoot ratio
<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Concentration en NaCl (mM)</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Nombre moyen de racines</i>	<i>Nombre moyen de bourgeons</i>	<i>Longueur de la pousse Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Longueur de la racine Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Rapport racine/pousse</i>
Kosen	0	75	19	26	11.1 $\pm$ 1.3	21.4 $\pm$ 2.7	1.93
	10	75	18	23	6.4 $\pm$ 0.2 (58)	57.4 $\pm$ 5.0 (268)	8.96
	20	75	14	16	6.3 $\pm$ 0.2 (57)	43.1 $\pm$ 5.2 (201)	6.84
	30	25	12	10	5.4 $\pm$ 0.5 (49)	38.9 $\pm$ 5.4 (182)	7.20
	50	25	6	9	3.5 $\pm$ 0.1 (14)	13.6 $\pm$ 1.4 (64)	9.07
	100	0	0	0	0	0	0
MR ₂	0	75	13	7	21.0 $\pm$ 3.0	25.0 $\pm$ 3.1	1.19
	10	50	4	9	5.3 $\pm$ 0.5 (25)	25.2 $\pm$ 3.0 (101)	4.75
	20	50	3	9	4.3 $\pm$ 0.3 (20)	19.5 $\pm$ 2.7 (78)	4.53
	30	50	2	7	3.8 $\pm$ 0.1 (18)	17.7 $\pm$ 2.0 (71)	4.43
	50	25	1	3	3.5 $\pm$ 0.1 (17)	15.5 $\pm$ 1.0 (62)	4.65
	100	0	0	0	0	0	0
M ₅	0	75	22	26	10.2 $\pm$ 1.8	23.1 $\pm$ 2.9	2.26
	10	75	15	22	8.5 $\pm$ 0.3 (83)	27.4 $\pm$ 3.2 (119)	3.22
	20	25	2	9	3.4 $\pm$ 0.1 (33)	10.5 $\pm$ 1.1 (45)	3.09
	30	25	2	7	2.4 $\pm$ 0.1 (23)	6.0 $\pm$ 0.5 (26)	2.50
	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0

Continued / *Suite page suivante*

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

Mulberry varieties	Strength of NaCl (mM)	Rooting (%)	Average number of roots	Average number of sprouting leaves	Length of shoot Mean $\pm$ SD (cm)	Length of root Mean $\pm$ SD (cm)	Root/shoot ratio
<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Concentration en NaCl (mM)</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Nombre moyen de racines</i>	<i>Nombre moyen de bourgeons</i>	<i>Longueur de la pousse Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Longueur de la racine Moyenne $\pm$ SD (cm)</i>	<i>Rapport racine/pousse</i>
S ₅₄	0	75	14	8	3.3 $\pm$ 0.2	48.6 $\pm$ 5.0	11.30
	10	50	10	7	6.9 $\pm$ 0.5 (209)	51.6 $\pm$ 4.8 (106)	7.48
	20	50	9	3	4.5 $\pm$ 0.8 (136)	36.1 $\pm$ 5.3 (74)	8.02
	30	25	7	3	2.4 $\pm$ 0.1 (73)	29.3 $\pm$ 3.1 (60)	12.21
	50	0	0	0	1.3 $\pm$ 0.1 (39)	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
C ₁	0	50	2	16	8.1 $\pm$ 0.5	23.7 $\pm$ 0.8	2.92
	10	25	3	19	8.9 $\pm$ 0.5 (110)	32.5 $\pm$ 4.1 (137)	3.65
	20	25	3	16	4.8 $\pm$ 0.3 (59)	27.2 $\pm$ 3.1 (115)	5.67
	30	25	3	10	3.9 $\pm$ 0.1 (48)	20.5 $\pm$ 2.7 (86)	5.25
	50	0	0	6	2.2 $\pm$ 0.1 (27)	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
Ichinose	0	25	3	19	9.5 $\pm$ 0.8	21.0 $\pm$ 3.5	2.21
	10	25	3	8	7.3 $\pm$ 0.5 (77)	8.5 $\pm$ 0.5 (40)	0.98
	20	25	2	8	3.9 $\pm$ 0.1 (41)	7.2 $\pm$ 0.5 (34)	2.18
	30	25	2	5	2.1 $\pm$ 0.1 (22)	5.8 $\pm$ 0.3 (28)	2.76
	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0

The data are the average of three different experiments with $\pm$ SD / *Les données constituent la moyenne $\pm$ écart type de trois expériences différentes.*
 Data in parentheses indicate % control values / *Les données entre parenthèses expriment le pourcentage par rapport aux valeurs témoins.*
 0 : No growth due to toxicity / *Aucune croissance en raison de la toxicité.*

Table II. Shoot and root biomass of different mulberry varieties in relation to NaCl treatment.

Tableau II. Biomasse des pousses et des racines de différentes variétés de mûrier après traitement au NaCl.

Mulberry varieties	Strength of NaCl (mM)	Weight of shoot (mg)		Weight of root (mg)		Root/shoot ratio
		Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight	
Variétés de mûrier	Concentration en NaCl (mM)	Poids des pousses (mg)		Poids des racines (mg)		Rapport racine/pousse
		Poids frais	Poids sec	Poids frais	Poids sec	
Tr ₁₀	0	3800 ± 20.5	520 ± 7.6	1300 ± 4.0	90 ± 4.0	0.17
	10	2835 ± 21.0 (75)	500 ± 8.9 (97)	1185 ± 4.1 (91)	90 ± 3.2 (100)	0.18
	20	2150 ± 20.7 (57)	470 ± 9.7 (90)	1100 ± 3.2 (85)	90 ± 4.1 (100)	0.19
	30	1700 ± 16.8 (45)	300 ± 7.1 (58)	1000 ± 3.5 (79)	70 ± 3.5 (78)	0.23
	50	800 ± 10.6 (21)	250 ± 6.0 (48)	770 ± 3.2 (59)	20 ± 1.4 (22)	0.08
	100	0	0	0	0	0
Tr ₄	0	4550 ± 20.2	800 ± 7.0	1970 ± 4.1	90 ± 4.1	0.11
	10	3500 ± 20.8 (77)	640 ± 8.9 (80)	1850 ± 2.0 (94)	100 ± 4.3 (111)	0.16
	20	2875 ± 20.4 (63)	490 ± 7.8 (61)	1800 ± 2.0 (91)	90 ± 3.6 (100)	0.18
	30	2600 ± 16.1 (57)	490 ± 7.0 (61)	1770 ± 3.2 (90)	70 ± 3.1 (78)	0.14
	50	1550 ± 16.0 (34)	200 ± 5.8 (25)	1150 ± 2.0 (58)	60 ± 2.0 (67)	0.30
	100	0	0	0	0	0
Mysore local	0	4100 ± 10.9	1000 ± 5.4	2250 ± 13.7	130 ± 3.3	0.13
	10	2100 ± 9.8 (51)	620 ± 5.3 (62)	950 ± 12.0 (42)	75 ± 2.9 (58)	0.12
	20	1900 ± 9.3 (46)	600 ± 5.2 (60)	925 ± 10.2 (41)	50 ± 4.1 (38)	0.08
	30	1600 ± 9.2 (39)	500 ± 5.1 (50)	850 ± 16.8 (38)	50 ± 3.0 (38)	0.10
	50	600 ± 10.9 (14)	150 ± 5.5 (15)	800 ± 10.7 (35)	20 ± 1.7 (15)	0.13
	100	0	0	0	0	0

Continued / Suite page suivante

Table II. Continued / *Tableau II. Suite*

Mulberry varieties <i>Variétés de mûrier</i>	Strength of NaCl (mM) <i>Concentration en NaCl (mM)</i>	Weight of shoot (mg)		Weight of root (mg)		Root/shoot ratio <i>Rapport racine/pousse</i>
		Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight	
		<i>Poids des pousses (mg)</i>		<i>Poids des racines (mg)</i>		
		<i>Poids frais</i>	<i>Poids sec</i>	<i>Poids frais</i>	<i>Poids sec</i>	
Kosen	0	3950 ± 10.5	1000 ± 5.3	2050 ± 10.4	100 ± 2.3	0.10
	10	2200 ± 8.2 (60)	620 ± 4.3 (62)	1900 ± 9.1 (93)	120 ± 2.3 (120)	0.19
	20	2025 ± 8.5 (48)	620 ± 5.6 (62)	1490 ± 9.1 (73)	80 ± 3.2 (80)	0.13
	30	1900 ± 11.4 (51)	590 ± 5.4 (59)	985 ± 6.0 (48)	70 ± 1.9 (70)	0.12
	50	1000 ± 10.5 (25)	280 ± 5.6 (28)	820 ± 11.6 (40)	50 ± 2.9 (50)	0.18
	100	0	0	0	0	0
MR ₂	0	2250 ± 17.3	350 ± 7.1	625 ± 14.4	40 ± 3.6	0.11
	10	1970 ± 14.0 (87)	300 ± 5.5 (86)	900 ± 21.8 (144)	80 ± 4.5 (200)	0.27
	20	1090 ± 11.0 (48)	220 ± 4.9 (63)	850 ± 20.6 (136)	60 ± 5.5 (120)	0.27
	30	850 ± 11.0 (38)	200 ± 3.8 (57)	570 ± 5.8 (91)	20 ± 4.5 (50)	0.10
	50	900 ± 17.3 (40)	170 ± 3.5 (48)	200 ± 14.1 (32)	20 ± 4.5 (50)	0.12
	100	0	0	0	0	0
M ₅	0	7600 ± 17.1	1000 ± 6.2	1800 ± 7.5	100 ± 1.8	0.10
	10	4570 ± 14.4 (60)	820 ± 6.1 (82)	950 ± 7.9 (53)	90 ± 2.4 (90)	0.11
	20	1250 ± 10.7 (16)	290 ± 5.1 (29)	250 ± 15.8 (14)	20 ± 4.5 (20)	0.07
	30	620 ± 7.2 (8)	120 ± 3.2 (12)	10 ± 3.2 (0.5)	0	0
	50	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0

Continued / *Suite page suivante*

Table II. Continued / *Tableau II. Suite*

Mulberry varieties	Strength of NaCl (mM)	Weight of shoot (mg)		Weight of root (mg)		Root/shoot ratio
		Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight	
<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Concentration en NaCl (mM)</i>	<i>Poids des pousses (mg)</i>		<i>Poids des racines (mg)</i>		<i>Rapport racine/pousse</i>
		<i>Poids frais</i>	<i>Poids sec</i>	<i>Poids frais</i>	<i>Poids sec</i>	
S ₅₄	0	1750 ± 11.6	350 ± 5.2	1200 ± 9.2	70 ± 2.2	0.20
	10	2070 ± 9.5 (118)	620 ± 5.2 (177)	1580 ± 12.5 (132)	70 ± 2.7 (100)	0.11
	20	1700 ± 11.4 (97)	500 ± 6.2 (143)	950 ± 7.5 (79)	70 ± 2.6 (100)	0.14
	30	1270 ± 8.6 (73)	190 ± 3.3 (54)	700 ± 13.2 (58)	20 ± 2.2 (29)	0.10
	50	200 ± 8.2 (11)	100 ± 5.8 (29)	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
C ₁	0	3600 ± 13.8	1000 ± 7.2	420 ± 3.1	40 ± 2.8	0.04
	10	4570 ± 16.1 (128)	820 ± 6.2 (82)	550 ± 13.5 (131)	50 ± 2.5 (125)	0.06
	20	2120 ± 14.6 (59)	600 ± 8.2 (60)	270 ± 16.4 (64)	20 ± 2.6 (50)	0.03
	30	2050 ± 15.0 (57)	300 ± 5.5 (30)	170 ± 11.5 (40)	20 ± 1.5 (50)	0.07
	50	900 ± 17.3 (25)	270 ± 6.7 (27)	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
Ichinose	0	3550 ± 13.7	800 ± 6.5	250 ± 4.0	30 ± 3.0	0.03
	10	1670 ± 14.4 (47)	300 ± 6.1 (37)	300 ± 18.7 (120)	20 ± 2.6 (67)	0.06
	20	1250 ± 12.5 (35)	170 ± 5.8 (21)	175 ± 13.2 (70)	20 ± 2.5 (67)	0.12
	30	950 ± 13.8 (27)	120 ± 3.9 (15)	150 ± 7.1 (60)	20 ± 2.2 (67)	0.17
	50	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0

The data are the average of three different experiments with ± SD / *Les données constituent la moyenne ± écart type de trois expériences différentes.*
 Data in parentheses indicate % control values / *Les données entre parenthèses expriment le pourcentage par rapport aux valeurs témoins.*
 0 : No growth due to toxicity / *Aucune croissance en raison de la toxicité.*

Table III. Shoot and root tolerance indices of different mulberry varieties in response to NaCl treatment.

Tableau III. Indices de tolérances des pousses et des racines chez différentes variétés de mûrier traitées au NaCl.

Mulberry varieties	Strength of NaCl 10 mM		20 mM		30 mM		50 mM		100 mM	
	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI
Variétés de mûrier	Concentration en NaCl 10 mM		20 mM		30 mM		50 mM		100 mM	
	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI	STI	RTI
Tr ₁₀	0.96 ± 0.08	1.0 ± 0.06	0.90 ± 0.09	1.0 ± 0.02	0.58 ± 0.04	0.78 ± 0.02	0.48 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0	0
Tr ₄	0.80 ± 0.07	1.1 ± 0.05	0.61 ± 0.02	1.0 ± 0.01	0.61 ± 0.08	0.78 ± 0.02	0.25 ± 0.07	0.68 ± 0.03	0	0
Mysore local	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.50 ± 0.07	0.38 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0	0
Kosen	0.62 ± 0.07	1.2 ± 0.02	0.62 ± 0.05	0.80 ± 0.01	0.59 ± 0.07	0.70 ± 0.02	0.28 ± 0.07	0.50 ± 0.04	0	0
MR ₂	0.86 ± 0.02	2.0 ± 0.04	0.63 ± 0.05	1.5 ± 0.09	0.57 ± 0.06	0.50 ± 0.08	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0	0
M ₅	0.82 ± 0.07	0.90 ± 0.05	0.29 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0	0	0	0	0
S ₅₄	1.8 ± 0.02	1.0 ± 0.03	1.4 ± 0.07	1.0 ± 0.03	0.54 ± 0.07	0.28 ± 0.05	0.28 ± 0.02	0	0	0
C ₁	0.82 ± 0.06	1.2 ± 0.02	0.60 ± 0.05	0.50 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.27 ± 0.08	0	0	0
Ichinose	0.37 ± 0.04	0.67 ± 0.09	0.21 ± 0.01	0.67 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.67 ± 0.08	0	0	0	0

STI : Shoot tolerance index / Indice de tolérance des pousses.

RTI : Root tolerance index / Indice de tolérance des racines.

The data are the average of three different experiments with ± SD / Les données constituent la moyenne ± écart type de trois expériences différentes.

0 : No growth due to toxicity / Aucune croissance en raison de la toxicité.

Root/shoot ratio increased steadily from 10 to 30 mM, compared to the control, indicating that shoot growth was more affected than root growth at increasing concentrations of NaCl (Table II). Mciri and Poljakoff-Mayber (1970) also made a similar observation of suppression of top growth rather than root in *Phaseolus vulgaris* due to salinity. Bogemans *et al.* (1990) reported a similar observation in barley that the reduction in shoot growth was most striking. From the data on the shoot and root tolerance indices (Table III), shoot was more susceptible than roots in all the varieties of mulberry at low salinity but at concentrations like 30 and 50 mM both the shoots and roots became susceptible. The observation of Lauter *et al.* (1981) in chickpea that growth inhibition by 50 mM NaCl and above was due to 'Cl' accumulation in shoot and root also supports our present observation. Higher concentrations of salinity have been reported to affect water transport in maize (*Zea mays* L.) (Hassan Azaizeh and Steudle, 1991). From the results on shoot and root tolerance indices, it is concluded that the five mulberry varieties, Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, Kosen and S₅₄, could be considered to have potential for salt tolerance. In C₁ and Ichinose, rooting was naturally poor.

It may be surmised from the present study that Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, S₅₄, Kosen and MR₂ varieties have the potential to grow in saline soils if the rooting ability is used as a marker for salt tolerance. The study also indicates that any concentration higher than 50 mM NaCl is toxic to rooting and sprouting in all mulberry varieties. It may be construed that M₅, C₁ and Ichinose varieties have low tolerance to salinity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance provided by the Central Silk Board (No. CSB/46/107(2)/90-91) (Bangalore) in carrying out the work is gratefully acknowledged. We wish to express our thanks to Mr R. Balasubramanian for typing of the manuscript.

REFERENCES

- ALKA S., KUMAR P., ARUNKUMA R., MASHISH S.N., SHAMSHERY A.P. (1981) Tolerance of some barley varieties to salt stress at seedling stage. *Indian J. Plant Physiol.*, 24, 304-321.
- AZHAR, McNIELLY T. (1987) Variability for salt tolerance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under hydroponic conditions. *J. Agron. Crop Sci.*, 159, 269-277.
- BEOHAR D.C. (1984) Tolerance to salt stress in wheat varieties. Paper presented in the National Seminar on Plant Physiology, Hissar, India.
- BERNSTEIN L. (1975) Effects of salinity and sodicity on plant growth. *Ann. Rev. Phys. Pathol.*, 13, 295-312.
- BOGEMANS J., STASSART J.M., NEIRINCKX L. (1990) Effect of NaCl stress on ion retranslocation in barley. *J. Plant Physiol.*, 135, 753-758.
- CARTER D.L. (1975) Problems of salinity in agriculture. In *Plants in saline environments*. A. Pojakoff-Mayber and J. Gale (eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 25-35.
- CHAUHAN Y.S. (1987) Screening for tolerance to salinity and water logging, case studies with pigeonpea and chickpea, pp. 93-103. In *Proc. Consultants' Workshop on Adaptation of Chickpea and Pigeonpea to Abiotic Stresses*. ICRISAT, 19-21, Dec. 1984, India.
- CHEESEMAN J.M. (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.*, 87, 547-550.
- CORNISH K. (1984) Calcium effects on *Puccinellia distans* plants of different salt tolerance. *Current Topics Plant Biochem. and Physiol.*, 3, 175.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. (1991) Screening of mulberry varieties for rainfed conditions. *Sericologia*, 31(1), 233-241.
- GOPINATHAN K.P. (1992) Biotechnology in sericulture. *Current Sci.*, 62, 283-287.
- GUGGENHEIM J., WAISEL Y. (1977) Effects of salinity, temperature and nitrogen fertilization on growth and composition of Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Plant soil*, 47, 431-440.
- HASSAN AZAIZEH, NEUMANN P.M., ZIDAN I. (1990) Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? *Plant Physiol.*, 93, 7-11.
- HASSAN AZAIZEH, STEUDLE E. (1991) Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol.*, 97, 1136-1145.

- HEWITT E.J. (1966) The composition of the nutrient solution, p. 1990. *In* Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal Bucks, England.
- KRISHNASWAMY S. (1978) Mulberry cultivation in South India. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, Bull. no. 1.
- LAUTER D.J., MUNNS D.N., CLARKIN K.L. (1981) Salt response of chickpea as influenced by N supply. *Agron. J.*, 73, 961-966.
- MEIRI A., POLJAKOFF-MAYBER A. (1970) Effects of various salinity regimes on growth, leaf expansion and transpiration rate of bean plants. *Soil Sci.*, 100, 26-34.
- PASTERNAK D., PIETRO S. (1985) Biosalinity in action: bioproduction with saline soil water. *Plant Soil*, 89, 403-413.
- PONNAMPERUMA F.N. (1984) Role of cultivar tolerance in increasing rice production on saline lands, pp. 255-271. *In* Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. Richard C. Staples & Gary H. Toenniessen (eds.). Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York.
- RAGHUNATH M.K., CHAKRABORTI S.P., NARAYAN P., SENGUPTA K. (1992) Sericulture industry in the saline belt. *Indian Silk*, 30(10), 46-47.
- SATHIYAMOORTHY P., VIVEKANANDAN M. (1989) Prevention of deterioration in seed viability and seedling vigour in soybean by chemo-hardening. *Tropical Grain Legume Bull.*, 36, 33-34.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., GIRIDHAR K., SENGUPTA K. (1990) Evaluation of germplasm genotypes for drought resistance in mulberry. *Sericologia*, 30(3), 327-341.
- WASEL Y. (1972) Biology of halophytes. Academic Press, New York.
- WEIMBURG R., LERNER H.R., POLJAKOFF-MAYBER A. (1984) Changes in growth and water-soluble solute concentration in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. *Physiol. Plant*, 62, 472-480.

EVALUATION DE LA TOLERANCE A LA SALINITE CHEZ CERTAINES VARIETES DE MURIERS PAR MESURE DU POTENTIEL DE RACINEMENT

S. SHAIK MOHAMED ANAS & M. VIVEKANANDAN

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University,
Tiruchurapalli - 620 024, Tamil Nadu, Inde.

Neuf variétés de mûriers ont été soumises à l'analyse critique de leur performance de racinement en fonction de différents degrés de salinité (NaCl). Les variétés de mûriers utilisées dans cette étude sont Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, MR₂, S₅₄, C₁, Kosen, M₅ et Ichinose. Les boutures de mûriers ont été cultivées dans des solutions aqueuses contenant du NaCl à différentes concentrations (10 à 100 mM) dont les valeurs EC varient de 2,7 à 9,5 mS/cm pour un pH de 7,0. Sur la base des indices de tolérance des racines et des pousses, les variétés Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, S₅₄, Kosen et MR₂ s'avèrent comparativement tolérantes à la salinité. Le bourgeonnement est plus sensible que le racinement. Les concentrations supérieures à 50 mM NaCl sont toxiques à la fois au racinement et au bourgeonnement chez toutes les variétés. Les variétés M₅, C₁ et Ichinose ont une faible tolérance à la salinité.

INTRODUCTION

La salinité est l'un des principaux problèmes rencontrés en agriculture car elle ralentit la croissance des végétaux et réduit la productivité des récoltes dans de nombreuses régions du globe. Les sels solubles, au-delà d'une limite critique, affectent les premiers stades de développement des végétaux. La survie des végétaux en milieu salin dépend de leur capacité à conserver un niveau normal pour leurs activités métaboliques (Bernstein, 1975 ; Pasternak, 1985 ; Cheeseman, 1988). La racine est le premier organe à être exposé directement à la salinité, la croissance des racines et l'ingestion de minéraux par celles-ci sont donc directement affectées par la salinité et complètement inhibées en milieu fortement salin (Waisel, 1972 ; Weimburg et coll., 1984 ; Chauhan, 1987).

Le mûrier est une plante d'intérêt commercial dont la culture extensive est vivement recommandée dans le Tamil Nadu pour améliorer la production de soie. Les feuilles de mûrier constituent la nourriture principale du ver à soie (*Bombyx mori*). Le mûrier pousse mal en régime pluvial et en milieu salin. Bien que de nombreuses études aient été faites sur la recherche de mûriers adaptés au régime pluvial (Dorcus et Vivekanandan, 1991 ; Susheelamma, 1990), relativement peu de travaux ont été réalisés sur la salinité, problème qu'il est urgent néanmoins d'aborder (Raghu Nath et coll., 1992), les terres productives étant déjà soumises à une utilisation maximale et leur salinité augmentant de jour en jour (Ponnamperuma, 1984). On estime qu'environ 33 % des terres irriguées dans le monde sont affectées par la salinité (Carter, 1975). Il est généralement admis que le potentiel génétique des différents cultivars devrait être exploité car les pratiques de défrichage et d'assèchement des sols sont généralement considérées comme des méthodes de lutte contre la salinité coûteuses, peu compatibles avec une utilisation rentable des sols. La technologie du transfert des gènes est également recommandée pour améliorer la qualité des feuilles de mûrier soumises à un stress, bien que la génétique des espèces de mûrier pures soit encore mal comprise (Gopinathan, 1992). Il est donc devenu inévitable de cultiver le mûrier même en milieu salin en employant différentes variétés de mûrier tolérant la salinité dans les diverses régions côtières de notre pays pour

que celui-ci devienne l'un des premiers producteurs de soie au niveau mondial. Compte tenu de la salinité croissante des terres cultivables et du coût élevé du défrichement à grande échelle, quelques variétés prometteuses ont été utilisées dans cette étude. Afin d'évaluer la tolérance comparative à la salinité de ces variétés de mûrier pour ce qui concerne le racinement – les racines étant le premier organe exposé à la salinité – l'induction du racinement après exposition à la salinité du NaCl a été réalisée dans cette étude. Neuf variétés de mûrier, dont des triploïdes, ont été utilisées pour déterminer leur potentiel de racinement après exposition à des concentrations croissantes de NaCl, sélectionner les variétés les plus adaptées à la plantation en milieu salin et évaluer les caractères agrobotaniques favorables et la qualité des feuilles destinées à la production de cocons.

MATERIELS ET METHODES

Une solution de culture standard a été préparée pour tester la capacité de racinement de différentes variétés de mûrier (Hewitt, 1966). On a ajouté différentes concentrations de NaCl (de 10 à 100 mM) (2,7 à 9,5 mS/cm) à une solution de culture dont le pH a été ajusté à 7,0. La solution de culture sans NaCl a servi de témoin. Des boutures ligneuses (25 par variété) des variétés Tr₁₀, Tr₄, Kosen, Mysore local, M₅, MR₂, C₁, S₅₄ et Ichinose de 15 cm de long et comportant 4 à 5 bourgeons vivants ont été préparées et plantées (Krishnaswamy, 1978) dans des pots en plastique (28 × 9 cm) en immergeant leur extrémité basale dans la solution expérimentale. La solution de culture a été changée à intervalles réguliers. Après 35 jours, la performance de racinement des différentes boutures de mûriers a été évaluée. Les expériences ont été réalisées de 1991 à 1992 dans le laboratoire de la School of Life Sciences (Sericulture), Bharathidasan University (Tiruchirapalli, Tamil Nadu, Inde). Les cultures hydroponiques des boutures ont été effectuées sous une luminosité allant jusqu'à 600 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pour une température maximale de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ et une humidité relative d'environ 60 %.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant le pourcentage de racinement, le nombre de racines, la longueur des pousses et des racines, le nombre de bourgeons, le rapport pousse/racine, les poids secs et frais des pousses et des racines de différentes variétés de mûrier ont été enregistrées après 35 jours de traitement au NaCl et sont présentées dans les tableaux I et II. Les indices de tolérance des pousses et des racines sont donnés dans le tableau III. Neuf variétés de mûrier ont été examinées dans cette étude : parmi celles-ci, une performance de racinement significative (100 %) a été observée chez Tr₁₀ jusqu'à 50 mM NaCl. On n'observe aucun racinement ni bourgeonnement après traitement à 100 mM NaCl chez aucune des variétés testées. Outre Tr₁₀ et Tr₄, Mysore local, Kosen et MR₂ présentent une réaction modérée pour ce qui concerne le racinement. Nos observations sont corroborées par des résultats similaires obtenus chez des variétés d'orge par Alka et coll. (1981) et chez *Triticum aestivum* par Beohar (1984). On a également étudié l'effet du NaCl à des concentrations croissantes sur la longueur des pousses et des racines de différentes variétés de mûrier. La longueur des pousses et des racines est plus faible chez toutes les variétés par rapport au témoin et on constate une réduction prononcée après traitement à 50 mM et 100 mM NaCl. La diminution marquée de la longueur de la racine après traitement avec du NaCl concentré à 50 mM observée par Azhar et McNeilly (1987) chez *Sorghum bicolor* permet de confirmer les observations présentées ici.

Une faible salinité (10 mM) ne donne aucune toxicité. Cornish (1984) a observé que l'addition de sels de sodium à faibles concentrations entraînait une augmentation de l'allongement des racines, observation qui est comparable à celle présentée dans le tableau I. La longueur moyenne des racines augmente ou est identique à celles des témoins chez les variétés Tr₁₀, Mysore local, Kosen, MR₂, M₅, S₅₄ et C₁ mais est affectée par des concentrations croissantes de NaCl. Ces résultats sont également indirectement confirmés par ceux de Gygenheim et Waisel (1972), chez *Chloris gayana*, une herbe fourragère halophyte, qui ont observé que la croissance de la racine était affectée de manière positive par une faible salinité et de manière négative par une salinité élevée. Hassan Azaizah et Neumann (1990) ont démontré que la salinité affectait fortement la croissance des racines de maïs. De même, le poids de la racine est soit égal, soit supérieur à celui du témoin chez les variétés Tr₁₀.

Tr₄, Kosen, MR₂, S₅₄ et C₁ à faibles concentrations de NaCl (Tableau II). Ceci est corroboré par les résultats de Sathiyamoorthy et Vivekanandan (1989) qui ont observé que le traitement des grains de soja avec du NaCl faiblement concentré entraînait une augmentation de la croissance du plant et de la production de matière sèche. Waisel (1972) a démontré que le Na⁺ et le Cl⁻ avaient des effets stimulants spécifiques sur la croissance de plusieurs espèces de végétaux.

Le rapport racine/pousse augmente de manière régulière de 10 à 30 mM par rapport au témoin, ce qui indique que la croissance des pousses est plus affectée que la croissance des racines par des augmentations croissantes de NaCl (Tableau II). Meiri et Poljakoff-Mayber (1970) ont également observé un arrêt de la croissance de la masse supérieure plutôt que des racines chez *Phaesus vulgaris* après exposition à la salinité. Bogemans et coll. (1990) ont obtenu des résultats similaires chez l'orge, avec une réduction tout à fait marquée de la croissance des pousses. D'après les données concernant les indices de tolérance des pousses et des racines (Tableau III), les pousses sont plus sensibles que les racines chez toutes les variétés de mûrier exposées à une faible salinité mais dans des concentrations de 30 et 50 mM, les racines et les pousses sont sensibles de manière égale. Les résultats de Lauter et coll. (1981), qui ont observé que l'inhibition de la croissance après exposition à des concentrations supérieures ou égales à 50 mM NaCl, chez le pois chiche, était due à l'accumulation de Cl dans les pousses et dans les racines, confirment également nos observations. Des concentrations élevées de salinité affectent le transport de l'eau chez le maïs (*Zea mays* L.) (Hassan Azaizch et Steudle, 1991). On peut conclure, sur la base des indices de tolérance des pousses et des racines, que cinq variétés de mûrier, Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, Kosen et S₅₄, ont un potentiel de tolérance à la salinité. Chez C₁ et Ichinose, le racinement est naturellement médiocre.

Sur la base des résultats présentés ici, on peut supposer que les variétés Tr₁₀, Tr₄, Mysore local, S₅₄, Kosen et MR₂ ont le potentiel nécessaire à la culture en milieu salin si l'on prend la capacité de racinement comme indice de la tolérance au sel. Cette étude démontre en outre que toute concentration au-delà de 50 mM est toxique au racinement et au bourgeonnement chez toutes les variétés de mûrier. On peut également en conclure que les variétés M₅, C₁ et Ichinose ont une faible tolérance à la salinité.

EFFECT OF ZINC AND NICKEL ON THE LARVAL AND COCOON CHARACTERS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* (L.)

P. CHAMUNDESWARI & K. RADHAKRISHNAIAH*

Department of Zoology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, A.P., India.

No significant change was observed in the percentage of hatching of disease-free layings (DFLs) of the silkworm, *Bombyx mori*, on dipping them for an hour at blue egg stage either in 20 ppm zinc chloride or 20 ppm nickel chloride. This suggests that both these metal concentrations are not toxic to the embryo. After hatching, when the larvae were fed with zinc- or nickel-sprayed mulberry leaves (1 mg/10 g wet wt.) once in each instar up to the fourth and once at alternate days in the fifth, the fresh and dry weights of the larva and silk gland, cocoon length, width and weight, shell weight, cocoon-shell ratio and filament length and weight increased, relative to normal. The larval duration also decreased. All these changes, however, were more significant in the worms fed with zinc-sprayed leaves. The results indicate that zinc and nickel act as supplements to stimulate the silk synthesis, of these the role of zinc is more prominent.

Keywords : *Bombyx mori*, mulberry, zinc, nickel, larval character, cocoon characters.

INTRODUCTION

It is well known that the cocoon crop of the silkworm, *B. mori*, depends on the developmental vigor of its breeds, which in turn is further influenced by the quality of leaf fed to the worm (Venugopal Pillai *et al.*, 1987). The raw silk production per hectare of land is about 52 kg in China, 40 kg in Japan and just 14 kg in India (Bajpeyi *et al.*, 1991). The low productivity is mainly attributed to low mulberry yield and poor quality of leaf. Thus it appears that to boost up silk production some supplements are essential to the silkworm, along with its feed. A variety of sugars, proteins, amino acids, lipids, hormones, vitamins, etc., have been tried as supplements by a number of investigators to increase the quantity of silk (Nagarajan and Radha, 1990; Masilamani *et al.*, 1991; Bajpeyi *et al.*, 1991), however these are mostly expensive. A few attempts on supplementation of inorganic chemical compounds with the mulberry leaves have also been reported. Supplementation of cobalt has been found to increase the larval weight, shell and effective rate of rearing (ERR) (Narasimha Murthy and Govindappa, 1988), also calcium, magnesium and iron when added to mulberry leaves increased the rearing rate and silk content in the cocoon (Bajpeyi *et al.*, 1991). It is known that zinc is an essential element, the deficiency of which retards growth in rats and mice as it functions in several enzyme systems, notably the respiratory enzyme carbonic anhydrase. The deficiency of nickel also causes impaired nucleic acid synthesis (Maynard, 1984). As both zinc and nickel have a structural role in the growth process, in the present study an attempt is made to observe the effect of these metals on certain larval and cocoon characters of the silkworm, *B. mori*, by supplementing them with mulberry leaves.

* To whom correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Disease-free layings (DFLs) of the silkworm, *Bombyx mori*, PM × NB4D₂, were dipped separately in 20 ppm concentration of zinc chloride and nickel chloride, three in each, for a period of one hour at blue egg stage and were allowed to hatch. Three DFLs without dipping in any of these solutions served as controls. The percentage of hatching was calculated both in control DFLs and metal-exposed. After hatching, the three groups of worms, one exposed to zinc, another exposed to nickel and the third control, were reared by feeding them four times a day with M₅ or Kanva 2 mulberry leaves as described by Krishnaswami (1986). During rearing, the first group was fed with leaves containing 1 mg of zinc/10 g wet wt. (sprayed with 1 ml of water) once on the first day of each instar starting from the first to the fourth and once on every alternate day in the fifth instar. Similarly, the second group was fed with leaves containing 1 mg nickel/10 g wet wt., and the third group with leaves without any of these supplements. The completion of larval duration (in hours) was noted down in all the three groups. A random of 30 silkworms from each group were taken on the last day of the fifth instar, and their fresh and dry (after keeping the worms in an oven at 80 °C for 24 hours) weights were measured in an electrical balance. Likewise, the fresh and dry weights of the silk gland were taken. The rest of the worms were allowed to spin the cocoons, and a random of 30 cocoons from each group were taken and their length and width were measured with the help of vernier callipers. Further, the total cocoon and shell weights were taken separately, and using these weights the cocoon-shell ratio was calculated by the formula :

$$\frac{\text{Shell weight}}{\text{Cocoon weight}} \times 100$$

Finally, the length of the single cocoon filament was measured with the help of an eprouvette, and its weight was taken using an electrical balance. The data were statistically compared with mean, standard deviation and Student's 't' test.

RESULTS AND DISCUSSION

The data presented in Table I show no significant ($P > 0.05$) difference in the percentage of hatching among the control and the zinc- and nickel-exposed DFLs, however, it was a little more in the experimental batches than in the control. This indicates that both metals at 20 ppm concentration are not toxic to the silkworm embryos, and at the same time they enhance the percentage of hatching, though insignificantly. After hatching, a significant ($P < 0.001$) increase was observed, relative to controls, in the fresh and dry weights of the matured larvae with mulberry leaves supplemented with either metal, zinc or nickel. However, between these two metals, the effect of zinc was greater than that of nickel. These results suggest that zinc and nickel in minute quantities trigger the protein synthetic ability of the worm. This is also evident from the significant ($P < 0.05$) increase in the fresh and dry weights of the silk gland. Thus Kanva 2 mulberry might be less in minerals such as zinc and nickel which are responsible for the promotion of silk synthesis. Zinc is also useful in enhancing the energetic efficiency of the worm, as it is a co-factor in the activity of carbonic anhydrase (Maynard, 1984). The increased energy levels could be utilized for protein synthesis. A similar role can be attributed even to nickel, as it also elevated the silk synthesis. Further, the duration of the larval period significantly ($P < 0.05$) decreased in the worms fed with zinc and insignificantly ($P > 0.05$) in those fed with nickel-containing leaves. This could be due to their increased protein synthetic ability, thereby the maturation of the worms is attained much earlier than in the controls.

From Table II it is seen that the cocoon characters are providing enough support on the role of zinc and nickel in the promotion of silk synthesis. The length, width and weight of the cocoons, also the weight of the shell and the cocoon-shell ratio significantly ($P < 0.05$) increased in the harvested worms fed with metal-supplemented leaves, particularly zinc. These findings indicate the role played by zinc, also nickel, in the enhancement of silk production. The filament length and weight also increased significantly ($P < 0.05$), which adds support to the increased shell weight thereby the silk synthesis. Thus, the results on the whole indicate that zinc in minute quantities supplemented to

Table I. The larval characters of the silkworm, *B. mori*, fed with Kanva 2 mulberry supplemented with zinc and nickel.

Tableau I. Caractères larvaires du ver à soie *B. mori* nourri avec des feuilles de mûrier Kanva 2 enrichies en zinc et en nickel.

Parameter Paramètre	Control Témoin	Zinc Zinc	Nickel Nickel
Hatching / Ecllosion (%)	92.4 ± 1.7	96.3 ± 2.4*	94.5 ± 1.9*
Fresh weight of the larva / Poids frais de la larve (g)	2.748 ± 0.027	3.862 ± 0.084	3.401 ± 0.502
Dry weight of the larva / Poids sec de la larve (g)	0.760 ± 0.010	1.050 ± 0.038	0.832 ± 0.017
Fresh weight of silk gland (g) Poids frais de la glande séricigène (g)	0.723 ± 0.010	1.244 ± 0.015	1.036 ± 0.014
Dry weight of silk gland (g) Poids sec de la glande séricigène (g)	0.343 ± 0.011	0.589 ± 0.009	0.530 ± 0.012
Larval duration (hrs) / Durée larvaire (h)	648 ± 5.3	612 ± 2.8	636 ± 3.6*

±: Standard deviation / Ecart type.

P: Level of significance / Seuil de signification.

The differences between control and experimental batches are statistically significant ($P < 0.05$) / Les différences entre les lots témoins et expérimentaux sont statistiquement significatives ($P < 0.05$).

* Not significant over the control ($P > 0.05$) / Non significatif par rapport au témoin ($P > 0.05$).

Table II. Cocoon characters of the silkworm, *B. mori*, fed with Kanva 2 mulberry supplemented with zinc and nickel.

Tableau II. Caractères du cocon chez le ver à soie *B. mori* nourri avec des feuilles de mûrier Kanva 2 enrichies en zinc et en nickel.

Parameter Paramètre	Control Témoin	Zinc Zinc	Nickel Nickel
Cocoon length / Longueur du cocon (mm)	34.35 ± 0.44	40.23 ± 0.30	36.03 ± 0.35*
Cocoon width / Largeur du cocon (mm)	17.16 ± 0.29	21.47 ± 0.34	19.03 ± 0.24*
Cocoon weight / Poids du cocon (g)	1.584 ± 0.069	2.063 ± 0.049	1.813 ± 0.053
Shell weight / Poids de la coque (g)	0.258 ± 0.006	0.366 ± 0.006	0.331 ± 0.015
Cocoon-shell ratio / Richesse soyeuse (%)	16.56 ± 0.42	20.51 ± 0.28	19.88 ± 0.06
Filament length / Longueur de la bave (m)	533.8 ± 7.4	755.3 ± 4.6	721 ± 2.6
Filament weight / Poids de la bave (mg)	217.5 ± 4.6	250.8 ± 3.8	232.3 ± 4.9*

±: Standard deviation / Ecart type.

P: Level of significance / Seuil de signification.

The differences between control and experimental batches are statistically significant ($P < 0.05$) / Les différences entre les lots témoins et expérimentaux sont statistiquement significatives ($P < 0.05$).

* Not significant over the control ($P > 0.05$) / Non significatif par rapport au témoin ($P > 0.05$).

Kanva 2 mulberry promotes the silk production in *B. mori*, and so does nickel. However, the role of nickel is less significant than that of zinc.

REFERENCES

- BAJPEYI C.M., SINGH R.N., THANGAVELU K. (1991) Supplementary nutrients to increase silk production. *Indian Silk*, 30(7), 41-42.
- KRISHNASWAMI S. (1986) New technology of silkworm rearing. Bull. no. 2, Central Sericultural Research and Training Inst., Central Silk Board, Mysore, pp. 16-20.
- MASILAMANI S., SUBRAMANIAM R.K., CHIKKANNA, NOAMANI M.K.R. (1991) The role of secondary metabolites of mulberry leaf in silkworm feeding. *Indian Silk*, 30(1), 44-46.
- MAYNARD L.A., LOOSLI J.K., HINTZ H.F., WARNER R.G. (1984) The inorganic elements and their metabolism, pp. 202-210. In "Animal nutrition". Tata McGraw Hill Publishing Co.
- NAGARAJAN P., RADHA N.V. (1990) Supplementation of amino acids through mulberry leaf for increased silk production. *Indian Silk*, 29(4), 21-22.
- NARASIMHA MURTHY C.V., GOVINDAPPA S. (1988) Effect of cobalt on silkworm growth and cocoon crop performance. *Indian J. Seric.*, 27(1), 45-47.
- VENUGOPALA PILLAI S., KRISHNASWAMI S., KASIVISWANATHAN K. (1987) Growth studies in silkworm, *Bombyx mori* (L.), under tropical conditions. II. Influence of agronomical methods of mulberry on the growth, cocoon crop and fecundity of silkworm. *Indian J. Seric.*, 26(1), 32-45.

EFFET DU ZINC ET DU NICKEL SUR LES CARACTERES DE LA LARVE ET DU COCON CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* (L.)

P. CHAMUNDESWARI & K. RADHAKRISHNAIAH

Department of Zoology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, A.P., Inde.

*Aucune modification significative n'a été observée quant au pourcentage d'éclosion des pontes saines du ver à soie *Bombyx mori* immergées pendant une heure au stade oeuf bleu soit dans 20 ppm de chlorure de zinc, soit dans 20 ppm de chlorure de nickel. Ceci suggère que ces deux métaux à ces concentrations ne sont pas toxiques pour l'embryon. Après éclosion, le nourrissage des larves une fois par âge jusqu'au 4e âge et tous les deux jours au 5e âge avec des feuilles de mûrier vaporisées de zinc ou de nickel (1 mg/10 g poids frais) entraîne une augmentation par rapport à la normale des poids sec et frais de la larve et de la glande séricigène, de la longueur, de la largeur et du poids du cocon, du poids de la coque, de la richesse soyeuse et du poids et la longueur de la bave. La durée larvaire diminue. Cependant, ces diverses modifications sont plus significatives chez les larves nourries avec des feuilles traitées avec du zinc. Les résultats obtenus indiquent que le zinc et le nickel peuvent servir de compléments pour stimuler la synthèse de soie et que le zinc a une action plus marquée.*

INTRODUCTION

On sait que la récolte de cocons du ver à soie *B. mori* dépend la vigueur du développement de ses élevages, celle-ci étant influencée par la qualité des feuilles données aux larves (Venugopal Pillai et coll., 1987). La production de soie grège pour un hectare de terre est d'environ 52 kg en Chine, de 40 kg au Japon et de seulement 14 kg en Inde (Bajpeyi et coll., 1991). Ce manque de productivité est principalement attribué au faible rendement des mûriers et à la qualité médiocre des feuilles. Il apparaît donc que pour augmenter la production de soie, il est nécessaire d'enrichir la nourriture du ver à soie avec certains compléments. L'effet complémentaire de nombreux sucres, protéines, acides aminés, lipides, hormones, vitamines, etc., sur l'augmentation de la quantité de soie a été étudié par un certain nombre de chercheurs (Nagarajan et Radha, 1990 ; Masilamani et coll., 1991 ; Bajpeyi et coll., 1991) ; cependant, ces substances sont souvent onéreuses. Quelques études sur l'addition de composés chimiques inorganiques sur les feuilles de mûrier ont également été réalisées. L'addition de cobalt permet d'augmenter le poids larvaire, le poids de la coque et le taux effectif d'élevage (Narasimha Murthy et Govindappa, 1988) ; l'addition de calcium, le magnésium et le fer sur les feuilles de mûrier se traduit également par une augmentation du taux d'élevage et de la richesse soyeuse du cocon (Bajpeyi et coll., 1991). On sait que le zinc est un élément essentiel et que le manque de zinc retarde la croissance chez le rat et la souris car il agit dans plusieurs systèmes enzymatiques, notamment l'anhydrase carbonique, une enzyme respiratoire. Le manque de nickel provoque une détérioration de la synthèse des acides nucléiques (Maynard, 1984). Le zinc et le nickel ayant un rôle structurel dans le processus de croissance, cette étude a été réalisée afin d'observer leur effet sur certains caractères de la larve et du cocon du ver à soie *B. mori* en les incorporant à des feuilles de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines du ver à soie *Bombyx mori*, PM × NB₄D₂, ont été immergées individuellement dans des solutions de chlorure de zinc et de chlorure de nickel à 20 ppm, trois pontes pour chaque solution, pendant une heure au stade oeuf bleu et ont été mises à éclore. Trois pontes saines non immergées dans ces solutions ont servi de témoin. Le pourcentage d'éclosion a été calculé chez les

pontes saines témoins et chez les pontes saines exposées aux métaux. Après éclosion, les trois groupes de larves, l'un traité au zinc, le deuxième traité au nickel et le troisième servant de témoin, ont été nourris quatre fois par jour avec des feuilles de mûrier Kanva 2 ou M₅, selon la méthode de Krishnaswami (1986). Pendant l'élevage, le premier groupe a été nourri avec des feuilles contenant 1 mg de zinc/10 g poids frais (vaporisées avec 1 ml d'eau) une fois par âge (le premier jour) jusqu'au quatrième âge et une fois tous les deux jours au cinquième âge. Les larves du deuxième groupe ont été nourries de la même façon avec des feuilles contenant 1 mg nickel/10 g poids frais et le troisième groupe avec des feuilles non traitées. La durée de la période larvaire (en heures) a été relevée pour chacun des trois groupes. Trente vers à soie ont été prélevés au hasard au dernier jour du cinquième âge et leurs poids frais et sec (après passage au four à 80 °C pendant 24 heures) ont été mesurés sur une balance électrique. Les poids sec et frais de la glande séricigène ont été enregistrés selon la même méthode. Les vers à soie restants ont été mis à filer et 30 cocons dans chacun des groupes ont été prélevés au hasard et leur longueur et leur largeur ont été mesurées à l'aide d'une jauge micrométrique. De plus, les poids totaux du cocon et de la coque ont été enregistrés individuellement et utilisés pour déterminer la richesse soyeuse selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Poids de la coque}}{\text{Poids du cocon}} \times 100$$

Enfin, la longueur d'une bave de cocon a été mesurée à l'aide d'une règle graduée et le poids de la bave a été enregistré sur une balance électrique. Les données ont été comparées statistiquement avec la moyenne, l'écart type et le test "t" de Student.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le tableau I ne révèlent aucune différence significative ($P > 0,05$) du pourcentage d'éclosion entre les pontes témoins et les pontes traitées au zinc et au nickel ; cependant, il est légèrement plus élevé pour les lots expérimentaux que pour le témoin. Ceci indique que les deux métaux à la concentration de 20 ppm ne sont pas toxiques pour les embryons du ver à soie et, également, qu'ils donnent une augmentation, bien que non significative, du pourcentage d'éclosion. Après éclosion, on observe une augmentation significative ($P < 0,001$) par rapport au témoin des poids sec et frais des larves matures nourries avec des feuilles traitées, quel que soit le métal. Cependant, entre les deux métaux, l'effet du zinc est plus marqué que celui du nickel. Ces résultats suggèrent que le zinc et le nickel en quantités infimes améliorent la capacité de synthèse des protéines chez la larve. Ceci est également démontré par l'augmentation significative ($P < 0,05$) des poids secs et frais de la glande séricigène. Il est donc possible que la variété de mûrier Kanva 2 contienne moins de minéraux comme le zinc et le nickel, qui sont responsables de la promotion de la synthèse de soie. Le zinc permet également d'améliorer l'efficacité énergétique de la larve car c'est un facteur qui contribue à l'activité de l'anhydrase carbonique (Maynard, 1984). L'augmentation des niveaux d'énergie pourrait favoriser la synthèse des protéines. On peut attribuer un rôle similaire au nickel car il entraîne également une augmentation de la synthèse de soie. De plus, la durée de la période larvaire diminue de manière significative ($P < 0,05$) chez les larves traitées avec du zinc et de manière non significative ($P > 0,05$) chez celles nourries avec des feuilles contenant du nickel. Ceci pourrait être dû à l'augmentation de leur capacité de synthèse des protéines, la maturité étant atteinte beaucoup plus tôt chez les larves traitées que chez les témoins.

Comme le montre le tableau II, l'effet sur les caractères du cocon permet d'affirmer que le zinc et le nickel jouent un rôle dans la synthèse de soie. La longueur, la largeur et le poids des cocons ainsi que le poids de la coque et la richesse soyeuse augmentent de manière significative ($P < 0,05$) chez les larves nourries avec des feuilles enrichies en métaux, et particulièrement en zinc. Ces résultats permettent de mettre en évidence le rôle joué par le zinc et le nickel sur l'augmentation de production de soie. La longueur et le poids de la bave augmentent également de manière significative ($P < 0,05$), confirmant ainsi l'augmentation du poids de la coque et, par conséquent, de la synthèse de soie. Dans leur ensemble, les résultats indiquent que l'addition de zinc et le nickel en quantités infimes à des feuilles de mûrier Kanva 2 favorise la production de soie chez *B. mori* bien que le rôle du nickel soit moins significatif que celui du zinc.

GENETIC ANALYSIS OF SEED TECHNOLOGICAL TRAITS BY DIALLEL CROSS IN THE ERI SILKWORM, *SAMIA* *CYNTHIA RICINI* BOISDUVAL

M. NAGARAJA & R. GOVINDAN

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065,
India.

A genetic analysis was carried out for seed technological traits, namely, rate of pupation, pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatching in 5 × 5 diallel cross of the eri silkworm, Samia cynthia ricini, by component analysis using strains White Plain, White Zebra, Green Plain, Green Semi-Zebra and Green Zebra and their 20 F₁ hybrids. Additive gene action operated for rate of pupation while a non-additive one was observed for pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatching.

Keywords : Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, genetic analysis, diallel cross, seed technological characters.

INTRODUCTION

Knowledge on the nature of gene action and the number of genes controlling the expression of quantitative traits is of paramount importance to the breeder to have a sound breeding programme. Since the quantitative traits are governed by polygenes, their inheritance is complex in nature. Hence, these are to be studied by the application of sophisticated biometrical methods. The diallel technique is one such method which has been used for genetic analysis in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Krishnaswami *et al.*, 1964 ; Sengupta *et al.*, 1974 ; Gamo and Hirabayashi, 1983). The available literature revealed that genetic analysis of quantitative traits in the eri silkworm has not been attempted so far. Therefore, the present investigations were undertaken to elucidate the same in the eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval, and the results are brought forth in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Five inbred lines of the eri silkworm, *S.c. ricini*, namely, White Plain (WP), White Zebra (WZ), Green Plain (GP), Green Semi-Zebra (GS) and Green Zebra (GZ), were crossed in a 5 × 5 diallel fashion to obtain 20 F₁ hybrids. All the 20 combinations along with the five parents were reared simultaneously under controlled room temperature of 21.4 °C as per Krishnaswami (1978). Each entry was replicated three times. In each replication 150 worms were brushed. Observations were recorded on the rate of pupation, pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatching of eggs. Three layings were used for counting the total number of eggs laid by an individual female moth to determine fecundity. The hatching percentage was calculated by the number of eggs hatched to the total number of eggs. In *per se* performance, lines and hybrids with shorter pupal duration were considered top for this trait, while for other characters those with higher values were considered as top performers. The analysis of variance was carried out as per the methods of Panse and Sukhatme (1961). Genetic components of variance in the broader and more inclusive way were carried out by the methods of Jinks and Hayman (1953) and Hayman (1954a, 1954b) and inferences were drawn.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the investigation are discussed below.

The data on the *per se* performance of parental breeds and F₁ hybrids in respect of seed technological traits are furnished in Table I. Hybrids GP × WP, GS × WP and WP × GP ; GP × GS, WP × GP and GP × WP ; WP × WZ, WP × GP, WP × GS and GZ × GS ; WP × WZ, GS × WZ, GS × WP, GZ × GS, WP × GS and GS × GP ; WZ × GP, GP × GZ, GS × GP, WZ × WP and WP × GP ; and GP × GS, GP × GZ and GS × WP were top performers for rate of pupation, pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatching, respectively.

Table I. *Per se* performance of pure breeds and their hybrids of eri silkworm for seed technological traits.

Tableau I. Performance per se des souches pures et de leurs hybrides pour les caractères technologiques du grainage chez le ver à soie eri.

Strains/ crosses	Rate of pupation (%)	Weight of 10 pupae (g)	Pupal duration (h)	Moth emergence (%)	Fecundity/ moth (No.)	Hatching (%)
<i>Souches/ croisements</i>	<i>Taux de nymphe (%)</i>	<i>Poids de 10 chrysalides (g)</i>	<i>Durée nympheale (h)</i>	<i>Emergence des papillons (%)</i>	<i>Fécondité/ papillon (Nombre)</i>	<i>Eclosion (%)</i>
WP	92.33	21.961	476.33	89.00	342.33	93.00
WZ	87.00	20.189	476.67	88.00	420.00	91.00
GP	91.67	21.490	480.33	93.33	434.33	100.00
GS	89.67	19.904	480.33	89.00	361.00	93.33
GZ	87.33	19.348	496.67	82.33	349.33	91.67
WP × WZ	84.33	19.685	456.67	95.33	363.67	89.67
WP × GP	85.67	22.456	470.67	91.67	377.67	94.67
WP × GS	83.33	21.880	472.67	92.67	374.67	94.33
WP × GZ	83.00	20.236	477.67	86.67	327.67	92.67
WZ × GP	81.33	21.865	475.67	91.33	430.33	90.33
WZ × GS	78.00	20.085	477.67	89.00	364.33	94.00
WZ × GZ	76.00	18.987	501.67	87.00	324.67	85.67
GP × GS	85.67	22.622	480.33	86.67	308.67	97.00
GP × GZ	84.33	22.361	501.33	89.00	397.00	96.67
GS × GZ	82.33	21.772	480.33	89.00	337.67	95.33
WZ × WP	79.67	20.495	478.67	81.67	379.33	82.33
GP × WP	86.67	22.255	574.67	93.33	318.61	92.67
GP × WZ	82.67	21.776	483.60	91.33	361.67	90.33
GS × WP	86.33	20.695	480.33	94.67	375.67	90.33
GS × WZ	82.33	21.955	481.34	89.67	282.00	93.67
GS × GP	84.67	21.911	527.67	92.64	381.00	89.00
GZ × WP	80.33	21.171	501.67	82.33	341.62	96.00
GZ × WZ	77.00	19.014	480.67	75.67	344.00	93.33
GZ × GP	82.33	19.728	480.00	92.00	332.33	87.33
GZ × GS	82.67	21.271	473.67	93.67	343.67	91.67

Rate of pupation :

The additive component D was highly significant and three times more than that of H_1 in magnitude, indicating the additive gene action to be more important in the inheritance of this trait (Table II). The $(H_1/D)^{1/2}$ ratio which was less than unity indicated the operation of partial dominance. $H_2/4H_1$ being less than 0.25 and H_1-H_2 being not equal to zero, the unequal distribution of positive and negative genes in parents was evident. The KD/KR value was less than unity and F was negative, indicating an excess of recessive genes in the parents. The value of h^2/H_2 was 0.53, revealing the involvement of at least one group of genes controlling this trait. As per Gamo and Hirabayashi (1983), additive gene action, overdominance and five to six effective factors were involved in this trait in *B. mori*.

Table II. Estimates of genetic components and their proportions for seed technological traits of the eri silkworm.

Tableau II. Estimations des composants génétiques et de leur proportion pour les caractères technologiques liés au grainage chez le ver à soie eri.

Genetic parameter	Rate of pupation	Pupal weight	Pupal duration	Moth emergence	Fecundity	Hatching
<i>Paramètres génétiques</i>	<i>Taux de nymphose</i>	<i>Poids pupal</i>	<i>Durée pupale</i>	<i>Emergence des papillons</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Éclosion</i>
D	19.04**	0.04	17.43	1.92	1304.6	1.77
F	-0.79	-0.43	-2.38	7.56	934.13	-0.23
H_1	6.99*	1.36	302.08	46.86	5090.87	25.09
H_2	5.16	0.99	245.55	35.27	4490.31	19.99
h^2	2.73	1.28*	1.51	20.78	281.57	9.55
E	0.42	0.18	0.092	1.16	13.74	0.54
$(H_1/D)^{1/2}$	0.60	5.97	4.16	4.94	1.97	3.76
$(H_2/4H_1)$	0.18	0.18	0.20	0.19	0.22	0.22
KD/KR	0.93	0.03	0.97	1.33	1.44	0.96
h^2/H_2	0.53	1.29	0.006	0.59	0.06	0.48
H_1-H_2	1.83	0.37	56.500	11.59	500.60	5.10
$r(Wr + Vr)Yr$	0.25	0.80**	-0.50*	0.52*	0.71**	-0.21
Heritability in the narrow sense (%)	66.30	1.50	54.00	4.18	23.65	6.05
<i>Héritabilité au sens strict (%)</i>						

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

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

Pupal weight :

The dominant components H_1 and H_2 were more in magnitude than D, which suggested dominant gene action to be more important. Even this was confirmed by a very low heritability of 1.50 per cent. The value of $(H_1/D)^{1/2}$ indicated overdominance. The $H_2/4H_1$ and H_1-H_2 revealed symmetrical distribution of positive and negative genes amongst parents. The value of KD/KR and negative F value indicated that there were more recessive genes than dominant genes. At least one to two groups of effective factors were involved for this trait (Table II). However, Satenahalli *et al.*

(1990) reported non-additive gene action for this character along with three to four effective factors in *B. mori*. Correlation between Y_r , the parental measurement, and $W_r + V_r$, the order of dominance, was positively significant, indicating the dominance to be in the opposite direction.

Pupal duration :

Dominant gene action was predominant and heritability was moderate (Table II). Overdominance was indicated by $(H_1/D)^{1/2}$. Positive and negative alleles were distributed asymmetrically. The value of KD/KR and negative F value suggested that the parents had more recessive genes than dominant genes. The h^2/H_2 value revealed the effective factors to be negligible for this trait. But Satenahalli *et al.* (1990) encountered additive gene action. The negative and significant correlation between Y_r and $W_r + V_r$ suggested the operation of dominant genes in opposite direction.

Moth emergence :

The component analysis revealed the importance of dominant gene action over the additive one. The value of $(H_1/D)^{1/2}$ revealed overdominance. The KD/KR and F values showed a greater proportion of dominant genes (Table II). Distribution of positive and negative alleles was asymmetrical. At least one group of genes control this trait. The correlation between Y_r and $W_r + V_r$ was positive and significant, indicating dominance to be in a desirable direction.

Fecundity :

Dominant gene action and low heritability were observed for this character (Table II). But Satenahalli *et al.* (1990) observed additive gene action as well as non-additive gene action, overdominance and three groups of genes controlling this character in *B. mori*.

The value of $(H_1/D)^{1/2}$ revealed overdominance (Table II). The KD/KR and F values revealed more dominant genes and at least one group of genes governing this trait. The $H_2/4H_1$ and H_1-H_2 values revealed an asymmetrical distribution of positive and negative alleles among parents. The positive and significant correlation between Y_r and $W_r + V_r$ indicated dominant genes resulting in increased fecundity.

Hatching :

Dominant components H_1 and H_2 were more than the additive component in magnitude, indicating the importance of dominance for this trait. However, the low heritability estimate indicated both additive and dominant genes to be important for this trait.

The value of $(H_1/D)^{1/2}$ revealed overdominance. Overdominance was observed in *B. mori* too (Satenahalli *et al.*, 1990 ; Krishnaswami *et al.*, 1964 ; Jolly *et al.*, 1969). The KD/KR value and negative F value revealed predominance of recessive genes. The distribution of genes was asymmetrical. The h^2/H_2 value indicated the presence of at least one group of genes governing this character. At least four effective factors were observed for hatching in *B. mori* (Satenahalli *et al.*, 1990).

Hence it is inferred that the rate of pupation in the eri silkworm can be improved by adopting a selection procedure while the other traits, viz., pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatching can be improved by means of heterosis breeding. Attempts made to understand the nature of gene actions and inheritance of quantitative traits in *S.c. ricini* appear to be a little as per the available literature and thus the current study is a new contribution to eri silkworm genetics as it forms an essential prerequisite knowledge for improving eri silkworm strains.

REFERENCES

- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan J. Breed., 33, 178-190.
 HAYMAN B.I. (1954a) The analysis of variance of diallel tables. Biometrics, 10, 235-244.
 HAYMAN B.I. (1954b) The theory and analysis of diallel crosses. Genetics, 39, 789-809.

- JINKS J.L., HAYMAN B.I. (1953) The analysis of diallel crosses. Maize Genetics Cooper. Newsletter, 27, 48-54.
- JOLLY M.S., SUBBA RAO S., KRISHNASWAMI S. (1965) Effect of genetic diversity on hybrid performance in multivoltine Indian silkworm. Indian J. Seric., 4, 9-12.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bull. no. 2, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, p. 23.
- KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., SUBBA RAO S. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races of silkworm. Indian J. Genet. Breed., 24, 213-222.
- PANSE V.G., SUKHATME P.V. (1961) Statistical methods for agricultural workers. ICAR, New Delhi, p. 361.
- SATENAHALLI S.B., GOVINDAN R., GOUD J.V. (1989) Genetic analysis of some quantitative traits by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 29(3), 333-342.
- SENGUPTA K., YUSUF M.R., GROVER S.P. (1974) Hybrid vigour and genetic analysis of quantitative traits in silkworm. Indian J. Genet., 34A, 249-256.

ANALYSE GENETIQUE DES CARACTERES TECHNOLOGIQUES DE LA PRODUCTION D'OEUF CHEZ LE VER A SOIE ERI *SAMIA CYNTHIA RICINI* BOISDUVAL

M. NAGARAJA & R. GOVINDAN

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065, Inde.

*Une analyse génétique des caractères technologiques du grainage, à savoir : le taux de nymphose, le poids de la chrysalide, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion, a été réalisée par croisement diallélique 5 × 5 chez le ver à soie eri, *Samia cynthia ricini*. L'analyse des composants a été effectuée chez les souches White Plain, White Zebra, Green Plain, Green Semi-Zebra et Green Zebra et chez les 20 hybrides F₁ correspondants. Cette analyse démontre l'action de gènes additifs pour le taux de nymphose et de gènes non additifs pour le poids de la chrysalide, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion.*

INTRODUCTION

La connaissance de la nature de l'action des gènes et du nombre de gènes gouvernant l'expression des caractères quantitatifs est d'importance capitale pour l'éleveur souhaitant disposer d'un programme de sélection fiable. Les caractères quantitatifs étant gouvernés par plusieurs gènes, leur transmission est de nature complexe et leur étude nécessite l'application de méthodes biométriques sophistiquées. La technique diallélique constitue l'une de ces méthodes et a été utilisée pour l'analyse génétique du ver à soie *Bombyx mori* L. (Krishnaswami et coll., 1964 ; Sengupta et coll., 1974 ; Gamo et Hirabayashi, 1983). La documentation disponible révèle que l'analyse génétique des caractères quantitatifs chez le ver à soie eri n'a pas encore été réalisée. Cette étude a été entreprise afin de combler cette lacune.

MATERIELS ET METHODES

Cinq lignées consanguines du ver à soie eri *Samia cynthia ricini*, soit White Plain (WP), White Zebra (WZ), Green Plain (GP), Green Semi-Zebra (GS) et Green Zebra (GZ), ont été croisées afin d'obtenir 20 hybrides F₁. Les 20 combinaisons ainsi que leurs parents ont été élevés simultanément à une température ambiante fixée à 21,4 °C selon la méthode de Krishnaswami (1978). Chaque combinaison a été répliquée trois fois. Cent cinquante larves ont été levées dans chaque réplicat. Les observations portent sur le taux de nymphose, le poids de la chrysalide, le poids nymphal, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion des oeufs. Trois pontes ont été utilisées pour compter le nombre total d'oeufs pondus par une femelle afin de déterminer la fécondité. Pour la performance *per se*, les lignées et les hybrides présentant une durée nymphale plus courte sont considérés comme supérieurs pour ce caractère, tandis que pour tous les autres caractères, les larves présentant les valeurs les plus élevées sont considérées comme supérieures. L'analyse de variance a été réalisée selon les méthodes de Panse et Sukhatme (1961). Les composants génétiques de la variance au sens large et au sens strict ont été déterminés selon les méthodes de Jinks et Hayman (1953) et Hayman (1954a, 1954b).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur la performance *per se* des souches parentales et des hybrides F₁ pour ce qui concerne les caractères technologiques du grainage sont présentées dans le tableau I. Les hybrides GP × WP, GS × WP et WP × GP puis GP × GS, WP × GP et GP × WP, WP × WZ, WP × GP, WP × GS et GZ × GS puis WP × WZ, GS × WZ, GS × WP, GZ × GS, WP × GS et GS × GP puis WZ × GP, GP × GS, GS × GP, WZ × WP et WP × GP puis GP × GS, GP × GZ et GS × WP sont supérieurs respectivement pour le taux de nymphose, le poids de la chrysalide, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion.

Taux de nymphose :

Le composant additif D est fortement significatif et trois fois plus élevé que H₁, ce qui indique que l'action des gènes additifs est plus importante pour la transmission de ce caractère (Tableau II). Le rapport (H₁/D), qui représente moins d'une unité, indique un phénomène de dominance partielle. H₂/4H₁ étant inférieur à 0,25 et H₁-H₂ n'étant pas égal à zéro, il est évident que la répartition des gènes négatifs et positifs est inégale chez les parents. La valeur KD/KR est inférieure à une unité et F est négatif, ce qui indique un excédent de gènes récessifs chez les parents. La valeur de h²/H₂ est de 0,53, révélant l'implication d'au moins un groupe de gènes gouvernant ce caractère. D'après Gamo et Hirabayashi (1983), l'action des gènes additifs, la superdominance et cinq à six facteurs effectifs sont impliqués dans ce caractère chez *B. mori*.

Poids nymphal :

Les composants dominants H₁ et H₂ sont supérieurs à D, ce qui suggère que l'action des gènes dominants est plus importante. Cela est même confirmé par une très faible héritabilité de 1,50 %. La valeur de (H₁/D) indique une superdominance. Les valeurs H₂/4H₁ et H₁-H₂ font apparaître une répartition symétrique des gènes positifs et négatifs entre les parents. La valeur de KD/KR et la valeur négative de F indiquent qu'il y a davantage de gènes récessifs que de gènes dominants. Au moins un ou deux groupes de facteurs sont impliqués pour ce caractère (Tableau II). Cependant, Satenahalli et coll. (1990) ont observé l'action d'un gène non additif pour ce caractère ainsi que celle de trois ou quatre facteurs effectifs chez *B. mori*. La corrélation entre Yr, la mesure parentale, et Wr + Vr, ordre de dominance, est positive et significative, ce qui indique que la dominance est dans la direction opposée.

Durée nymphale :

L'action des gènes dominants est supérieure et l'héritabilité modérée (Tableau II). La superdominance est indiquée par (H₁/D). Les allèles positifs et négatifs sont répartis de manière asymétrique. La valeur de KD/KR et celle, négative, de F suggèrent que les parents ont davantage de gènes récessifs que de gènes dominants. La valeur h²/H₂ révèle que les facteurs effectifs sont négligeables pour ce caractère. Cependant, Satenahalli et coll. (1990) ont observé l'action de gènes additifs. La corrélation négative et significative entre Yr et Wr + Vr suggère l'implication de gènes dominants dans la direction opposée.

Emergence des papillons :

L'analyse des composants révèle l'importance de l'action des gènes dominants par rapport aux gènes additifs. La valeur de (H₁/D)^{1/2} fait apparaître une superdominance. Les valeurs KD/KR et F indiquent une plus grande proportion de gènes dominants (Tableau II). La répartition des allèles négatifs et positifs est asymétrique. Au moins un groupe de gènes gouverne ce caractère. La corrélation entre Yr et Wr + Vr est positive et significative, ce qui suggère que la dominance se fait dans la direction voulue.

Fécondité :

On observe une action des gènes dominants et une faible héritabilité pour ce caractère (Tableau II). Cependant, Satenahalli et coll. (1990) ont observé une action des gènes tant additifs que non additifs, une superdominance et trois groupes de gènes gouvernant ce caractère chez *B. mori*.

La valeur de $(H_1/D)^{1/2}$ révèle une superdominance (Tableau II). Les valeurs KD/KR et F font apparaître un plus grand nombre de gènes dominants et au moins un groupe de gènes gouvernant ce caractère. Les valeurs $H_2/4H_1$ et H_1-H_2 révèlent une répartition asymétrique des allèles négatifs et positifs entre les parents. La corrélation positive et significative entre Y_r et $W_r + V_r$ indique la présence de gènes dominants entraînant une augmentation de la fécondité.

Éclosion :

Les composants dominants H_1 et H_2 ont une magnitude plus grande que les composants additifs, ce qui suggère l'importance de la dominance pour ce caractère. Cependant, la faible héritabilité estimée indique que les gènes additifs et dominants sont importants pour ce caractère.

La valeur de $(H_1/D)^{1/2}$ révèle une superdominance. La superdominance a également été observée chez *B. mori* (Satenahalli et coll., 1990 ; Krishnaswami et coll., 1964 ; Jolly et coll., 1969). La valeur KD/KR et la valeur négative de F révèlent une prédominance des gènes récessifs. La répartition des gènes est asymétrique. La valeur h^2/H_2 indique la présence d'au moins un groupe de gènes gouvernant ce caractère. Au moins quatre facteurs effectifs ont été observés pour l'éclosion chez *B. mori* (Satenahalli et coll., 1990).

On en conclut donc que le taux de nymphose chez le ver à soie eri peut être amélioré par l'adoption d'un procédé de sélection tandis que les autres caractères, c'est-à-dire le poids nymphal, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion, peuvent être améliorés par les croisements hétérotiques. Les études réalisées afin de comprendre la nature des actions géniques et de l'héritabilité des caractères quantitatifs chez *S.c. ricini* semblent corroborer la documentation existante. Cette étude constitue donc une première contribution à la génétique du ver à soie eri car elle comporte des informations essentielles à l'amélioration des souches de cette espèce.

CLONAL PROPAGATION OF *MORUS ALBA* L. CV S₁ FROM NODAL EXPLANTS OF MATURE TREES : MAINTENANCE OF PROLIFERATING CULTURES

R. ISLAM¹, O.L. JOARDER¹, M. HOSSAIN¹, A. ZAMAN² & A.C. BARMAN²

1. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi, Bangladesh.

2. Bangladesh Sericulture Research Institute, Rajshahi, Bangladesh.

A micropropagation method of mulberry (Morus alba L. cv S₁) has been developed using nodal explants of mature trees. Multiple shoots were proliferated in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). The stock cultures were transferred to a fresh medium after each batch of microcutting harvest and in this way stock cultures were kept for continuous shoot production. By repeated subculture a large number of shoots was built up with a shoot multiplication rate of 2-3 fold per subculture. Shoots from the initial culture and those from subsequent subcultures were rooted in half strength MS medium containing 0.1 mg l⁻¹ 3-indole butyric acid (IBA). With the increase in the number of subcultures, the frequency of microcuttings produced shoots and number of roots per cutting increased considerably. The regenerants were successfully established in soil under natural environments.

Keywords : Mulberry, micropropagation, stock culture.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* sp.) is a woody tree of great economic importance in the sericulture industry because its foliage is used by silkworms. Some species of mulberry are grown for their edible fruits and useful timber (Patel *et al.*, 1983). Since cross pollination is the rule rather than an exception, enormous heterozygosity occurs in the plant (Das, 1981). Conventionally mulberry is propagated by cutting but certain genotypes with high nutritive value are difficult to root (Jain *et al.*, 1990). The emerging application of the tissue culture technology to clonal propagation provides an alternative to the routine vegetative propagation of woody species. Using this method, a million-fold increase per year in the rate of clonal multiplication over conventional methods is possible (Murashige, 1974). Propagation of mulberry through *in vitro* organ culture has been reported in Japan (Oka and Ohyama, 1981), India (Yadav *et al.*, 1990) and Bangladesh (Hossain *et al.*, 1990, 1991). This paper describes a micropropagation method of mulberry (*Morus alba* cv S₁) which can assist in building up the clonal stock of elite genotypes by enabling rapid multiplication.

MATERIALS AND METHODS

Nodal segments with a single axillary bud were collected from a 15-year-old tree of *Morus alba* cv S₁ and surface-disinfected with HgCl₂ (0.1 % w/v) for 10 minutes, followed by 5-6 rinses in sterile distilled water. The explants were cultured singly in 150 × 25 mm culture tubes on an agar-solidified medium for initial establishment. After 5 weeks shoots from the initial culture were harvested for root induction and the stock culture was subcultured to fresh medium. At every time during subculturing, care was taken to remove any dead or discoloured tissue. An MS medium (Murashige and Skoog,

1962) with full strength salts and 3 % sucrose was used for shoot proliferation and MS with half strength salts and 1.5 % sucrose was used for adventitious root formation. The medium pH was adjusted to 5.8 prior to autoclave and solidified with 0.7 % Difco Bacto-agar. All cultures were grown at 26 ± 1 °C under a 16 h photoperiod with a light intensity of about 1000 lux provided by warm white fluorescent tubes.

For transfer to the soil, the *in vitro* regenerated plantlets were removed from the culture tubes, washed thoroughly to remove the nutrient medium and transplanted into small polybags with 1:1 non-sterile garden soil and compost. During the initial period of transfer, plantlets were kept in culture room conditions and high humidity was maintained by covering the plantlets with polybags.

RESULTS AND DISCUSSION

Nodal explants from field-grown mature plants were cultured on MS medium supplemented with 2 mg l⁻¹ BAP alone, as this concentration yielded the maximum shoot multiplication rate in previous experiments (Hossain *et al.*, 1990, 1991). In this medium, the explants showed their first response by enlarging and bursting of axillary buds. Within the first week of culture, 40-50 % explants exhibited bud breaking and within 3-4 weeks about 90 % explants produced proliferating shoot cultures. The shoots showed vigorous growth, had short internodes and deep green thick leaves. A primary explant could produce a maximum of 8 usable shoots after 8 weeks of culture initiation. Such shoots were excised and used as cuttings for rooting. After harvesting of shoots the clumps of shoots that formed were maintained for eight consecutive passages (5 weeks each). At the end of each passage usable shoots (2-3 cm in length) were excised and used as microcuttings to be rooted. The remaining part of the shoot cultures was transferred to a fresh medium after removing the dead and necrotic leaves. It was observed that the number of microcuttings produced per culture, length of microcuttings and quality rating increased gradually up to the 7th subculture then declined. If cultures were maintained beyond 8-9 passages they produced spindly and chlorotic shoots with less developed leaves which reduced the total microcutting yield. At this stage spindly and chlorotic shoots were cut back, tips were removed and placed horizontally on the surface of the fresh medium and new clumps of shoots were regenerated. These could be maintained in a similar way for 6-7 passages. No change was observed in this cyclical method for shoot production till the proliferating cultures were maintained.

The results indicate that an adult tree of mulberry could be propagated by shoot proliferation *in vitro*. Explants were induced to form axillary shoots on a BAP-enriched medium and stock cultures could be maintained by repeated subculturing at 5-6 weeks' interval with an average multiplication rate of 2-3-fold per subculture (Fig. 1A and 1B). Induction of multiple shoots from nodal explants of mulberry in a BAP-containing medium has been reported earlier (Ohyama and Oka, 1987; Hossain *et al.*, 1990, 1991). Shoots of the initial cultures developed vigorously and had adult characteristics, which mostly disappeared during subsequent subcultures.

Microcuttings from initial cultures and those from subsequent subcultures were rooted in 0.1 mg l⁻¹ IBA (Fig. 1C). With the increase in the number of subcultures, the frequency of rooting and number of roots per cutting increased considerably (Table I). However, no significant variation was observed in the root length. Variation in rooting response among the shoots taken from different subcultures has also been reported in apple cultivars (Zimmerman and Broome, 1981; Sriskandarajah *et al.*, 1982). Regenerated plantlets were transferred to soil mixed with compost (Fig. 1D). Transplantation success was 85 %.

Twenty-four plants were grown in the field and they were 100-120 cm tall within 6 months. Since preliminary observations on various morphological characters, such as leaf shape, petiole length, area of leaf lamina and internode distance, did not show any significant variation as compared to the conventionally grown (from cutting of mother plant) plants, it indicates the varietal multiplication (micropropagation) is true to type.

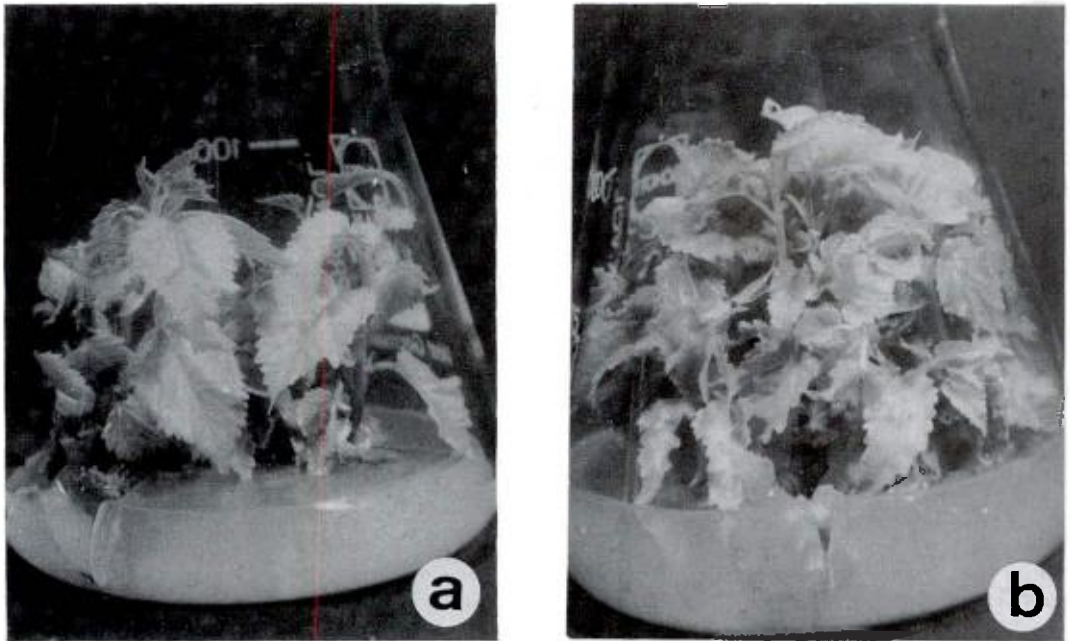


Fig. 1 : Clonal propagation of *Morus alba* from nodal explants.

A, B : Proliferating shoot clumps originated from stock cultures and 3rd and 5th subcultures, respectively.

C : Induction of adventitious roots on a microcutting taken from 3rd subculture after 3 weeks in the rooting medium.

D : A transferred plantlet after 5 weeks of transfer.

Fig. 1 : Propagation par clonage de *Morus alba* à partir d'explants nodaux.

A, B : Prolifération de cépées issues de cultures stocks et des 3e et 5e sous-cultures, respectivement.

C : Induction de racines adventives sur une microbouture prélevée sur la 3e sous-culture après 3 semaines en milieu de racinement.

D : Plantule transplantée 5 semaines après la transplantation.

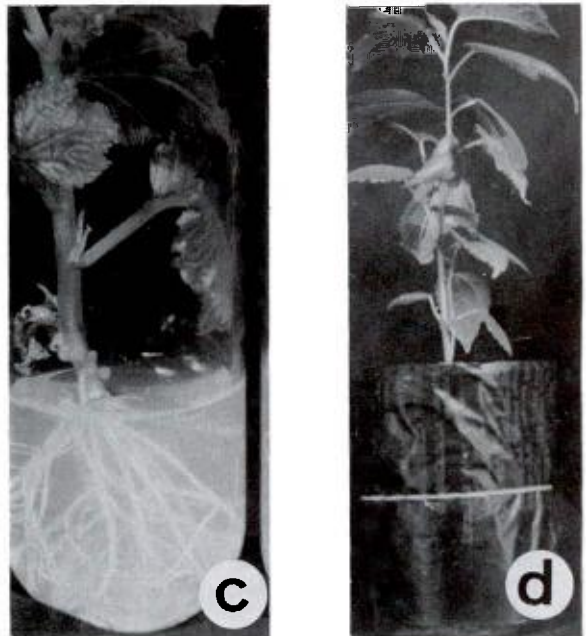


Table I. Induction of roots on shoots obtained from different subcultures.

Tableau I. Induction de racines sur des pousses issues de sous-cultures différentes.

Source of microcutting	Frequency of rooting (%)	Number of roots per cutting	Root length (cm)
<i>Source de la microbouture</i>	<i>Fréquence de racinement (%)</i>	<i>Nombre de racines par bouture</i>	<i>Longueur des racines (cm)</i>
Shoots from initial culture <i>Pousses de culture initiale</i>	43.26 ^a	5.6 ^a	4.56 ^a
Shoots from 1st subculture <i>Pousses de la 1ère sous-culture</i>	70.57 ^b	7.23 ^b	4.27 ^a
Shoots from 3rd subculture <i>Pousses de la 3e sous-culture</i>	79.12 ^c	9.56 ^b	5.16 ^a
Shoots from 5th subculture <i>Pousses de la 5e sous-culture</i>	88.77 ^d	13.20 ^c	5.07 ^a

The data were recorded after 5 weeks in rooting media. Each value is an average of 3 replications and each replication consisted of 5 culture tubes.

Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$) according to Duncan's multiple range test.

Les données ont été relevées après 5 semaines en milieux de racinement. Chaque valeur est la moyenne de 3 réplicats, chaque réplicat comportant 5 tubes de culture.

Les moyennes de colonnes suivies de la même lettre ne diffèrent pas de manière significative ($P = 0,05$) d'après le test de Duncan.

CONCLUSION

From the foregoing results and discussion, it can be concluded that large-scale clonal propagation of a desirable clone of mulberry from one nodal explant by continuous subculturing of stock cultures is possible.

REFERENCES

- DAS D.C. (1981) Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. National Seminar on Silk Research and Development, March 10-13, Bangalore, India.
- HOSSAIN M., RAHMAN M., JOARDER O.I. (1990) *In vitro* propagation of mulberry from axillary bud culture. Rajshahi Univ. St. (B), 18, 73-81.
- HOSSAIN M., RAHMAN M., ZAMAN A., JOARDER O.I. (1991) Effect of nature of explant and pH on *in vitro* propagation of some mulberry genotypes. Bull. Sericult. Res., 12, 13-22.
- JAIN A.K., DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Reports, 8, 737-740.
- MURASHIGE T. (1974) Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 135-166.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15, 473-497.
- OKA S., OHYAMA K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Canadian J. Bot., 59, 68-74.

- OHYAMA K., OKA S. (1987) Mulberry, 272-284. *In* Cell and Tissue Culture in Forestry, J.N. Bonga, D.J. Durjan eds., Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- PATEL G.K., BAPAT V.A. TAO P.S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. *Z. Pflanzphysiol.*, 111, 465-468.
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M.G., NAIR Y. (1982) Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci. Lett.*, 24, 1-9.
- YADAV U., MADAN L., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Hort.*, 44, 61-67.
- ZIMMERMAN R.H., BROOME O.C. (1981) Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 106, 648-652.

MULTIPLICATION CLONALE DE *MORUS ALBA* L. CV S₁ A PARTIR D'EXPLANTS NODAUX D'ARBRES MATURES : MAINTIEN DE CULTURES EN MULTIPLICATION

R. ISLAM¹, O.I. JOARDER¹, M. HOSSAIN¹, A. ZAMAN² & A.C. BARMAN²

1. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi, Bangladesh.

2. Bangladesh Sericulture Research Institute, Rajshahi, Bangladesh.

*Une méthode de micropropagation du mûrier (*Morus alba* L. cv S₁) a été élaborée à partir d'explants nodaux d'arbres matures. Des pousses multiples ont été multipliées dans un milieu MS (Murashige et Skoog) additionné de 2 mg/l de 6-benzylaminopurine (BAP). Les cultures-mères ont été transférées dans un nouveau milieu après récolte de chaque lot de microboutures pour obtenir une production ininterrompue de pousses. Un grand nombre de pousses a été obtenu par sous-cultures répétées à raison d'un taux de multiplication des pousses de 2 à 3 par sous-culture. Les pousses de la culture initiale et celles des sous-cultures suivantes ont été mises à raciner dans un milieu MS dilué à 50 % contenant 0,1 mg/l acide 3-indol-butyrique (AIB). L'augmentation de la fréquence des racines produites par les microboutures et le nombre de racines par bouture est proportionnelle à l'augmentation du nombre de sous-cultures. On est parvenu à implanter les régénérants dans la terre en milieu naturel.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* sp.) est un arbre ligneux de forte valeur économique dans l'industrie séricicole car ses feuilles sont utilisées par le ver à soie. Certaines espèces de mûrier sont cultivées pour leurs fruits et leur bois de coupe (Patel et coll., 1983). La pollinisation croisée étant la forme de pollinisation la plus courante, le mûrier présente une très forte hétérozygotie (Das, 1981). Traditionnellement, le mûrier est reproduit par bouturage mais certains génotypes à forte valeur nutritive sont difficiles à raciner (Jain et coll., 1990). L'application récente de la technologie de la culture tissulaire à la multiplication clonale offre une alternative à la propagation végétative normalement utilisée pour les espèces ligneuses. Par cette méthode, il est possible de multiplier par un million le taux de multiplication clonale par rapport aux méthodes conventionnelles (Murashige, 1974). La reproduction du mûrier par la culture d'organes *in vitro* a été réalisée au Japon (Oka et Ohyama, 1981), en Inde (Yadav et coll., 1990) et au Bangladesh (Hossain et coll., 1990, 1991). Cet article présente une méthode de microreproduction du mûrier (*Morus alba* cv S₁) qui peut aider à former des stocks de clones de génotypes supérieurs en accélérant la reproduction.

MATERIELS ET METHODES

Des segments nodaux comportant un seul bourgeon axillaire ont été prélevés sur un arbre de *Morus alba* cv S₁ âgé de 15 ans et ont été désinfectés en surface avec du HgCl₂ (0,1 % p/v) pendant 10 minutes et rincés séparément 5 à 6 fois dans de l'eau distillée stérile. Pour l'établissement initial, les explants ont été cultivés individuellement dans un tube de culture de 150 × 25 mm sur un milieu solidifié d'agar. Après 5 semaines, les pousses issues de la culture initiale ont été récoltées pour permettre l'induction des racines et la culture-mère a été sous-cultivée dans un nouveau milieu. A

chaque fois, on a pris soin d'éliminer des sous-cultures les tissus morts ou décolorés. Un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) composé de sels à 100 % et de sucrose à 3 % a été utilisé pour la propagation des pousses et un milieu MS comportant des sels à 50 % et du sucrose à 1,5 % a été utilisé pour la formation des racines adventives. Le pH du milieu a été ajusté à 5,8 avant la mise en autoclave et solidifié avec du Difco Bacto-agar à 0,7 %. Toutes les cultures ont été réalisées à 26 ± 1 °C sous photopériode de 16 h et luminosité d'environ 1000 lux maintenue à l'aide de néons fluorescents chauds.

Pour le transfert dans la terre, les plantules régénérées *in vitro* ont été prélevées dans les tubes de cultures, lavées entièrement afin d'éliminer le milieu nutritif et transplantées dans de petits sacs en polyéthylène contenant 1:1 de terre de jardin non stérilisée et du compost. Au cours de la période de transfert initial, les plantules ont été conservées dans les conditions ambiantes de culture et recouvertes avec des sacs en polyéthylène pour maintenir un taux élevé d'humidité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Des explants nodaux prélevés sur des plants matures de mûraie ont été cultivés sur un milieu MS additionné de 2 mg/l de BAP seul, cette concentration ayant donné le taux maximal de multiplication des pousses dans des études antérieures (Hossain et coll., 1990, 1991). Dans ce milieu, la première réaction des explants s'est manifestée par un agrandissement et un débouillage des bourgeons axillaires. Dans la première semaine de culture, 40 à 50 % des explants présentent un éclatement des bourgeons et, dans les 3 à 4 semaines, on obtient une prolifération des cultures de pousses chez environ 90 % des explants. Les pousses présentent une forte croissance, des entre-nœuds courts et des feuilles vert foncé épaisses. Un explant primaire a donné un maximum de 8 pousses utilisables après 8 semaines de mise en culture. Ces pousses ont été sectionnées et utilisées comme boutures pour permettre le racinement. Après récolte des pousses, les cépées formées ont subi 8 passages consécutifs (5 semaines par passage). A la fin de chaque passage, les pousses utilisables (d'une longueur de 2 à 3 cm) ont été sectionnées et utilisées comme microboutures pour le racinement. Les parties restantes ont été transférées dans un nouveau milieu après élimination des feuilles mortes et nécrotiques. Le nombre de microboutures produites par culture, la longueur d'une microbouture et la qualité augmentent progressivement jusqu'à la 7e sous-culture puis décroissent. Si les cultures sont maintenues au-delà de 8 à 9 passages, elles produisent des pousses chlorotiques et étioilées donnant des feuilles moins développées, entraînant une réduction du rendement total des microboutures. A ce stade, les pousses étioilées et chlorotiques ont été coupées, les extrémités ôtées et placées horizontalement sur la surface d'un nouveau milieu et de nouvelles cépées ont pu être régénérées. Ces dernières ont été traitées de la même manière et ont été soumises à 6 à 7 passages. Aucune modification n'a été observée dans cette méthode cyclique de production de pousses pendant toute la durée de maintenance des cultures de reproduction.

Ces résultats indiquent qu'un mûrier adulte peut être reproduit *in vitro* par prolifération des pousses. On peut induire des explants à former des bourgeons axillaires sur un milieu enrichi en BAP et les cultures-mères peuvent être conservées pour la production continue de pousses par sous-cultures répétées à intervalles de 5 à 6 semaines pour un taux de multiplication moyen de 2 à 3 par sous-culture (Fig. 1A et 1B). L'induction de pousses multiples à partir d'explants nodaux de mûrier dans un milieu contenant du BAP a déjà été décrite (Ohyama et Oka, 1987 ; Hossain et coll., 1990, 1991). Les pousses développées sur les cultures initiales sont vigoureuses et présentent les mêmes caractéristiques que les adultes, caractéristiques qui disparaissent au cours des sous-cultures suivantes.

Les microboutures issues des cultures initiales et celles des sous-cultures suivantes ont été mises à raciner dans de l'AIB à 0,1 mg/l (Fig. 1C). La fréquence de racinement et le nombre de racines par bouture augmentent proportionnellement au nombre de sous-cultures (Tableau I). Cependant, aucune variation significative n'a été observée pour ce qui concerne la longueur des racines. La variation de la réaction de racinement entre les pousses de différentes sous-cultures a été observée chez des cultivars de pommier (Zimmerman et Broome, 1981 ; Sriskandarajah et coll., 1982). Les plantules régénérées ont été transférées dans de la terre mélangée à du compost (Fig. 1D). La transplantation a réussi à 85 %.

Vingt-quatre plants ont été cultivés en mûraie et ont atteint une hauteur de 100 à 120 cm en 6 mois. Des observations préliminaires sur divers caractères morphologiques, comme la forme de la feuille, la longueur du pétiole, la surface foliaire et la distance internodale, n'ayant fait apparaître aucune variation significative par rapport aux plants cultivés suivant la méthode conventionnelle (par bouturage du plant-mère), la multiplication variétale (micropropagation) est donc conforme au type ancestral.

CONCLUSION

On peut conclure, des résultats et de la discussion qui précèdent, qu'il est possible, à partir d'un explant nodal, de multiplier par clonage à grande échelle un plant de mûrier recherché par sous-culture continue de cultures-mères.

GROWTH, DEVELOPMENT AND LEAF YIELD IN S-54 MULBERRY AS INFLUENCED BY DEFICIENCY OF SECONDARY NUTRIENTS

M.A. SHANKAR* & K. SHIVASHANKAR**

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065, India.

A pot culture experiment on deficiency of secondary nutrients to S-54 mulberry was carried out to assess the effect on growth, development and leaf yield per plant in two seasons, viz. winter and summer. The shoot height was lower with a deficiency of Ca (25.4 cm), Mg (30.7 cm) and S (27.7 cm) when compared to the control (37.4 cm) on the 60th day in summer. While deficiency of Ca and Mg (3.9 in each) recorded a lower number of shoots per plant when compared to S deficiency (4.4) and control (4.9) in winter. The deficiency of Ca (42.3) also caused a lower number of leaves per plant when compared to deficiency of Mg (62.4), S (60.1) and control (69.9) only during the summer. Mg deficiency (1576.7 and 1878.2 cm²) had a higher leaf area/plant than the control (1320.7 and 1780.9 cm²) and the other treatments. Deficiency of secondary nutrients caused a significant reduction in the leaf yield and fat content in the leaf as compared to the control in both seasons.

Keywords : Macronutrients, micronutrients, secondary nutrients, S-54 mulberry.

INTRODUCTION

The chemical composition of mulberry leaves is influenced by variety, spacing and other agronomic practices in addition to fertilizer management. The secondary nutrients improve the quality and yield of mulberry leaves. Due to intensive cultivation and use of high analysis fertilisers, deficiencies of secondary nutrients in the soil have been reported to limit the maximum yield potential and quality of mulberry, thus affecting the cocoon production. Calcium is considered essential to the growth of the meristematic tissue and to the functioning of the root tips (Kanwar, 1978). Its deficiency causes a stunting of the root system. Further, calcium deficiency may also lead to the accumulation of such substances as may lower or harm the vigour of the plant. Magnesium is needed by all green plants, as it is a constituent of chlorophyll and also takes part in phosphate transport (Kanwar, 1978 ; Mengel and Krikby, 1978). If the magnesium deficiency is only mild, growth of the plants will be depressed. Nevertheless, severe deficiencies can cause death of young plants (Grundon *et al.*, 1987). Plants deficient in sulphur are stunted with slender stalks, retarded growth and lowered nutritive value (Tandon, 1991). Sulphur is also stated to have a great role to play in the synthesis of proteins, oils and vitamins. Thus, in order to assess the effect of deficiencies of secondary nutrients on growth, development and yield of S-54 mulberry, this investigation was undertaken.

* Associate Professor of Sericulture (Agronomy).

** Professor of Crop Production.

MATERIALS AND METHODS

A pot culture experiment was conducted during the winter and summer seasons to study the effect of deficiency of secondary nutrients (*viz.*, Ca, Mg and S) on growth and development of mulberry at the Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore (India), during the year 1989-90. The design was completely randomised design with 7 replications. The experiment was conducted in cement pots which measured 45 × 45 × 45 cm (length × breadth × height). The pots were lined with polyethylene sheets from inside to avoid a possible contact with the roots because of the calcium content in the cement.

The cement pots were filled with washed granite stone powder as a medium for cultivation of mulberry. The crop was raised initially by planting the cuttings and using deionized water for watering the plants for a period of 125 days. Later, they were pruned and a Hoagland nutrient solution containing all the macronutrients and micronutrients except secondary nutrients was added treatment wise. The growth parameters on mulberry were recorded periodically at intervals of 30, 45 and 60 days. The leaf yield per plant was determined on the 60th day. The leaf area was determined by LI-COR leaf area meter, fat content of leaf was recorded on a dry weight basis by Soxhlet Apparatus (Anonymous, 1965).

RESULTS AND DISCUSSION

Growth parameters (Table I) :

Mulberry grown under deficiency of Ca, Mg and S (15.3, 17.8 and 17.9 cm) in winter on the 30th day and Ca (21.6 cm) and S (21.4 cm) on the 45th day recorded significantly lower shoot heights as compared to control T₄ with 23.2 cm on the 30th day and 27.5 on the 45th day. Further, there were no significant differences among the treatments with deficiencies on the 30th day, while on the 45th day, deficiency of Mg (T₂) (26.4 cm) recorded a significantly higher shoot length as compared to Ca and S. However, it was on a par with that of the control in winter.

In summer, Ca deficiency (18.8 cm) was on a par with that of the control (20.0 cm) on the 30th day only. However, the deficiency of Mg and S recorded significantly lower shoot length compared to the control on the 30th and 45th day. Further, there were no significant differences in the shoot height between deficiency treatments but they were on a par with each other on the 30th and 45th day, respectively.

In winter, on the 60th day, the shoot height per plant did not differ significantly due to deficiency of secondary nutrients (27.8 to 32.0 cm), whereas in summer the shoot height was significantly lower with deficiency of Ca (25.4 cm), Mg (30.7 cm) and S (27.7 cm) when compared to the control (37.4 cm). Deficiency of Mg recorded significantly more shoot height (30.6 cm) when compared to the deficiency of Ca (25.4 cm) but was on a par with S deficiency. There were no differences in shoot height between seasons (30.1 to 30.4 cm).

In winter, mulberry grown under deficiencies of Ca, Mg and S recorded significantly lower numbers of leaves per plant when compared to the control with complete solution (31.7 and 40.2 on the 30th and 45th days, respectively).

In summer, the treatment with Ca deficiency recorded the significantly lowest number of leaves per plant (32.0) when compared to deficiency of Mg (50.0) and S (50.1) which were on a par with each other on the 30th day. Further, on the 45th day, deficiencies of Mg (58.9) and S (56.3) were on a par with the control (63.8). On the contrary, deficiency of Ca (38.1) recorded a significantly lower number of leaves per plant as compared to the control.

In winter, on the 60th day, the number of leaves per plant did not differ significantly due to deficiency of secondary nutrients (40.5 to 46.4). In summer, deficiency of Ca recorded a significantly lower number of leaves per plant when compared to deficiency of Mg, S and control (69.9). The differences between Mg and S were on a par with each other. The summer season recorded a significantly higher number of leaves per plant (58.6 leaves per plant) when compared to the winter season (43.1 leaves per plant) (Table I).

Table I. Growth parameters as influenced by deficiency of secondary nutrients to mulberry on 30th day, 45th day and 60th day.

Tableau I. Effet de la déficience en éléments nutritifs secondaires sur les paramètres de croissance au 30e jour, au 45e jour et au 60e jour.

Treatments	Shoot height (cm)		No. of shoots/plant		No. of leaves/plant	
	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer
<i>Traitements</i>	<i>Hauteur de la pousse (cm)</i>		<i>Nombre de pousses par plant</i>		<i>Nombre de feuilles par plant</i>	
	<i>Hiver</i>	<i>Été</i>	<i>Hiver</i>	<i>Été</i>	<i>Hiver</i>	<i>Été</i>
30th day / 30e jour						
T ₁ - Ca	15.3	18.8	3.6	4.9	23.1	32.0
T ₂ - Mg	17.8	17.4	3.7	6.6	26.0	50.0
T ₃ - S	17.9	17.1	4.0	6.5	23.0	50.1
T ₄ - All / Tous	23.2	20.0	4.7	6.6	31.7	57.8
F test / Test F	*	*	*	NS	*	*
SEd ±	1.8	0.9	0.2	0.7	1.3	2.5
CD at 5 %	3.8	1.9	0.5	-	2.9	5.3
CV %	18.3	9.5	12.2	20.8	10.2	9.8
45th day / 45e jour						
T ₁ - Ca	21.6	23.4	3.9	4.9	32.3	38.1
T ₂ - Mg	26.4	25.0	3.9	6.6	35.4	58.9
T ₃ - S	21.4	24.5	4.4	6.5	32.6	56.3
T ₄ - All / Tous	25.7	29.5	4.9	6.6	40.2	63.8
F test / Test F	*	*	*	NS	*	*
SEd ±	1.5	1.5	0.2	0.7	1.7	3.5
CD at 5 %	3.2	3.2	0.5	-	3.5	7.1
CV %	12.0	11.3	9.6	20.8	9.0	11.7
60th day / 60e jour						
T ₁ - Ca	27.8	25.4	3.9	4.9	41.2	42.3
T ₂ - Mg	32.0	30.7	3.9	6.6	44.2	62.4
T ₃ - S	29.7	27.7	4.4	6.5	40.5	60.1
T ₄ - All / Tous	31.1	37.9	4.9	6.6	46.4	69.9
F test / Test F	NS	*	*	NS	NS	*
SEd ±	2.3	1.6	0.2	0.7	2.7	2.7
CD at 5 %	-	3.3	0.5	-	-	5.6
CV %	12.1	9.4	9.6	20.8	11.2	8.5
Mean of seasons	30.1	30.4	4.3	6.1	43.1	58.6
<i>Moyenne des saisons</i>						
F test / Test F		NS		-		*
SEd ±		10.8		-		0.8
CD at 5 %		-		-		1.9

SEd : Standard deviation / *Ecart type*.

CD : Critical difference / *Intervalle de confiance*.

CV : Coefficient of variation / *Coefficient de variation*.

The number of shoots per plant differed significantly in the treatments with deficiency of secondary nutrients in winter seasons only. The number of shoots per plant was significantly highest in the control (4.9) followed by treatments with S deficiency (4.4) which was superior to Ca and Mg (3.9 in each treatment) on the 45th and 60th days. Further, in summer, the non-significant differences ranged from 4.9 in Ca to 6.6 in Mg and control on the 45th and 60th days (Table I).

Leaf area (Table II) :

Mulberry grown under deficiency of Mg (1576.7 and 1879.2 cm²) recorded a significantly higher leaf area per plant when compared to the control (1320.7 and 1750.9 cm²) and all the other treatments. However, deficiency of Ca (816.3 and 796.9 cm²) and S (717.2 and 807.7 cm²) were on a par and recorded significantly lower leaf areas per plant when compared to Mg deficiency and control. The leaf area was significantly higher in the summer season (1308.7 cm²/plant) than in winter (1107.7 cm²/plant).

Table II. Leaf area per plant, leaf yield per plant and fat content of mulberry leaf as influenced by deficiency of secondary nutrients during the winter and summer seasons on 60th day.

Tableau II. Effet de la déficience en éléments nutritifs secondaires sur la surface foliaire par plant, le rendement en feuilles par plant et le contenu en matières grasses de la feuille de mûrier en hiver et en été au 60e jour.

Treatments	Leaf area/plant (cm ²)		Leaf yield/plant (g)		Fat content (%)	
	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer
Traitements	Surface foliaire par plant (cm ²)		Rendement en feuilles/plant (g)		Matières grasses (%)	
	Hiver	Eté	Hiver	Eté	Hiver	Eté
T ₁ - Ca	816.3	796.9	29.8	42.0	1.61	1.20
T ₂ - Mg	1576.7	1879.2	35.4	48.7	1.70	1.44
T ₃ - S	717.2	807.7	32.1	39.4	1.62	1.33
T ₄ - All / Tous	1320.7	1750.9	46.4	57.6	1.93	2.00
F test / Test F	*	*	*	*	*	*
SEm ±	63.4	50.5	1.6	2.5	0.04	0.04
CD at 5 %	133.2	106.1	3.3	5.3	0.08	0.08
CV %	12.0	7.9	9.1	10.1	4.7	5.2
Mean of seasons	1107.7	1308.7	35.9	46.9	1.74	1.49
Moyenne des saisons						
F test / Test F		*		*		*
SEm ±		15.8		3.5		0.1
CD at 5 %		38.3		8.4		0.2

SEm : Standard deviation of the mean / *Ecart type de la moyenne.*

CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*

CV : Coefficient of variation / *Coefficient de variation.*

Leaf yield at harvest (Table II) :

In the winter season, the leaf yield per plant was significantly lower due to deficiency of secondary nutrients to mulberry as compared to the control (46.4 g). However, Ca deficiency caused a significant reduction of leaf yield (29.8 g) as compared to deficiency of Mg (35.4 g). Nevertheless, the differences in leaf yield per plant in Mg and S deficiencies did not vary significantly.

During summer, the leaf yield per plant was significantly lower due to deficiency of secondary nutrients to mulberry as compared to the control (57.6 g). However, deficiency of S (39.4 g) and Ca (42.0 g) recorded a significantly lower leaf yield per plant as compared to deficiency of Mg (48.7 g). Further, the differences in leaf yield between Ca and S did not vary significantly. The leaf yield per plant differed significantly, being more in summer (46.9 g/plant) than in winter (35.9 g/plant).

Fat content (Table II) :

In winter, mulberry grown under deficiency of Ca (1.61 %), Mg (1.70 %) and S (1.62 %) recorded a significantly lower fat content than the control (1.93 %). In summer also the fat content of leaf was significantly lower in deficiency of Ca (1.20 %), Mg (1.44 %) and S (1.33 %) than that of the control (2.00 %). Among deficiencies, fat content in leaf was significantly more in Mg deficiency (1.44 %), followed by S deficiency (1.33 %) and lowest in Ca deficiency (1.20 %). The fat content of leaf differed significantly, being more in the winter season (1.74 %) than in summer (1.49 %).

This experiment was especially designed to elucidate the significant role of Ca, Mg and S in mulberry production. The use of fertilizers in recent times has brought certain hidden problems of not taking adequate care for the end product of cocoon and silk in mulberry production.

In winter, deficiency of Ca, Mg and S reduced the leaf yield by 58, 31 and 45 per cent over that of the control. In summer, the corresponding reductions were 37, 18 and 46 per cent (Table II). The deficiency of secondary nutrients may also suppress the growth of leaf meristem, and root tip in turn may pull down the yield of mulberry leaf. Nevertheless, a similar reduction in growth and yield has been reported by Kanwar (1978) and Grundon *et al.* (1987).

The significant reduction in leaf yield due to deficiency of Ca was also due to reduction in shoot height and number of leaves per plant, resulting in lower leaf area, which could not contribute for production of higher leaf yield per plant as compared to the control. On the contrary, though deficiency of Mg significantly reduced the leaf yield, it was to a lesser extent. This was due to a marginally higher number of leaves coupled with a higher number of shoot as compared to that of the control. Thus Mg-deficient plants had a higher leaf area than the control (Table II). It is thus observed that Ca-, Mg- and S-deficient plants were highly affected in expressing growth attributes and thus leaf yields were reduced. This is further strengthened by the fact that the number of leaves and leaf area are highly correlated with Ca and Mg contents of leaf and the leaf yield was highly correlated with Ca content (Shankar, 1990). Low levels of Ca and Mg must have reduced the chlorophyll content, thus reducing yields. Pol and Lolaraya (1972) and Grundon *et al.* (1987) also observed the ill effects of low calcium. Kanwar (1978) reported that deficiency of Ca and Mg not only retarded growth but also caused necrotic symptoms in acute deficiencies. Further, Tandon (1991) reported that sulphur was also equally responsible for the pulling down of growth, development and quality of plants.

Thus, it could be emphasised that, in addition to NPK, supply of Ca, Mg and S should also be given importance in nutrition of mulberry to obtain maximum quality leaf yield as it is a perennial crop yielding good returns to farmers throughout the year in tropical countries.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1965) Methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists, 4th ed., Washington, DC.
- GRUNDON N.J., EDWARDS D.G., TAKKAR P.N., ASHER C.J., LARK R.B. (1987) Nutritional disorders of grain sorghum. Copublished by the Australian Centre for International Agricultural Research, Indian Council of Agricultural Research and University of Queensland.
- KANWAR J.S. (1978) Soil fertility: Theory and Practice. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

- MENGEL K., KRIKBY E.A. (1978) Principles of plant nutrition. Ed. International Potash Institute, Switzerland, pp. 419.
- POL R.N., LOLORAYA M.N. (1972) Effect of Ca levels on chlorophyll synthesis in peanut and linseed plants. *Biochem. Physiologic, der Pfl. Anzen.*, 163, 443-449.
- SHANKAR M.A. (1990) Nutritional management of mulberry and its effect on silkworm growth, development and silk quality. PhD thesis submitted to UAS, Bangalore, pp. 410.
- TANDON H.L.S. (1991) Sulphur research and agricultural production in India. Third ed., pp. 140, The Sulphur Institute, Washington DC, USA.

EFFET DE LA DEFICIENCE EN ELEMENTS NUTRITIFS SECONDAIRES SUR LA CROISSANCE, LE DEVELOPPEMENT ET LE RENDEMENT EN FEUILLES CHEZ LA VARIETE DE MURIER S-54

M.A. SHANKAR & K. SHIVASHANKAR

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065, Inde.

On a réalisé une culture expérimentale de mûriers de la variété S-54 afin d'étudier les effets de la déficience en éléments nutritifs secondaires sur la croissance, le développement et le rendement en feuilles par plant en fonction de deux saisons (été et hiver). La hauteur de la pousse est inférieure chez les lots déficitaires en Ca (25,4 cm), en Mg (30,7 cm) et en S (27,7 cm) à celle des lots témoins (37,4 cm) au 60^e jour en été. La déficience en Ca et Mg entraîne une diminution du nombre de pousses par plant (3,9 dans les deux cas) par rapport à la déficience en S (4,4) et aux lots témoins (4,9) en hiver. La déficience en Ca entraîne également une diminution du nombre de feuilles par plant (42,3) par rapport à la déficience en Mg (62,4), en S (60,1) et au témoin (69,9) uniquement en été. La déficience en Mg donne une surface foliaire par plant supérieure (1576,7 et 1878,2 cm²) à celle obtenue chez le témoin (1320,7 et 1780,9 cm²) et chez les autres traitements. Au cours des deux saisons, la déficience en éléments nutritifs secondaires provoque une diminution significative du rendement en feuilles et du contenu en matières grasses de la feuille par rapport au témoin.

INTRODUCTION

La composition chimique des feuilles de mûrier est influencée non seulement par la méthode d'amendement des sols mais aussi par la variété, l'espacement et autres pratiques culturales. Les éléments nutritifs secondaires améliorent le rendement en feuilles et leur qualité. En raison de la culture intensive et de l'utilisation d'engrais à haute teneur en matière active, la déficience du sol en éléments nutritifs secondaires limite le potentiel maximal de rendement et la qualité du mûrier, affectant ainsi la production de cocons. Le calcium est considéré comme essentiel à la croissance du tissu méristématique et au fonctionnement des extrémités des racines (Kanwar, 1978). Le manque de calcium provoque une atrophie du système racinaire. De plus, la déficience en calcium peut entraîner l'accumulation de substances susceptibles d'affaiblir ou de nuire à la vigueur de la plante. Le magnésium est nécessaire à toutes les plantes vertes car c'est un composant de la chlorophylle qui contribue également au transport du phosphate (Kanwar, 1978 ; Mengel et Krikby, 1978). Lorsque la déficience en magnésium est bénigne, la croissance des plantes diminue ; les déficiences importantes peuvent provoquer la mort des jeunes plants (Grundon et coll., 1987). Les plantes déficitaires en soufre sont atrophiées et présentent des tiges minces, un retard de croissance et une valeur nutritive faible (Tandon, 1991). Le soufre joue également un rôle important dans la synthèse des protéines, des essences et des vitamines. Cette étude a donc été entreprise afin d'évaluer les effets de la déficience en éléments nutritifs secondaires sur la croissance, le développement et le rendement de la variété de mûrier S-54.

MATERIELS ET METHODES

Une culture expérimentale en pot a été réalisée en hiver et en été afin d'étudier l'effet de la déficience en éléments nutritifs secondaires (Ca, Mg et S) sur la croissance et le développement du mûrier au Département de Sériciculture de l'Université des Sciences agricoles de Bangalore (Inde) au cours de l'année 1989-90. La configuration utilisée est celle des blocs aléatoires avec 7 réplicats. L'expérience a été faite dans des pots en ciment mesurant 45 × 45 × 45 cm (longueur × largeur × hauteur). L'intérieur des pots a été tapissé avec des feuilles en polyéthylène afin d'éviter les contacts éventuels avec les racines en raison du calcium contenu dans le ciment.

Les pots en ciment ont été remplis avec du granit en poudre lavé utilisé comme milieu de culture. La culture a été mise en place à partir de boutures et les plants ont été arrosés avec de l'eau déionisée sur une période de 125 jours. Ils ont ensuite été taillés et une solution d'éléments nutritifs Hoagland contenant tous les micro et macro éléments nutritifs sauf les éléments nutritifs secondaires a été appliquée en fonction des traitements. Les paramètres de croissance du mûrier ont été relevés périodiquement à 30, 45 et 60 jours. Le rendement en feuilles a été calculé au 60^e jour. La surface foliaire a été déterminée à l'aide d'un planimètre LI-COR, le contenu en matières grasses des feuilles a été calculé sur la base du poids sec à l'aide d'un appareil Soxhlet (Anonyme, 1965).

RESULTATS ET DISCUSSION

Paramètres de croissance (Tableau I) :

Le mûrier soumis à la déficience en Ca, en Mg et en S (15,3, 17,8 et 17,9 cm) en hiver le 30^e jour et à la déficience en Ca (21,6 cm) et en S (21,4 cm) le 40^e jour présente des hauteurs de pousses nettement inférieures à celles obtenues chez le témoin (T₄) qui sont de 23,2 cm le 30^e jour et de 27,5 cm le 45^e jour. Il n'y a aucune différence significative entre les différentes déficiences le 30^e jour, tandis que la déficience en Mg (T₂) entraîne une augmentation significative de la longueur de la pousse au 45^e jour (26,4 cm) par rapport à la déficience en Ca et en S. Cependant, elle donne des résultats équivalents à ceux du témoin en hiver.

En été, la déficience en Ca (18,8 cm) donne des résultats comparables à ceux du témoin (20,0 cm) seulement le 30^e jour. Cependant, la déficience en Mg et en S donne une longueur de pousse nettement inférieure à celle obtenue pour le témoin au 30^e et au 45^e jour. De plus, la hauteur de pousse ne diffère pas de manière significative entre les différentes déficiences qui donnent des résultats comparables le 30^e et le 40^e jour.

En hiver, au 60^e jour, la hauteur de la pousse ne diffère pas de manière significative entre les déficiences en éléments nutritifs secondaires (de 27,8 à 32,0 cm), tandis que, en été, la longueur de la pousse est nettement inférieure chez les lots soumis à la déficience en Ca (25,4 cm), en Mg (30,7 cm) et en S (27,7 cm) à celle obtenue chez le témoin (37,4 cm). La déficience en Mg donne une longueur de pousse (30,7 cm) supérieure à celle obtenue pour la déficience en Ca (25,4 cm) mais est comparable à celle obtenue pour la déficience en S. Il n'y a aucune différence de hauteur de pousse entre les saisons (de 30,1 à 30,4 cm).

En hiver, le mûrier soumis à la déficience en Ca, en Mg et en S donne un nombre de feuilles par plant nettement inférieur à celui obtenu pour le témoin ayant reçu une solution complète (31,7 au 30^e jour et 40,2 au 45^e jour).

En été, le lot soumis à la déficience en Ca produit le nombre minimal de feuilles par plant (32,0), tandis que les lots soumis à la déficience en Mg (50,0) et en S (50,1) donnent des résultats comparables au 30^e jour. Au 45^e jour, les déficiences en Mg (58,9) et en S (56,3) donnent des résultats comparables à ceux obtenus pour le témoin (63,8). A l'inverse, la déficience en Ca (38,1) entraîne une diminution significative du nombre de feuilles par plant par rapport au témoin.

En hiver, au 60^e jour, le nombre de feuilles par plant n'est pas significativement différent entre les types de déficiences en éléments nutritifs secondaires (40,5 à 46,4). En été, la déficience en Ca donne un nombre de feuilles par plant significativement inférieur à ceux obtenus pour la déficience en Mg, en S et par rapport au témoin (69,9). Les écarts-types obtenus avec les déficiences en Mg et en S sont sensiblement identiques. Le nombre de feuilles par plant relevé en été est nettement supérieur (58,6 feuilles par plant) à celui obtenu en hiver (43,1 feuilles par plant) (Tableau I).

Le nombre de pousses par plant diffère de manière significative entre les types de déficience en éléments nutritifs secondaires uniquement en hiver. Le nombre de pousses par plant est maximal chez le témoin (4,9) par rapport aux lots soumis à la déficience en S (4,4), ces derniers donnant des résultats supérieurs à ceux obtenus chez les lots soumis à la déficience en Ca et en Mg (3,9 dans chaque cas) au 45e et au 60e jour. De plus, en été, les différences non significatives varient de 4,9 (Ca) à 6,6 (Mg et témoin) au 45e et au 60e jour (Tableau I).

Surface foliaire (Tableau II) :

Le mûrier soumis à la déficience en Mg donne une surface foliaire par plant (1 576,7 et 1 879,2 cm²) nettement supérieure à celle obtenue chez le témoin (1320,7 et 1750,9 cm²) et chez tous les autres traitements. Cependant, les déficiences en Ca (816,3 et 796,9 cm²) et en S (717,2 et 807,7 cm²) donnent des surfaces foliaires comparables et nettement inférieures à celles obtenues chez les lots soumis à la déficience en Mg et au témoin. La surface foliaire est nettement plus importante en été (1308,7 cm²/plant) qu'en hiver (1107,7 cm²/plant).

Rendement en feuilles (Tableau II) :

En hiver, la déficience en éléments nutritifs secondaires chez le mûrier entraîne une diminution significative du rendement en feuilles par plant par rapport au témoin (46,4 g). Cependant, la déficience en Ca entraîne une diminution significative du rendement en feuilles (29,8 g) par rapport à la déficience en Mg (35,4 g). Les différences de rendement en feuilles entre les lots soumis à la déficience en Mg et les lots soumis à la déficience en S ne sont pas significatives.

En été, la déficience en éléments nutritifs secondaires chez le mûrier entraîne une diminution significative de la surface foliaire par rapport au témoin (57,6 g). Cependant, les déficiences en S (39,4 g) et en Ca (42,0 g) donnent une surface foliaire nettement inférieure à celle obtenue pour la déficience en Mg (48,7 g). Les rendements en feuilles entre les lots soumis à la déficience en Ca et ceux soumis à la déficience en S ne sont pas significativement différents. Le rendement en feuilles par plant est nettement plus élevé en été (46,9 g/plant) qu'en hiver (35,9 g/plant).

Matières grasses (Tableau II) :

En hiver, le mûrier soumis à la déficience en Ca (1,61 %), en Mg (1,70 %) et en S (1,62 %) donne des contenus en matières grasses nettement inférieurs à ceux obtenus pour le témoin (1,93 %). En été, le contenu en matières grasses des feuilles est nettement inférieur chez les lots soumis à la déficience en Ca (1,20 %), en Mg (1,44 %) et en S (1,33 %) à celui obtenu chez le témoin (2,00 %). Le contenu en matières grasses des feuilles est plus élevé chez les lots soumis à la déficience en Mg (1,44 %) que chez les lots soumis à la déficience en S (1,33 %) et est minimal chez les lots soumis à la déficience en Ca (1,20 %). Le contenu en matières grasses des feuilles est plus élevé en hiver (1,74 %) qu'en été (1,49 %).

Cette expérience a été élaborée dans le but d'élucider le rôle du Ca, du Mg et du S dans la production du mûrier. L'utilisation récente d'engrais dans la culture du mûrier ne tient pas compte des retombées possibles sur la production de cocons et de soie.

En hiver, la déficience en Ca, en Mg et S entraîne une diminution de 58, 31 et 45 % du rendement en feuilles par rapport aux rendements obtenus chez le témoin. En été, pour les mêmes types de déficiences, les diminutions sont de 37, 18 et 46 % (Tableau II). La déficience en éléments nutritifs secondaires peut également entraîner un arrêt de la croissance du méristème foliaire et de l'extrémité foliaire, se traduisant par une baisse du rendement en feuilles. Une diminution identique de la croissance et du rendement a été observée par Kanwar (1978) et Grundon et coll. (1987).

La baisse significative du rendement en feuilles obtenue chez les lots soumis à la déficience en Ca est également due à la diminution de la hauteur de la pousse et du nombre de feuilles par plant, se traduisant par une réduction de la surface foliaire, d'où un rendement en feuilles inférieur à celui obtenu chez le témoin. Par ailleurs, la déficience en Mg entraîne une diminution moins importante, bien que significative, du rendement en feuilles ; ceci est dû à un nombre de feuilles légèrement supérieur associé avec un plus grand nombre de pousses par rapport au témoin. Les plants déficients en Mg ont donc une surface foliaire supérieure à celle du témoin (Tableau II). La déficience en Ca,

en Mg et S affecte fortement l'expression des paramètres de croissance des plants, entraînant une diminution du rendement en feuilles. Ceci est également confirmé par le fait que le nombre de feuilles par plant et la surface foliaire sont étroitement corrélés à la teneur des feuilles en Ca et en Mg et que le rendement en feuilles est étroitement corrélé avec la teneur en Ca (Shankar, 1990). Des teneurs faibles en Ca et en Mg peuvent entraîner une réduction du contenu en chlorophylle se traduisant par une baisse de rendement. Pol et Lolaraya (1972) et Grundon et coll. (1987) ont également observé les effets négatifs d'une faible teneur en calcium. Kanwar (1978) a observé que la déficience en Ca et en Mg provoquait non seulement un retardement de croissance mais également des symptômes nécrotiques dans les cas de déficiences les plus sévères. De plus, Tandon (1991) a observé que le soufre avait des effets similaires sur la croissance, le développement et la qualité des plants.

On peut donc affirmer que, outre l'application de NPK, celle de Ca, de Mg et de S est également importante pour la nutrition du mûrier si l'on souhaite optimiser le rendement en feuilles chez le mûrier, culture pérenne apportant de bons revenus tout au long de l'année aux fermiers des pays tropicaux.

INCIDENCE OF *CERCOSPORA MORICOLA* COOKE IN MULBERRY LEAVES (*MORUS INDICA* L.): HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES

G.C. VIJAYA KUMAR

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

The mulberry leaves (Morus indica L.) var. Kanva-2 (M5) infected with the leaf spot pathogen, Cercospora moricola Cooke, were examined to investigate the eventual histopathological changes. The pathogen invaded the host through natural openings and caused histomorphological changes in the mesophyll tissue. The thickness of the leaf, length of palisade and diameter of spongy cells decreased gradually with the progression of the disease. The growth of the fungus along with the pathogenic activity of the toxin it produced perhaps caused the reduction in total insoluble polysaccharides, proteins and nucleic acids in the mesophyll tissues.

Keywords : Histopathology, histochemistry, leaf spot, toxin.

INTRODUCTION

The leaf spot of mulberry (*Morus indica* L.), a major, economically important disease, caused by *Cercospora moricola* Cooke, results in the reduction of leaf yield (Sikdar and Krishnaswami, 1980). Previous studies have shown that the infected mulberry leaves become chlorotic followed by the formation of necrotic tissues with a yellow halo (Siddaramaiah and Hegde, 1988). Feeding of such leaves to silkworms (*Bombyx mori* L.) is not recommended as it leads to the prolongation of the life period, the reduction in worm and cocoon weights. In another investigation Siddaramaiah *et al.* (1980) found that the pathogen produces toxins which play an active role in disease development.

The present study is an attempt to investigate some histopathological changes in the mulberry leaves due to infection of *C. moricola*.

MATERIALS AND METHODS

The leaves of cultivar Kanva-2 (M5) included in this study were collected from the fields of Gandli Krishi Vignana Kendra, University of Agricultural Sciences (Bangalore, India), during the spring of 1990. The variety is recommended for cultivation because of its higher yield of large, thick and unlobed leaves.

The healthy and infected leaves were fixed in Carnoy's B (ethyl alcohol 6 parts + chloroform 3 parts + acetic acid 1 part by volume) for one hour, dehydrated in ethyl alcohol n° butanol series, embedded in paraffin wax of 58 °C. The sections of 10 µm thickness were stained to localise insoluble polysaccharides by periodic acid Schiff's reagent (PAS) method (Jensen, 1962), proteins by mercuric bromophenol blue (MBB) method (Mazia *et al.*, 1953) and nucleic acids by toluidine blue method (Feder and O'Brien, 1968).

RESULTS AND DISCUSSION

Histopathology :

The transverse section of a mulberry leaf is differentiated into an upper palisade and a lower spongy chlorenchyma lying between the two epidermal layers. The palisade tissue is compactly arranged with numerous chloroplasts whereas the spongy chlorenchyma has larger intercellular spaces and fewer chloroplasts. The upper epidermis is multilayered with a thick cuticle.

A comparison of the tissues of healthy and infected leaves showed a gradual reduction in the thickness of leaf, length of palisade and diameter of spongy cells (Table I) as the disease progressed (Fig. 2).

Table I. Some histological changes in the leaves of *Morus indica* L. due to the infection by *Cercospora moricola*.

Tableau I. Quelques modifications histologiques des feuilles de *Morus indica* L. dues à l'infestation par *Cercospora moricola*.

Tissues	Nature of leaves	
	Healthy	Infected
	Etat des feuilles	
Tissus	Saines	Infestées
Leaf thickness	81.2	72.4*
<i>Epaisseur des feuilles</i>		
Length of palisade cells	30.0	23.2**
<i>Longueur des cellules palissadiques</i>		
Diameter of the spongy cell	9.2	6.4**
<i>Diamètre des cellules spongieuses</i>		

Size in μm / Taille en μm .

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

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

Histochemistry :

Significant changes were noticed due to infection in the polysaccharide, protein and nucleic acid contents of the healthy plants (Fig. 2, 4). The number of larger polysaccharide grains in the healthy leaves was more than that in the infected ones (Fig. 1). The toxins produced by the pathogen in the infection centre are translocated to the neighbouring tissues and promote secondary infections which are at first more chronic but less violent in character. Siddaramaiah *et al.* (1980) found that the production of toxins in culture filtrates of *C. moricola* played an active role in disease development. In the initial infection, the fungus (Fig. 3) may produce toxins which directly kill the protoplasts and arrest all the metabolic activities, leading to the shrinkage of the protoplasm of the host cell (Fig. 4). The synthesized polysaccharide content of the infected cell perhaps remains unaffected initially due to the inactivation of starch-degrading enzymes by the toxin (Tanaka and Akai, 1960). The gradual degradation of leaf tissues is accompanied by the complete utilisation of starch by the pathogen as the disease progresses (Wani *et al.*, 1981 ; Vijaya Kumar, 1990) (Fig. 2).

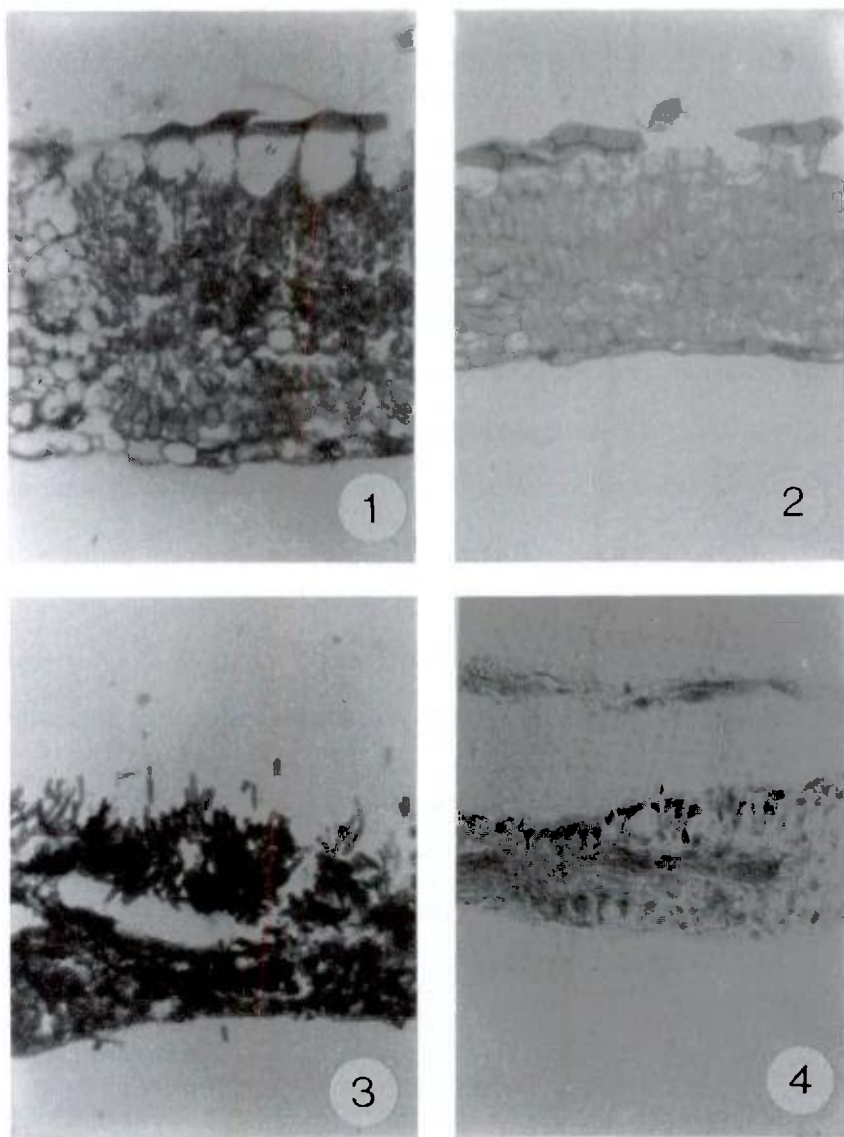


Fig. 1-4 : Histochemical changes in the leaves of *Morus indica* L. due to the infection by *Cercospora moricola* Cooke (400 ×).

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

Fig. 2 : At heavy infection stage starch has completely disappeared and the size of the palisade cells is reduced.

Fig. 3 : Conidia of *C. moricola* in the infected leaf.

Fig. 4 : Infection has caused shrinkage of protoplasm and complete degradation of protein positive bodies.

Fig. 1-4 : Modifications histochimiques des feuilles de *Morus indica* L. dues à l'infestation par *Cercospora moricola* Cooke (400 ×).

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

Fig. 2 : Au stade maximal d'infestation, l'amidon a totalement disparu et les cellules palissadiques ont diminué en taille.

Fig. 3 : Conidies de *C. moricola* dans la feuille infestée.

Fig. 4 : L'infestation a provoqué un rétrécissement du protoplasme et la dégradation totale des corps protéiques positifs.

In healthy leaves, the proteinoplasts were numerous and closely arranged in the palisade and spongy cells. Due to infection the proteinoplasts initially became distorted in shape and subsequently disappeared completely (Fig. 4).

The healthy leaves contained low RNA which disappeared completely at severe infection stage.

Previous studies of Siddaramaiah and Hegde (1988) revealed that feeding of silkworms with dried parts of leaf spot and yellow halo caused by *C. moricola* leads to significant prolongation of life period and reduction in the worm and cocoon weights.

The above findings support to substantiate the fact that the toxin produced by the fungus damages the host cells by depriving them of substances essential for their metabolism. Due to lack of nutrients accompanied by toxin metabolites in the infected mulberry leaves, the silkworms probably get reduced in size and perform poorly. This nature of changes by toxin requires certain types of research to investigate the biological significance of accumulation of chemicals and their role in pathogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- FEDER N., O'BRIEN T.P. (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. American J. Bot., 55, 123-142.
- JENSEN W.A. (1962) Botanical histochemistry. Principle and Practices. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- MAZIA D., DREWER P.A., ALFERT M. (1953) The cytochemical staining and measurement of proteins with mercuric bromophenol blue. Bio. Bull., 104, 57-67.
- SIKDAR A.K., KRISHNASWAMI S. (1980) An assessment of leaf yield loss of the two mulberry varieties due to leaf spot. Indian J. Seric., 19, 9-12.
- SIDDARAMAIAH A.L., HEGDE R.K. (1988) Effect of feeding *Cercospora* infected leaves of mulberry on silkworm development. Mysore J. Agricult. Sci., 22, 498-504.
- SIDDARAMAIAH A.L., LINGARAJU S., HEGDE R.K. (1980) Toxic effect of the culture filtrate of *Cercospora moricola* Cooke, the causal organism of leaf spot of mulberry. Indian J. Seric., 19, 9-11.
- SUHAS P., WANI P.V., RAI, JOSHI SYAMASUNDAR (1981) Histochemical changes in pearl millet plants grown from sg-toxin treated seeds. Indian Phytopathol., 34(2), 187-190.
- TANAKA J., AKAI S. (1960) On the mechanism of starch accumulation in tissues surrounding spots in leaves of rice plants due to the attack of *Cochliobolus miyabeanus* II on the activities of β -amylase and invertase in tissues surrounding spots. Phytopathol. Soc. Japan Ann., 25, 80-84.
- VIJAYAKUMAR G.C. (1991) Histopathological and histochemical changes in mulberry (*Morus alba* L.) powdery mildew due to infection by *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. Sericologia, 31(4), 703-703.
- VIJAYAKUMAR G.C. (1992) Histopathological and histochemical changes in mulberry (*Morus alba* L.) leaves due to infection by *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler. Sericologia, 32(4), 641-646.

INCIDENCE DE *CERCOSPORA MORICOLA* COOKE SUR LES FEUILLES DE MURIER (*MORUS INDICA* L.): MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES

G.C. VIJAYA KUMAR

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

On a examiné des feuilles de mûrier (Morus indica L.) var. Kanva-2 (M5) infestées par l'agent pathogène de la maladie de la tache (Cercospora moricola Cooke) afin d'observer les modifications histopathologiques éventuelles. L'agent pathogène s'introduit dans l'hôte par des orifices naturels et provoque des modifications histomorphologiques dans le tissu mésophyllien. L'épaisseur de la feuille, la longueur des cellules palissadiques et le diamètre des cellules spongieuses diminuent progressivement à mesure que la maladie s'étend. La croissance du champignon et l'activité pathogène de la toxine qu'il produit semblent entraîner une diminution des polysaccharides insolubles totaux, des protéines et des acides nucléiques dans les tissus mésophylliens.

INTRODUCTION

La maladie de la tache du mûrier (*Morus indica* L.), maladie commune et grave du point de vue économique, provoquée par *Cercospora moricola* Cooke, entraîne une diminution du rendement en feuilles (Sikdar et Krishnaswami, 1980). Des études antérieures ont démontré que les feuilles de mûrier infestées deviennent chlorotiques et que des tissus nécrotiques entourés d'une auréole jaune se forment (Siddaramaiah et Hegde, 1988). Le nourrissage des vers à soie (*Bombyx mori* L.) avec des feuilles infestées est déconseillé car il entraîne une prolongation de la période larvaire et une diminution du poids de la larve et du cocon. Dans une autre étude, Siddaramaiah et coll. (1980) ont observé que l'agent pathogène produisait des toxines jouant un rôle actif dans le développement de la maladie.

Cette étude vise à étudier certaines modifications histopathologiques et histochimiques chez les feuilles de mûrier infestées par *C. moricola*.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles du cultivar Kanva-2 (M5) utilisées dans cette étude ont été prélevées dans les champs de Gandhi Krishi Vignana Kendra, University of Agricultural Sciences (Bangalore, Inde), au printemps 1990. La culture de cette variété est recommandée en raison de son rendement élevé en feuilles larges, épaisses et non lobées.

Des feuilles saines et infestées ont été fixées dans du Carnoy (alcool éthylique 6 parties + chloroforme 3 parties + acide acétique 1 partie par volume) pendant une heure, déshydratées dans une série d'alcool éthylique n-butanol et fixées dans de la paraffine solide à 58 °C. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été colorées afin de localiser les polysaccharides par la méthode du réactif de Schiff (PAS) à l'acide périodique (Jensen, 1962), les protéines par la méthode du bleu de bromophenol mercurique (MBB) (Mazia et coll., 1953) et les acides nucléiques par la méthode du bleu de toluidine (Feder et O'Brien, 1968).

RESULTATS ET DISCUSSION

Histopathologie :

La coupe transversale d'une feuille de mûrier se différencie en une palissade supérieure et un chlorenchyme inférieur situés entre les deux couches épidermiques. Le tissu palissadique est compact et contient de nombreux chloroplastes tandis que le chlorenchyme spongieux présente de vastes espaces intercellulaires et moins de chloroplastes. L'épiderme supérieur possède plusieurs couches avec une cuticule épaisse.

La comparaison des tissus des feuilles saines et infestées fait apparaître une diminution progressive de l'épaisseur de la feuille, de la longueur de la palissade et du diamètre des cellules spongieuses (Tableau 1) à mesure que la maladie progresse (Fig. 2).

Histochimie :

Des modifications significatives ont été observées par suite de l'infestation pour ce qui concerne les contenus en polysaccharides, en protéines et en acides nucléiques (Fig. 2, 4). Le nombre de grains de polysaccharide de grande taille dans les feuilles saines est supérieur à celui des feuilles infestées (Fig. 1). Les toxines produites par l'agent pathogène au centre d'infestation sont transloquées vers les tissus adjacents et favorisent les infestations secondaires qui sont chroniques mais de nature moins virulente. Siddaramaiah et coll. (1980) ont observé que la production de toxines dans les filtrats de culture de *C. moricola* intervenait activement dans le développement de la maladie. Au moment de l'infestation initiale, le champignon (Fig. 3) peut produire des toxines qui tuent directement les protoplastes et arrêtent toutes les activités métaboliques, entraînant ainsi la contraction du protoplasme de la cellule hôte (Fig. 4). Il semble que le contenu en polysaccharides synthétisés des cellules infestées ne soit pas affecté initialement en raison de l'inactivation par la toxine des enzymes dégradant l'amidon (Tanaka et Akai, 1960). La dégradation progressive des tissus foliaires s'accompagne de l'utilisation complète de l'amidon par l'agent pathogène à mesure que la maladie progresse (Wani et coll., 1981 ; Vijaya Kumar, 1990) (Fig. 2).

Chez les feuilles saines, les protéinoplastes sont nombreux et disposés de manière compacte dans les cellules palissadiques et spongieuses. Après infestation, les protéinoplastes se déforment et disparaissent complètement (Fig. 4).

Les feuilles saines contiennent peu d'ARN, cet ARN disparaît au stade maximal d'infestation.

Des études antérieures de Siddaramaiah et Hegde (1988) ont montré que le nourrissage des vers à soie avec des fragments séchés contenant des taches foliaire et des auréoles jaunes provoquées par *C. moricola* entraînait une prolongation significative de la période larvaire et une diminution du poids de la larve et du cocon.

Les résultats présentés ici permettent de démontrer que la toxine produite par le champignon endommage les cellules hôtes en les privant de substances essentielles à leur métabolisme. Du fait du manque d'éléments nutritifs et de la présence des métabolites de la toxine dans les feuilles de mûrier infestées, les vers à soie subissent une diminution de leur taille et donnent de mauvais résultats. La connaissance de la nature des modifications provoquées par la toxine demande d'être approfondie par des études sur la signification biologique de l'accumulation de substances chimiques et sur le rôle qu'elles jouent dans la pathogénèse.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	371
General sericulture	
Mûrier	374
Mulberry	
<i>B. mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	378
<i>B. mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	386
Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	387
Silkworms : genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	389
Silkworms : physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	392
Silkworms : eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	394
Silkworms : silk glands	
Soie	396
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portugais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the summary.

Sériciculture générale

General sericulture

Biology of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae).

Biologie du ver à soie *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae).

ALVAREZ A.

Centro de Investigacion "Tobaotata" ICA, Apartado Aéreo 151123, Eldorado, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

1993 Revista Colombiana de Entomologia, Vol. 19(4), 119-122. (S,e)

"Sentinella" in allarme. Il baco da seta rivela i pericoli di un fitofarmaco. / Sentry in alarm.

The silkworm reveals the dangers of a plant protection product.

Sentinelle en alerte. Le ver à soie révèle les dangers d'un produit phytosanitaire.

ANONYME

1991 Agricoltura e Innovazione, Vol. 17, 13-15. (I)

Sericulture in Malaysia.

Sériciculture en Malaisie.

ANONYME

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 45-48. (E)

The country Charkha : end of the road ?

Le pays Charkha : la fin de la route ?

CHARSLEY S.R.

Department of Sociology, University of Glasgow, Scotland, United Kingdom.

1994 Indian Silk, Vol. 33(2), 11-18. (E)

Historical review of silk manufacturing process in Korea.

Historique des procédés de transformation de la soie en Corée.

CHOE B.H.

Seoul National University, Department of Sericulture, Suwon, Korea Republic.

1985 Agriculture Research of Seoul National University, Vol. 10(2), 27-37. (K,e)

Silkworms to produce human vaccine.

Les vers à soie pour produire un vaccin humain.

DATTA R.K.

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

1994 Indian Silk, Vol. 33(1), 33-35. (E)

Proceedings of the expert group meeting on post-cocoon operations. (Manila, 26-29 October 1992)

Compte-rendus de la rencontre du groupe d'experts sur les opérations post-cocons. (Manille, 26-29 octobre 1992)

ESCAP (Economic and Social Commission for Asia and the Pacific)

United Nations Building, Rajadamnern Avenue, Bangkok 10200, Thailand.

1993 International Trade and Economic Cooperation Division, ESCAP, 62 p. (E)

Proceedings of the expert group meeting on an international silk information system.

Compte-rendus de la rencontre du groupe d'experts sur un système international d'information sur la soie.

ESCAP (Economic and Social Commission for Asia and the Pacific)

United Nations Building, Rajadamnern Avenue, Bangkok 10200, Thailand.

1993 International Trade and Economic Cooperation Division, ESCAP, 72 p. (E)

Techniques of silkworm rearing in the tropics.

Techniques d'élevage du ver à soie dans les régions tropicales.

ESCAP (Economic and Social Commission for Asia and the Pacific)

United Nations Building, Rajadamnern Avenue, Bangkok 10200, Thailand.

1993 International Trade and Economic Cooperation Division, ESCAP, 88 p. (E)

Studies on nutritive value of tussah silkworm pupae.

Etudes de la valeur nutritive des chrysalides de vers à soie tussah.

HE D.H. *et al.*

1994 Canye Kexue, Vol. 20(1), 49-51. (C)

Calendar of sericultural activities.

Calendrier des activités séricicoles.

KALAPPA S.H.K., SUBRAMANIAN R.K.

National Silkworm Seed Project, N° 17 National High School Road, Visveswarapuram, Basavanagudi, Bangalore 560 004, India.

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 30-31. (E)

Role of tribal women in sericulture.

Rôle des femmes des tribus dans la sériciculture.

KRISHNA RAO J.V., CHANDRAMOHAN SINGH.

Central Silk Board, United Mansions, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, India.

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 19-22. (E)

Technique to improve cocoon yield per unit of mulberry field in the north Weihe river.

Technique pour améliorer le rendement des cocons par unité de mûraies au nord de la rivière Weihe.

LIANG L.R. *et al.*

1994 Canye Kexue, Vol. 20(1), 62-63. (C)

Identification of ideal bivoltine seed area in the plains of West Bengal.

Identification de la région de grainage idéale des bivoltins dans les plaines du Bengale occidental.

PAVAN KUMAR T., DAS S.K., SEN S.K., MISRA P.N.

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

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 3-7. (E)

Silkworm rearing by industrial method in Tam Diep district, Ha Nam Ninh province (Vietnam).

Elevage industriel de vers à soie dans le district de Tam Diep, province de Ha Nam Ninh (Vietnam).

PHAM T.D.N., NGUYEN H.H., LE H.T.

1992 Nong Nghiep va Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam), Vol. 7, 267-269. (V,e)

Sericulture technology for rural women.

Technologie séricicole pour les femmes des campagnes.

RADHA T.M.

Institute for Social and Economic Change, Bangalore, India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(1), 39-42. (E)

Bihar hairy caterpillar and its management.

Lutte contre la chenille poilue du Bihar.

RAMKISHORE, MANJUNATH D., VINOD KUMAR, DATTA R.K.

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

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 13-15. (E)

Trainers' training programme for the core trainer teams : an event that inspired.

Programme de préparation des formateurs des principales équipes d'encadrement : un événement qui stimule.

REDDY K.S.S.

Central Silk Board, United Mansions, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(2), 32-34 (E)

Replacement of Nistari ? A matter to ponder !

Remplacement du Nistari ? Un sujet de réflexion !

ROY A.K., SINGH B.D., SINGH M.K., MISHRA P.K., JAYASWAL J.

Regional Sericultural Research Station, Ranchi 834 005, Bihar, India.

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 8-10. (E)

Kashmir filatures - Problems and prospects.

Filatures du Cachemire : problèmes et perspectives.

SHAH A.M.

Department of Management Studies, The University of Kashmir, Srinagar (J & K), India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(1), 25-29. (E)

Fertilizer application in muga growing areas of Assam.

Fertilisation des sols dans les régions de culture du Muga de l'Assam.

SINGH P.K.

Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(1), 43-46 (E)

Silk, you and the silky trend.

La soie, vous et la tendance soyeuse.

SINHA R.K., KISUR M.V.

Indian Silk, CSB, United Mansions, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(1), 11-18. (E)

Tasar culture to rehabilitate lepers !

La culture du tasar pour la réhabilitation des lépreux !

SINHA S.S., BAJPEYI C.M., PRIYA RAJAN.

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

1994 Indian Silk, Vol. 32(12), 37-39. (E)

Survey on classification and fertility of mulberry field soil in Jiaxing plains.

Etude sur la classification et la fertilité des sols des mûraies dans les plaines du Jiaxing.

ZHANG Y.N., WANG X.G., FANG Z.D., ZHANG L.K., XU L.Y.

Jiaxing Agricultural School of Zhejiang Province, Jiaxing 314000, China.

1994 Canye Kexue, Vol. 20(1), 12-16. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*.

Sucres et azote dans l'anneau isolé des feuilles de *Morus bombycis*.

ASANO N., TOMIOKA E., KIZU H., MATSUI K.

Hokuriku University, School of Pharm., Kanagawa Machi, Kanazawa, Ishikawa 92011, Japan.

1994 *Carbohydrate Research*, Vol. 253, 235-245. (E)

Purification of mulberry dwarf and jujube witches'-broom mycoplasma-like organisms and their serological relationship determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Purification des organismes analogues aux mycoplasmes de la cloque du jujube et du nanisme du mûrier et leurs relations sérologiques déterminées par ELISA.

BAK W.C., LA Y.J.

Forestry Research Institute, Department of Forest Microbiology, Seoul, Korea Republic.

1992 *Korean Journal of Plant Pathology*, Vol. 8(2), 149-153. (K,e)

Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*.

Deux nouveaux dérivés du 2-arylbenzofurane provenant de fractions responsables de l'activité hypoglycémisante chez *Morus insignis*.

BASNET P., KADOTA S., TERASHIMA S., SHIMIZU M., NAMBA T.

1993 *Chem. Pharm. Bull.*, Vol. 41(7), 1238-1243. (E)

Efficacy of selected herbicides in mulberry.

Efficacité d'herbicides sélectionnés pour le mûrier.

CHANYA M., PRATHIP K., SATHIT K.

Department of Agriculture, Botany and Weed Science Division, Bangkok 10900, Thailand.

1986 *Dept of Agriculture, Bangkok, Thailand, Seminar Report 1986 : Highland Crops*, 57. (Th)

Correlation between some edaphic factors and *Meloidogyne incognita* infestation of mulberry in Malda, West Bengal.

Corrélation entre quelques facteurs édaphiques et l'infestation du mûrier par *Meloidogyne incognita* à Malda, Bengale occidentale.

DAS B.K., RAY I., SEN S.K., SARKAR J., SARKAR S., DAS N.K.

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, India.

1990 *Indian Journal of Nematology*, Vol. 20(1), 91-91. (E)

Drip irrigation for mulberry gardens.

Irrigation ruisselante pour les mûraies.

GOPINATH G.R.

Javagal, Hassan, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 27-31. (E)

Study of some characteristics of the tetraploid mulberry variety.

Etude de quelques caractéristiques de la variété de mûrier tétraploïde.

HA V.P.

1991 *Nong Nghiep va Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 11, 519-520. (V,e)

Inquiry on improving the inducing ratio of tetraploid from clonal mulberry varieties.

Etude sur l'amélioration du taux d'induction de tétraploïdes des variétés de clones de mûriers.

HAN M.Z. et al.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 55-57. (C)

Participation of primary metabolites in the biosynthesis of Diels-Alder type adducts in *Morus alba* callus cultures.

Participation de métabolites primaires dans la biosynthèse des adduits de type Diels-Alder dans les cultures de cals de *Morus alba*.

HANO Y., AYUKAWA A., NOMURA T., UEDA S.

1992 *Tennen Yuki Kagbutsu Toronkai Koen Yoshishu*, Vol. 34, 780-787. (J)

Mulberry cultivation in the acid soils of Bihar and West Bengal.

Culture du mûrier dans les terres acides du Bihar et du Bengale occidental.

KAR R., MAJUMDER S.K., DATTA R.N., SEN S.K.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 19-21. (E)

Effects of nitrogen sources, phosphate and iron on the production of red callus from mulberry, *Morus yoshimurai* Hotta.

Effets des sources d'azote, de phosphate et de fer sur la production des cals rouges du mûrier, *Morus yoshimurai* Hotta.

KIMURA T., YOU S.G., OHNISHI T.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 62(3), 167-170. (J)

Effects of spring frost damage on the growth of mulberry trees.

Effets des dégâts des gelées de printemps sur la croissance des mûriers.

KOBAYASHI T., NAOI T., TAGUTI Y., MASUDA Y.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Acta Seric. Entomol.*, Vol. 7, 55-63. (J)

The growth characteristics of new mulberry (*Morus*) cultivars in Fukushima (Japan).

Les caractéristiques de croissance d'une nouvelle variété de mûrier (*Morus*) cultivée à Fukushima (Japon).

KOYAMA A., FUJITA S., MEGURO Y., KASHIKURA K., URITA S.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 *Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station*, Vol. 24, 51-118. (J)

Effects of iron, manganese and cadmium application on growth of mulberry callus.

Effets du fer, du manganèse et du cadmium sur la croissance des cals de mûrier.

LOU C.F. et al.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 7-11. (C,e)

Simple detection method for the resistance to powdery mildew (*Phyllactinia moricola* Homma) using a mulberry sapling.

Méthode simple de détection de la résistance à la moisissure poudreuse (*Phyllactinia moricola* Homma) en utilisant de jeunes mûriers.

NAGANUMA K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 *Acta Seric. Entomol.*, Vol. 7, 1-7. (J)

Pruning - A beneficial hazard to mulberry.

La taille : un risque bénéfique pour le mûrier.

NAGARAJ B., RAMESH BABU M., BHARGAVA S.K., THIAGARAJAN V.

Regional Sericultural Research Station, Coonoor, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(1), 36-38. (E)

Efficiency of fertilizer nitrogen by absorption mulberry trees in densely planted fields.

Efficacité de l'engrais azoté absorbé par les mûriers dans les mûraies denses.

NOGI T., TAKAKURA S.

Sericultural Experiment Station of Fukushima Prefecture Yanagawamachi, Dategun, Fukushima 960 07, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 63(2), 122-129. (J,e)

Research on *in vitro* propagation of mulberry (*Morus alba* L.).

Recherche sur la propagation *in vitro* du mûrier (*Morus alba* L.).

PONCHIA G., GARDIMAN M.

Padova University, Istituto di Coltivazioni Arboree, Italy.

1991 *Second International Symposium on Propagation of Ornamental Plants, Herzliya, Israël*, 23-28 June 1991. (E)

Foliar sprays for mulberry.

Vaporisateurs foliaires pour les mûriers.

RAO N.B.V., BONGALE U.D., SANAULLA H., DANDIN S.B.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 8-10. (E)

Relationship between ascospore dispersal of *Ciboria shiraiana* and development of popcorn disease on mulberry fruits.

Relation entre la dispersion des ascospores de *Ciboria shiraiana* et le développement de la maladie du pop-corn chez les fruits du mûrier.

SHIMANE T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Acta Seric. Entomol.*, Vol. 7, 27-36. (J,e)

Nitrogen nutrition in mulberry garden.

Fertilisation azotée des mûraies.

SUBBARAYAPPA C.T., SUNDARESWARAN P., SINHA A.K., REDDY M.M.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(1), 7-10. (E)

Does lichen colonization affect quality of mulberry leaves ?

La colonisation par le lichen affecte-t-elle la qualité des feuilles de mûriers ?

THIRIPURASUNDARI M., VIVEKANANDAN M.

School of Life Sciences, Bharathidasan University, Thiruchirapalli, Tamil Nadu, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 32(12), 17-18. (E)

Machine for mulberry cuttings.

Machine pour bouturer de mûriers.

VERMA S., JOHN M., SUBRHAMANYAM M.R., AQUEEL S.A., DATTA R.K.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(1), 21-23. (E)

Differences in the formation of lesions on mulberry varieties infected with sclerotiose and branch blight fungi.

Différences dans la formation des lésions chez les variétés de mûriers infestées par les champignons de la sclérotiose et de la flétrissure des branches.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Acta Seric. Entomol.*, Vol. 7, 37-54. (J)

Differences in the formation of lesions on mulberry varieties infected with dogare blight and twig blight fungi, and production of phytoalexins in the lesions.

Différences dans la formation des lésions chez les variétés de mûriers infestées par les champignons des flétrissures et production de phytoalexines dans les lésions.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Acta Seric. Entomol.*, Vol. 7, 9-25. (J,e)

Effects of the flood on mulberry growth.

Effets des inondations sur la croissance du mûrier.

ZHOU C.X. *et al.*

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 52-54. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B. mori : rearing, feeding, pathology

New methods of increasing resistance of silkworms of nuclear polyhedrosis.

Nouvelles méthodes pour améliorer la résistance des vers à soie à la polyédrose nucléaire.

ALIEV A.G., MUSAEVA M.R.

1991 *Doklady VASKhNIL (Russian Federation)*, Vol. 12, 35-37. (R)

Effect of preparations of plant origin on exciters of diseases of silkworm and mulberry tree.

Effet de préparations d'origine végétale sur les stimulants des maladies chez le ver à soie et le mûrier.

AN E.S., ZAKIROV S.K., CHICHIGINA I.P., AZIMZHDANOV I.M., NUSRATULLAEV O.

1989 *Trudy*, Vol. 23, 79-85. (R)

Prospects of *in vitro* genetic manipulations in mulberry sericulture.

Perspectives des manipulations génétiques *in vitro* pour la sériciculture mûrier.

CHAND P.K., SAHOO Y., PATTHAIK S.K.

NSP Post-graduate Department of Botany, Utkal University, Bhubaneswar, Orissa, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(1), 3-6. (E)

Breeding of new silkworm variety Fanhua x Chunmei for spring rearing.

Élevage de printemps de la nouvelle variété de vers à soie Fanhua x Chunmei.

CHEN H.R., JIN Y.Y., HUANG Z.X., RUAN G.H., YAO L.S.

Sericultural Research Inst., Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 26-29. (C,e)

Selection and breeding work with new sex-labelled breeds of silkworms.

Sélection et travail d'élevage avec de nouvelles souches de vers à soie sexuellement marquées.

CHERNETSOVA N.T., ZAKIROVA K., KURBANOVA M.

1989 *Trudy*, Vol. 23, 63-69. (R)

Study on heating load characteristics and thermal curtain effects for simple silkworm rearing houses. 2. Effects of the thermal curtain on energy preservation and review of its application.

Étude des caractéristiques calorifiques et des effets de rideau thermique pour les magnaneries. 2.

Effets du rideau thermique sur la conservation de l'énergie et son application.

CHOE K.J., JUNG D.H., PARK K.K.

Rural Development Administration, Agricultural Mechanization Institute, Suwon, Korea Republic.

1991 *Journal of the Korean Society for Agricultural Machinery*, Vol. 16(1), 83-89. (K,e)

Check test of the diet efficiency of genetic trimolting larva and induced tri- and tetramolter.

Test de l'efficacité de l'alimentation sur les larves génétiquement trimuantes et les tri- et tétramuantes induites.

DING N., ZHANG S., SHEN J.

Huzhou Municipal Institute of Sericulture, Zhejiang, China.

1992 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 23(4), 16-19. (C)

Principles and techniques of silkworm breeding.

Principes et techniques de sélection chez les vers à soie.

ESCAP (Economic and Social Commission for Asia and the Pacific)

United Nations Building, Rajadamnern Avenue, Bangkok 10200, Thailand.

1993 *International Trade and Economic Cooperation Division, ESCAP*, 114 p. (E)

Identification of muscardine pathogen in Japanese silkworms and the study on its pathogenicity.

Identification du pathogène de la muscardine chez les vers à soie japonais et étude de sa pathogénicité.

GAO Y., LIU S., WU Y.

Shenyang Agricultural University, Department of Plant Protection, Liaoning, China.

1992 *Journal of Shenyang Agricultural University*, Vol. 23(3), 224-226. (C,e)

Study of haemolymph pH of silkworm caterpillars during microsporidiosis.

Etude du pH de l'hémolymphe des chenilles du ver à soie au cours de la microsporidiose.

GARAFUTDINOVA E.A., KASHKAROVA L.F., ZIYAEVA Y.M.

1989 *Trudy*, Vol. 23, 93-96. (R)

Chawki rearing : polythene sheet to replace paraffin paper.

Elevage des jeunes vers à soie : feuille de polyéthylène en remplacement du papier paraffiné.

GEETHADEVI R.G., VINDHYA G.S., DAS M.R., RAJAN R.K., HIMANTHRAJ M.T.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 32(12), 11-12. (E)

Study on smoking disinfectant Xun Du Wei for silkworm disinfectant.

Etude sur le désinfectant fumant Xun Du Wei utilisé pour la désinfection des vers à soie.

GONG C.L., ZHU J.S., PAN Z.H.

Suzhou Sericulture College, Wuxian 215151, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 35-38. (C,e)

Distribution of mycotoxin-producing *Aspergillus* in Japan.

Distribution d'*Aspergillus* produisant de la mycotoxine au Japon.

GOTO T., TANAKA K., TSURUTA O., MANABE M.

National Food Research Institute, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1990 *Report of National Food Research Institute*, Vol. 54, 10-13. (J,e)

Application of inducing trimolter in breeding, *Bombyx mori*.

Utilisation de l'inducteur de trimuants dans l'élevage de *Bombyx mori*.

HE Y.Y., HE S.M.

The Sericultural Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 30-34. (C,e)

N-(13C=O)Acetylchitosan and its digestibility by silkworms.

N-(13C=O)Acétylchitosan et sa digestibilité chez les vers à soie.

HIRANO S., YOSHIDA S., TAKABUCHI N.

1993 *Carbohydr. Polym.*, Vol. 22(2), 137-140. (E)

Selection of the high parthenogenetic lines and examinations of their practical characters in commercial F1 hybrid races of the silkworm, *Bombyx mori*.

Sélection des lignées hautement parthénogénétiques et étude de leurs caractères pratiques chez les races d'hybrides commerciaux F1 du ver à soie *Bombyx mori*.

HIROKAWA M.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station, Vol. 24, 1-6. (J,e)

Breeding of tagwanjam, a double cross hybrid and high silk yielding silkworm variety for spring rearing season.

Élevage de tagwanjam, un double hybride et une variété de vers à soie à haut rendement de soie pour l'élevage de printemps.

HONG K.W., RYU K.S., KANG P.D., LEE S.P., CHOI S.R., HWANG S.J.

Rural Development Administration, Sericultural Experiment Station, Suwon, Korea Republic.

1993 RDA Journal of Agricultural Science (Korea Republic), Vol. 35(1), 795-799. (K,e)

On the occurrence of malformed cocoons at sericultural farms and its factors.

Sur la présence et les causes de cocons malformés chez les fermiers.

KASHIKURA K., OTA T.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station, Vol. 24, 7-16. (J)

Contaminations on cocoon layer silkworm infected nuclear polyhedrosis under cooking.

Contaminations des coques soyeuses de vers à soie infestés par le virus de la polyédrose nucléaire pendant la cuisson.

KOBAYASHI H., ONO K.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture, Vol. 6, 61-62. (J)

Analysis of the amount of moisture from evaporation released by the silkworm during mounting.

Analyse de la quantité d'humidité provenant de l'évaporation produite par le ver à soie pendant la montée.

KOBAYASHI K.

Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya Saitama 360, Japan.

1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(2), 116-121. (J,e)

Estimation of the level of temperature decrease caused by the latent heat of evaporation in the mounting space during mounting of silkworm.

Estimation du niveau de chute de la température causée par la chaleur latente de l'évaporation dans l'encabanage au cours de la montée du ver à soie.

KOBAYASHI K.

Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya Saitama 360, Japan.

1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(2), 135-139. (J,e)

Studies on control of bacterial disease at the silkworm eggs production.

Études sur la lutte contre la maladie bactérienne au cours de la production des oeufs de vers à soie.

KOYAMA C.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture, Vol. 6, 61-62. (J)

Bivoltine silkworm breeding training : an experience.

Formation à l'élevage des vers à soie bivoltins : une expérience.

KUMAR P.

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, India.

1994 Indian Silk, Vol. 33(2), 35-38. (E)

Isolation and identification of cecropin antibacterial peptides from the extracellular matrix of the insect tegument.

Isolement et identification des peptides antibactériens de la cécropine à partir de la matrice extracellulaire du tégument d'insecte.

LEE W.J., BREY P.T.

Institut Pasteur, Unité Ecol. Syst. Vectoriels, 25 rue Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

1994 Analytical Biochemistry, Vol. 217(2), 231-235. (E)

Disinfection effect of a new paraformaldehyde fumigant on silkworm pathogens.

Effet désinfectant d'un nouveau fumigène à la paraformaldéhyde sur les pathogènes du ver à soie.

LEE Y.K., LEE J.C.

Rural Development Administration, Sericultural Experiment Station, Suwon, Korea Republic.

1993 RDA Journal of Agricultural Science (Korea Republic), Vol. 35(1), 787-790. (K,e)

'Fang Wei Ling' used to control microspora on silkworm larva of original race.

"Fang Wei Ling" utilisé pour lutter contre les microspores sur les larves de vers à soie des races mères.

LIAO S., FANG D., LIU S.

Guangdong Provincial Academy of Agricultural Sciences, Institute of Silkworm, Guanzhou, China.

1992 Guangdong Agricultural Sciences, Vol. 1, 41-42, 37. (C)

Produce F1 hybrid seeds by inducing sex-limited races to trimolting.

Production d'hybrides F1 par induction de trimuants chez des races à marquage sexuel.

LU X.F. *et al.*

1994 Canye Kexue, Vol. 20(1), 60-61. (C)

Studies on linear programming for low cost artificial diets of silkworm larva by means of personal computer programs.

Etudes de la programmation linéaire sur micro-ordinateur pour formuler des aliments artificiels à bas prix pour les vers à soie.

MACHIDA J.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture, Vol. 6, 45-50. (J)

Potentiality of Indian and Japanese hybrids.

Potentialité des hybrides indiens et japonais.

MANO Y., DATTA R.K., REDDY M.N., BASAVARAJA H.K., KUMAR S.N., KUMAR N.S.

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

1994 Indian Silk, Vol. 33(2), 5-7. (E)

Discussion of water cooling process on the production of artificial diets.

Discussion du procédé de refroidissement de l'eau pour la production des milieux artificiels.

MIYAZAWA F., MACHIDA J.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture, Vol. 6, 51-52. (J)

Effect of light and temperature upon growth, oviposition and yarn quality of the original strain of silkworm bred on artificial diet.

Effet de la lumière et de la température sur la croissance, l'oviposition et la qualité du fil de la souche originelle de vers à soie élevée sur milieu artificiel.

MOON B.W., CHOI C.H., HA N.G.

Chinju National Agricultural and Forestry Technical College, Chinju, Korea Republic.

1992 *Research Reports of the Rural Development Administration, Vol. 34 (Agri. Institutional Coop.)*, 27-35. (K,e)

Genetic studies on tropical races of silkworm (*Bombyx mori*) with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. 1. Genetic nature of the tropical multivoltine strain Cambodia.

Etudes génétiques des races tropicales de vers à soie (*Bombyx mori*) avec une référence spéciale à la stratégie d'hybridation entre les races tropicales et tempérées. 1. Nature génétique de la race tropicale polyvoltine Cambodge.

MURAKAMI A., OHTSUKI Y.

National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Japan.

1989 *JARQ, Vol. 23(1)*, 37-45. (E)

Effect produced by mulberry leaves from plantations subjected to long term herbicide treatment on silkworms from breeding feedings.

Effet produit sur les vers à soie par les feuilles de mûriers provenant de plantations soumises à un traitement herbicide à long terme.

NACHEVA J., PENKOV I., PETKOV N.

Experimental Station of Sericulture, Mito Ozorov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1992 *Animal Science, Vol. 29(1-2)*, 94-98. (Bg, e,r)

Effect of silicon-organic compounds on productivity of silkworms during various seasons of worm nutrition.

Effet des composés organiques du silicone sur la productivité des vers à soie au cours des différentes périodes de nourrissage des vers.

NASIRILLAEV U.N., D'YAKOV V.M., PARPIEV B.A.

1989 *Trudy, Vol. 23*, 30-36. (R)

Effect of air electroionization in incubator on silkworm egg revival and productivity of silkworm.

Effet de l'électroionisation de l'air dans l'incubateur sur le réveil des oeufs et la productivité des vers à soie

NUMANOV M.I., KHILOYATOVA M.M., KLIMENKO V.I.

1989 *Trudy, Vol. 23*, 48-53. (R)

Biostimulant effect of Darydah thermal water in silkworm breeding on eggs and caterpillar development.

Effet biostimulant de l'eau thermale de Darydah pour l'élevage du ver à soie sur le développement des oeufs et des chenilles.

NUMANOV M.I., KURBANOV M.I.

1989 *Trudy, Vol. 23*, 53-63. (R)

Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm breeding environments.

Etude comparative de la fréquence et du sérotype flagellaire de *Bacillus thuringiensis* dans les sols et l'environnement des élevages de vers à soie.

OHBA M., ARATAKE Y.

Kyushu University, Faculty of Agriculture, Institute of Biological Control, Fukuoka 812, Japan.

1994 *J. Appl. Bacteriology, Vol. 76(3)*, 203-209. (E)

Studies and elaboration of artificial nutrient mixtures for the mulberry silkworm.

Etudes et élaboration de nourritures artificielles pour le ver à soie du mûrier.

OVESENSKA L., GENOVA E., PEEVA D.

Vissh Institut po Zootekhnika i Veterinarna Meditsina, Stara Zagora, Bulgaria.

1992 *Animal Science*, Vol. 29(1-2), 88-93. (Bg,e,r)

Magnesium chlorate as biostimulator for caterpillars (of silkworms), defoliant for mulberry.

Le chlorate de magnésium, biostimulant pour les chenilles (du ver à soie), défoliant pour le mûrier.

PARPIEV B.A.

1989 *Trudy*, Vol. 23, 36-44. (R)

Effect of casein addition to mulberry leaves on productive and reproductive features of silkworm.

Effet de l'addition de caséine aux feuilles de mûriers sur les caractères de production et de reproduction du ver à soie.

PARPIEV B.A., LAMM G.Y., AZIMOVA I.M., KHAMIDOVA Z.B.

1989 *Trudy*, Vol. 23, 44-48. (R)

Study on adaptation of Chinese bivoltine silkworm breeds on highland.

Etude de l'adaptation des souches de vers à soie chinois bivoltins dans les régions montagneuses.

PHINAI H., WANCHAI S., SERANI W.

Department of Agriculture, Sericultural Research Institute, Bangken, Bangkok 10900, Thailand.

1986 *Dept of Agriculture, Bangkok, Thailand, Seminar Report 1986 : Highland Crops*, 51. (Th)

Study on adaptation of Japanese bivoltine silkworm breeds on highland.

Etude de l'adaptation des souches de vers à soie japonais bivoltins dans les régions montagneuses.

PHINAI H., WANCHI S., SERANI W.

Department of Agriculture, Sericultural Research Institute, Bangken, Bangkok 10900, Thailand.

1986 *Dept of Agriculture, Bangkok, Thailand, Seminar Report 1986 : Highland Crops*, 50. (Th)

Establishment of stable techniques to produce fine uniform size of cocoon filament for new uses. 5. Relationship of rearing condition to cocoon productivity during the 4th and 5th instar of fine filament spinning breed of silkworm.

Etablissement de techniques stables pour produire un diamètre uniforme fin de filament de cocons en vue de nouvelles utilisations. 5. Relations entre les conditions d'élevage au cours des 4^e et 5^e stades et la productivité des cocons chez une race de ver à soie donnant un filament fin.

SAITO T.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 *Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture*, Vol. 6, 25-28. (J)

Establishment of stable techniques to produce fine uniform size of cocoon filament for new uses. 4. On the mounting conditions for fine size cocoon filament.

Etablissement de techniques stables pour produire un diamètre uniforme fin de filament de cocons en vue de nouvelles utilisations. 4. Les conditions de montée pour un filament de cocon de taille fine.

SAITO T.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 *Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture*, Vol. 6, 21-24. (J)

A primary study on serology of the pathogenic fungi of silkworm, *Bombyx mori* L.

Etude sérologique préliminaire des champignons pathogènes du ver à soie *Bombyx mori* L.

SHI L.G. et al.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 47-48. (C)

Establishment of stable techniques to produce fine uniform size of cocoon filament for new uses.

2. Effects of nutritional factor on the size of cocoon filament of *Bombyx mori*.

Etablissement de techniques stables pour produire un diamètre uniforme fin de filament de cocons en vue de nouvelles utilisations. 2. Effets du facteur nutritionnel sur la taille du filament du cocon chez *Bombyx mori*.

SHIMIZU O.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 *Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture*, Vol. 6, 9-14. (J)

Improved method of sun drying of cocoons using black cloth.

Méthode améliorée de séchage des cocons au soleil par l'utilisation de tissu noir.

SHIROL M.M., NADIGER G.S., SOMASHEKAR T.H.

Central Silk Technological Research Institute, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore 560 068, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 32(12), 23-27. (E)

Effect of transportation of bivoltine seed cocoons on melting and egg production.

Effet du transport des cocons bivoltins destinés au grainage sur les taches et la production d'oeufs.

SHIVAKUMAR G.R., HIMANTHRAJ M.T., RAJAN R.K., MAGADUM S.B., DATTA R.K.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 23-24. (E)

Cold storage of bivoltine female silkworm moths.

Conservation au froid des papillons femelles de vers à soie bivoltins.

SINGH G.P., MATHUR V.B., KAMBLE C.K., DATTA R.K.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 25-26. (E)

On a simple method of precocious trimolter silkworms (*Bombyx mori*) inducement used by an imidazole derivative SSP-11W and their rearing techniques.

Une méthode simple d'activation précoce des vers à soie trimuants (*Bombyx mori*) grâce à un dérivé d'imidazole SSP-11W et leurs techniques d'élevages.

TAKAYAMA H.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 *Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station*, Vol. 24, 43-50. (J)

Rearing results on rearing bed with simple warming function at early winter rearing.

Résultats d'élevage sur des claies chauffantes pour les élevages du début de l'hiver.

TAKAYAMA H., MEGURO Y., OTA T.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 *Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station*, Vol. 24, 17-23. (J)

On the improved rearing systems for a thin filament silkworm (*Bombyx mori*) race Akebono in Fukushima (Japan).

Systèmes d'élevage améliorés pour la race Akebono de vers à soie (*Bombyx mori*) produisant un filament fin à Fukushima (Japon).

TAKAYAMA H., OTA T.

Fukushima-ken, Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Japan.

1990 *Bulletin of the Fukushima Sericultural Experiment Station*, Vol. 24, 43-50. (J)

Study on hybrid bivoltine silkworm races at 1.000 meters above sea level.

Etude sur des hybrides de vers à soie bivoltins à 1 000 mètres au dessus du niveau de la mer.

WANCHAI S., BANDIT C., PHINAI H.

Department of Agriculture, Sericultural Research Institute, Bangken, Bangkok 10900, Thailand.

1986 *Dept of Agriculture, Bangkok, Thailand, Seminar Report 1986 : Highland Crops*, 49. (Th)

Study on pure bivoltine silkworm races at 1.000 meters above sea level.

Etude sur des races pures de vers à soie bivoltins à 1 000 mètres au dessus du niveau de la mer.

WANCHAI S., BANDIT C., PHINAI H.

Department of Agriculture, Sericultural Research Institute, Bangken, Bangkok 10900, Thailand.

1986 *Dept of Agriculture, Bangkok, Thailand, Seminar Report 1986 : Highland Crops*, 48. (Th)

Time investigation of *Bombyx mori* pebrine occurrence in transovarially transmitted progeny population.

Etude dans le temps de la présence de pébrine de *Bombyx mori* chez les descendants contaminés par voie transovarienne.

WANG H.L. *et al.*

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 45-46. (C)

Studies on young silkworm rearing with artificial diet. 1. Effect on larval growth and cocoon quality.

Etudes sur l'élevage des jeunes vers à soie sur milieu artificiel. 1. Effet sur la croissance larvaire et la qualité des cocons.

WU X., XU J., MA X.

Zhejiang Agricultural University, Department of Sericulture, Hangzhou, China.

1992 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 23(3), 42-43. (C)

Labor saving approach to rearing of young silkworms with new cover material (holed polyethylene film).

Gain de temps pour l'élevage des jeunes vers à soie grâce à un nouveau matériau couvrant (film en polyéthylène perforé).

YOMODA M., SAITO T., SUDA C.

Gunma-ken, Sericultural Experiment Station, Maebashi, Japan.

1989 *Gunma Journal of Agricultural Research, Series B, Sericulture*, Vol. 6, 37-40. (J)

Evaluation of appraisal results of new silkworm (*Bombyx mori*) races in Zhejiang province (China).

Evaluation des résultats de nouvelles races de vers à soie (*Bombyx mori*) dans la province de Zhejiang (Chine).

YUAN G., HUANG Z., CHEN H.

Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Institute of Sericulture, Hangzhou, China.

1992 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 23(2), 9-13. (C)

Breeding of variety Qiufeng x Baiyu for summer-autumn rearing.

Elevage d'été-automne de la variété Qiufeng x Baiyu.

ZHANG P.Z., JI P., SHEN X.H., CHEN X.H., ZHU S.J.

The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengjiang 212018, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 17-25. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Moulting behaviour of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury.

Comportement au cours des mues du ver à soie tropical tasar *Antheraea mylitta* Drury.

CHAUDHURY A., SINHA A.K.

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

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 39-43. (E)

Three parasitoids of Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Trois parasites du ver à soie du chêne japonais *Antheraea yamamai*.

HU C. *et al.*

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 58-59. (C)

Bark eater of muga food plants.

Le mangeur d'écorce des plantes nourricières du muga.

NEGI B.K., SENGUPTA A.K.

National Silkworm Seed Project, N° 17 National High School Road, Visveswarapuram, Basavanagudi, Bangalore 560 004, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 33(2), 45-49. (E)

Reproduce nuclear polyhedrosis virus by tussah pupa.

Reproduction du virus de la polyédrose nucléaire sur des chrysalides tussah.

XIE B.Q. *et al.*

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 64-65. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Dihybrids in silkworms (*Bombyx mori* L.) of Chinese type.

Dihybrides chez les vers à soie (*Bombyx mori* L.) de type chinois.

ABADZHIEVA R., NAKOVA T.

Institut po Zhivotnov"dstvo, Kostinbrod, Bulgaria.

1992 *Genetics and Breeding*, Vol. 25(5), 445-449. (Bg,e)

Transferring synthetic antibacterial peptide gene from chinese oak silkworm into mulberry plant by using Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*.

Transfert du gène synthétique du peptide antibactérien du ver à soie du chêne chinois chez le mûrier par utilisation du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

GUAN Z.W., ZHANG Q.J., ZHUANG C.X., HUANG Z.R., TAN Z.D., KONG L.W. *et al.*

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 1-6. (C,e)

Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Expression et caractérisation de la protéine-2 morphogénétique de l'os humain chez des vers à soie infestés par le virus recombinant de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

ISHIDA N., TSUJIMOTO M., KANAYA T., SHIMAMURA A., TSURUOKA N. *et al.*

Suntory Institute of Biomedical Research, Osaka, Osaka 618, Japan.

1994 *Journal of Biochemistry*, Vol. 115(2), 279-285. (E)

Genetic analysis on bave characters of silkworm by dialled crosses.

Analyses génétiques des caractères de la bave chez le ver à soie par croisements dialléliques.

JEONG W.B.

Dong-A University, Pusan, Korea Republic.

1990 *Research Reports of Korea Republic Technology Research Institute-Dong-A University*, Vol. 11(1), 57-66. (K,e)

Heterosis, inbreeding depression and combining ability of bave characters in silkworm by dialled crosses.

Hétérosis, abaissement de la consanguinité et capacité combinatoire pour les caractères de la bave chez le ver à soie par croisements dialléliques.

JEONG W.B., CHOI J.S., BAE K.S., SOHN H.D.

Dong-A University, Pusan, Korea Republic.

1990 *Research Reports of Korea Agricultural Technology Research Institute-Dong-A University*, Vol. 11(1), 49-56. (K,e)

Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene.

Structure hautement répétitive du gène de la fibroïne et son organisation.

MITA K., ICHIMURA S., JAMES T.C.

Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences, Anagawa, Chiba 263, Japan.

1994 *J. Mol. Evol.*, Vol. 38, 583-592. (E)

CryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* : DNA sequence analysis and insecticidal activity.

Gène CryIA(b) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* : analyse de la séquence d'ADN et activité insecticide.

NAKATANI I., ASANO S.

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 63(2), 140-148. (J,e)

Loss of phylogenetic information in chorion gene families of *Bombyx mori* by gene conversion.

Perte d'informations phylogénétiques dans les familles de gènes du chorion de *Bombyx mori* par conversion de gène.

REGIER J.C., WIEGMAN B.M., LECLERC R.F., FRIEDLANDER T.P.

1994 *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 11, 72-87. (E)

Heterosis studies on cocooning, pupation, pupal weight and pupal duration in silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes de l'hétérosis sur le filage, la pupaison, le poids de la chrysalide et la durée nymphale chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

SATENAHALLI S.B., GOVINDAN R., GOUD J.V.

Department of Sericulture, College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, Dharwad 580 005, India.

1991 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 25(3), 338-340. (E)

Use of behaviour parameters in *Bombyx mori* breeding.

Utilisation des paramètres du comportement pour les croisements chez *Bombyx mori*.

SHABALINA A.

Institut po Zhivotnov"dstvo, Kostinbrod, Bulgaria.

1992 *Genetics and Breeding*, Vol. 25(4), 340-345. (Bg,e)

The promoter elements and transcription factor interaction required for the formation of transcription complexes on a 5S RNA gene of *Bombyx mori*.

Les éléments promoteurs et l'interaction avec les facteurs de transcription nécessaires pour la formation des complexes de transcription sur un gène d'ARN 5S de *Bombyx mori*.

SMITH T.P.L.

1992 *PhD, University of Eugene, Oregon, U.S.A.* (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Sex pheromone biosynthesis of the silkworm moth and its hormonal regulation.

Biosynthèse de la phéromone sexuelle du papillon du ver à soie et sa régulation hormonale.

ANDO T.

Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Agriculture, Fuchu, Japan.

1992 Plant Protection, Vol. 46(3), 114-118. (J)

Primary studies on the moth emergency habit of some commercial silkworm (*Bombyx mori*) races and its utilization.

Premières études sur le comportement d'émergence du papillon de quelques races de vers à soie commerciaux (*Bombyx mori*).

CAO J.

Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Institute of Sericulture, Hangzhou, China.

1992 Bulletin of Sericulture, Vol. 23(2), 37-40. (C)

Dynamics of alpha tocopherol and cholesterol contents in tussah (*Antheraea pernyi*) pupae during temperature-sensing period.

Dynamique des taux de cholestérol et d'alpha-tocophérol chez les chrysalides tussah (*Antheraea pernyi*) au cours de la période sensible à la température.

FAN Y.L., BAI X.J., LI Y.H.

Jilin Agricultural University, Changchun, China.

1992 Journal of Jilin Agricultural University, Vol. 14(3), 72-74, 78. (C)

Summary and perspectives of research and development in the field of insects biochemistry (silkworm).

Résumé et perspectives de la recherche et du développement dans le domaine de la biochimie des insectes (ver à soie).

FILIPPOVICH Y.B., EGOVA T.A., NASIRILLAIEV U.N., KUTUZOVA N.M. *et al.*

1989 Trudy, Vol. 23, 12-30. (R)

Purification and characterization of a lectin-like substance from silkworm feces.

Purification et caractérisation d'une substance analogue à la lectine à partir des fèces du ver à soie.

HIRAYAMA E., ISHIKAWA N., YANO-INOUE T., KIM J.

1993 Cell Struct. Funct., Vol. 18(3), 161-171. (E)

Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

Activité létale d'un inhibiteur de tréhalase, la validoxylamine A et son influence sur la glycémie de *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

KONŌ Y., TAKEDA S., KAMEDA Y., TAKAHASHI M., MATSUSHITA K., NISHINA M., HORI E.

1993 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 28(3), 379-386. (E)

Study on fluorescence of silkworm larval blood, liquid substance in silk gland and cocoon shell.
Etude de la fluorescence du sang des larves, de la substance liquide dans la glande séricigène et dans la coque du cocon.

LIN C.Q. *et al.*

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 43-44. (C)

Age and sex-dependent alterations in protein and estrase isoenzymes in a bivoltine strain of silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera).

Altérations liées à l'âge et au sexe dans les protéines et les isozymes de l'estérase dans une souche bivoltine de ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera).

MANJULA A.C., RAVANASIDDAIAH H.M., RAJANNA K.L., YADAV P.R.

1993 *Biochem. Arch.*, Vol. 9(3), 241-251. (E)

Eclosion hormone-like immunoreactivity in the nervous system of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) and *Antheraea yamamai* (Lepidoptera : Saturniidae) before and after hatching.
Immunoréactivité d'un analogue à l'hormone d'éclosion dans le système nerveux de *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) et *Antheraea Yamamai* (Lepidoptera : Saturniidae) avant et après l'éclosion.

NAYA S.I., SUZUKI K., FUGO H., SEHNAL F.

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan.

1994 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 91(2), 189-196. (E)

Reduction of the acyl group : the critical step in bombykol biosynthesis that is regulated in vitro by the neuropeptide hormones in the pheromone gland of *Bombyx mori*.

Réduction du groupe acyle : le point critique dans la biosynthèse du bombykol régulée in vitro par les hormones neuropeptidiques dans la glande à phéromone de *Bombyx mori*.

OZAWA R.A., ANDO T., NAGASAWA H., KATAOKA H., SUZUKI A.

1993 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 57(12), 2144-2147. (E)

Effect of cadmium-treated mulberry leaves on the requisite inorganic element contents in silkworm.

Effet des feuilles de mûriers traitées au cadmium sur les taux des éléments inorganiques nécessaires chez le ver à soie.

PARK J.J., MOON B.W., BAE D.G., CHOI J.S.

Dong-A University, Pusan, Korea Republic.

1990 *Research Reports of Korea Agricultural Technology Research Institute-Dong-A University*, Vol. 11(1), 41-48. (K,e)

Occurrence of xanthommatin containing pigment granules in the epidermal cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Présence de granules contenant de la xanthommatine dans les cellules de l'épiderme du ver à soie *Bombyx mori*.

SAWADA H., TSUSUE M., YAMAMOTO T., SAKURAI S.

Biological Laboratory, School of Liberal Arts, Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Sagami-hara City 228, Japan,

1990 *Insect Biochemistry*, Vol. 20(8), 785-792. (E)

Isolation of chitinase inhibitor-producing microorganisms and their inhibitory effect on larval-pupal ecdysis.

Isolement des micro-organismes producteurs des inhibiteurs de chitinase et leur effet inhibiteur sur l'ecdysis larvo-nymphale.

SEONG S.I., KIM K., SUNG N.M., KANG H.A.

University of Suwon, Institute of Genetic Engineering, Suwon, Korea Republic.

1992 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 34(2), 1-5. (K,e)

Results of selection for larvae locomotor behaviour in *Bombyx mori* L.

Résultats de la sélection sur le comportement locomoteur des larves chez *Bombyx mori*.

SHABALINA A.

Institut po Zhivotnov"dstvo, Kostinbrod, Bulgaria.

1992 *Genetics and Breeding*, Vol. 25(1), 84-90. (Bg,e)

Responses of maxillary sensilla stylonica in *Bombyx mori* to glucosides from *Osmunda japonica*, a non-host plant.

Réponses des sensilles stylonica des maxillaires chez *Bombyx mori* aux glucosides de *Osmunda japonica*, une plante non-hôte.

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

1993 *J. Chem. Ecol.*, Vol. 19(11), 2501-2512. (E)

Purification and some properties of soluble beta-fructofuranosidase from larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et quelques propriétés de la beta-fructofuranosidase soluble de l'intestin moyen de la larve du ver à soie *Bombyx mori*.

SUMIDA M., YUAN X.L., MATSUBARA F.

1994 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 107B, 273-284. (E)

Different feeding and gustatory responses to ecdysone and 20-hydroxyecdysone by larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Réponses alimentaires et gustatives différentes à l'ecdysone et à la 20-hydroxyecdysone chez les larves du ver à soie *Bombyx mori*.

TANAKA Y., ASAOKA K., TAKEDA S.

1994 *J. Chem. Ecol.*, Vol. 20(1), 125-133. (E)

Ecdysone and 20-hydroxyecdysone supplements to the diet affect larval development in the silkworm, *Bombyx mori*, differently.

L'addition d'ecdysone et de 20-hydroxyecdysone dans la nourriture du ver à soie *Bombyx mori* affecte son développement larvaire de façon différente.

TANAKA Y., TAKEDA S.

1993 *J. Insect Physiol.*, Vol. 39, 805-809. (E)

Observation of the formation of secretion in colleterial glands of *Bombyx mori* by electron microscope.

Observation au microscope électronique de la formation de la sécrétion dans les glandes collatérales chez *Bombyx mori*.

XIANG Y., MORI T., FUGO H.

Suzhou Sericultural College, Suzhou 215151, China.

1994 *Canye Kexue*, Vol. 20(1), 39-42. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Influence of low temperature on amino acid pool in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Influence des basses températures sur la réserve d'acides aminés dans les oeufs du ver à soie *Bombyx mori*.

FURASAWA T., ISHIHARA R.

Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 130-134. (J,e)

Controlled ecdysteroid accumulation in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by an imidazole compound (KK-42) and embryogenesis in these eggs.

Accumulation d'ecdystéroïdes dans les oeufs du ver à soie *Bombyx mori*, contrôlée par un composé d'imidazole (KK-42) et embryogénèse dans ces oeufs.

KADONOOKUDA K., AMORNSAK W., YAMASHITA O.

Nagoya University, School of Agriculture, Sericultural Science Laboratory, Chikusa-ku, Nagoya 46401, Japan.

1994 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 25(2), 121-135. (E)

Protection of overwintering ova of mulberry feeding silkworm deposited in spring in Liaoning province of China.

Protection des oeufs de vers à soie du mûrier en hivernage déposés au printemps dans la province du Liaoning en Chine.

MA C., ZONG Y., MING S.

Shenyang Agricultural University, Department of Plant Protection, Lianing, China.

1992 *Journal of Shenyang Agricultural University*, Vol. 23(3), 240-242. (C,e)

Reassessment of changes in substrate specificity of aldolase isozymes during embryogenesis in *Bombyx mori*.

Réévaluation des variations de la spécificité vis à vis du substrat des isozymes de l'aldolase au cours de l'embryogénèse chez *Bombyx mori*.

NAGAOKA S., YASUSI S., YARA M.

Laboratory of Sericulture, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 171-173. (E)

Melanization and reddish coloration hormone (MRCH) activity in developing embryos of the saturniid silkmoth, *Samia cynthia ricini* Donovan.

Activité de l'hormone de mélanisation et de coloration rougeâtre (MRCH) chez les embryons en développement du papillon du ver à soie saturnidé *Samia cynthia ricini* Donovan.

SAITO H., MUKAIYAMA F

Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Agriculture, Fuchu, Japan.

1990 *Applied Entomology and Zoology*, Vol. 25(4), 415-421. (E)

Chemical structure and biosynthesis mechanisms of diapause hormones in silkworm.

Structure chimique et mécanismes de la biosynthèse des hormones de diapause chez le ver à soie.

SATO Y., YAMASHITA O.

Nagoya University, School of Agriculture, Sericultural Science Laboratory, Chikusa-ku, Nagoya 46401, Japan.

1993 *Tracer (Nagoya)*, Vol. 14, 4-5. (E)

Investigation of the accumulated temperature for parent egg incubation and control experiment of two incubation methods.

Etude sur l'accumulation de température pour l'incubation des oeufs et expérimentation de deux méthodes d'incubation.

TANG W., LU S., CHEN H.

Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Institute of Sericulture, Hangzhou, China.

1992 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 23(4), 23-24. (C)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Concerted gene expressions in elicited fibroin synthesis.

Expression concertée des gènes dans la synthèse de la fibroïne.

CANDELAS G.C., ARROYO G., CARRASCO C., CARRASQUILLO E., PLAZAOLA A. *et al.*
Universidad de Puerto Rico, Departamento de Biología, PO Box 23360, San Juan, PR 00931-3360,
Puerto Rico.

1993 *Translational Regulation of Gene Expression*, Vol. 2, 251-264. (E)

Importance of unique silk proteins to the ecological and evolutionary diversity of araneid spiders.

Importance des protéines de la soie pour la diversité écologique et évolutionniste des araignées.

CRAIG C.L.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 59-66. (E)

Differences in silk protein secretion among the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*, the Chinese wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and their hybrid.

Différences dans la sécrétion des protéines de la soie entre les glandes séricigènes du ver à soie *Bombyx mori*, du ver à soie sauvage chinois *Bombyx mandarina* et de leur hybride.

DAI P., IWASHITA Y., KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Tochigi 321, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 149-156. (J,e)

DNA polymerase alpha-primase complex from the silk glands of the non-mulberry silkworm, *Philosamia ricini*.

Complexe ADN polymérase-primase alpha chez les glandes séricigènes du ver à soie non-mûrier *Philosamia ricini*.

NIRAJANAKUMARI S., GOPINATHAN K.P.

Indian Institute of Science, Department of Microbiology and Cell Biology, Bangalore 560012,
Karnataka, India.

1994 *Biochemical Journal*, Vol. 298(part 3), 529-535. (E)

Biochemical action of vertebrates hormones on the silk gland, fat body and gonads of silkworm, *Bombyx mori*.

Action biochimique des hormones de vertébrés sur la glande séricigène, le corps adipeux et les gonades du ver à soie *Bombyx mori*.

REDDY K.V.R., MAGADUM S.B., REMADEVI O.K., BENCHAMIN K.V., DATTA R.K.

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

1992 *J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol.*, Vol. 4(2), 82-88. (E)

Silk gland-specific tRNA(ALA) genes interact more weakly than constitutive tRNA(ALA) genes with silkworm TfIIIb and polymerase III fractions.

Les gènes du tRNA-Ala spécifique de la glande séricigène interagissent plus faiblement avec les fractions TfIIIb et la polymérase III du ver à soie que les gènes tRNA-Ala constitutifs.

SULLIVAN H.S., YOUNG L.S., WHITE C.N., SPRAGUE K.U.

University of Oregon, Institute of Molecular Biology, Eugene, OR 97403, USA.

1994 Molecular and Cellular Biology, Vol. 14(3), 1806-1814. (E)

Silk glands of araneid spiders. Selected morphological and physiological aspects.

Glandes séricigènes des araignées. Aspects morphologiques et physiologiques.

TILLINGAST E.K., TOWNLEY M.A.

1994 ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology. (E)

Soie

Silk

Structural evolution of genetically engineered silk-like proteins polymers.

Evolution structurelle des polymères analogues à la soie génétiquement manipulés.

ANDERSON J.P., STEPHEN-HASSARD M., MARTIN D.

1994 ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology, 137-147. (E)

The studies of low temperature dyeing on silk fibers. 1. Low temperature dyeing of silk fiber in the milling type acid dye.

Etudes sur la teinture à basse température des fibres de soie. 1. Teinture à basse température de la fibre de soie dans un bain acide à remous.

BAE D.G., BAE H.S., CHUNG T.A.

Korea Silk Research Institute, Chinju, Korea Republic.

1992 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 34(2), 52-57. (K,e)

X-ray moduli of silk fibers from *Nephila clavipes* and *Bombyx mori*.

Analyse aux rayons X des fibres soyeuses de *Nephila clavipes* et *Bombyx mori*.

BECKER M.A., MAHONEY D.V., LENHERT P.G., EBY R.K., KAPLAN D., ADAMS W.W.

1994 ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology, 185-195. (E)

Silk and silk proteins from two aquatic insects.

Soie et protéines de soie de deux insectes aquatiques.

CASE S.T., POWERS J., HAMILTON R., BURTON M.J.

1994 ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology, 80-90. (E)

Study on the sericin gumming methods for floss fiber and their effects.

Etude sur les méthodes de gommage à la séricine pour les fibres de blaze et leurs effets.

CHEN C., LIU G.

1991 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 8(3), 6-10. (C)

A preliminary study of steam drying of silkworm cocoons.

Etude préliminaire sur l'étouffage à la vapeur des cocons de vers à soie.

CHIN S.R., DHEN J.Y., MUJUMBDAR A.S.

Zhejiang Institute of Silk Textiles, Hangzhou, China.

1992 Drying Technology, Vol. 10(1), 251-260. (E)

Mechanical properties of major ampullate gland silk fibers extracted from *Nephila clavipes* spiders.

Propriétés mécaniques des protéines de la soie de la glande ampoulaire principale des araignées *Nephila clavipes*.

CUNNIFF P.M., FOSSEY S.A., AUERBACH M.A., SONG J.W.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 234-251. (E)

Effects of cooking duration and Na₂CO₃ conc. in reeling bath on wet reeling of tropical tasar silk.

Effets de la durée de l'étouffage et de la concentration de Na₂CO₃ dans le bain de dévidage de la soie tasar tropicale.

DAS S., CHOWDHURY S.K., DAS N.K.

1993 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 18(2), 79-81. (E)

Dyeing properties of a disperse dye and a reactive disperse dye for *Antheraea yamamai*.

Propriétés colorantes d'une teinture dispersée et d'une teinture dispersée réactive pour *Antheraea yamamai*.

DOUMYOU M., SHIMIZU Y., NAKAJIMA T., KIMURA M.

Shiga Prefectural Junior College, Hikone 522, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 164-166. (J)

Polyacrylamide gel electrophoresis of *Bombyx mori* silk proteins. 3. Isoelectric focusing and two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of silk proteins.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines de soie de *Bombyx mori*. 3. Séparation isoélectrique et électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines de la soie.

FENG Y., CHEN B., LIU H.

1992 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 9(2), 1-5. (C)

Polyacrylamide gel electrophoresis of *Bombyx mori* silk proteins. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of dissociated and non-dissociated systems of silk protein.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines de soie de *Bombyx mori*. 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en systèmes dissolvant et non dissolvant.

FENG Y., CHEN B., XU H.

1991 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 8(4), 6-10. (C)

Studies of the microconstituents of *Bombyx mori* bave silk.

Etudes des micro-constituants de la bave de soie de *Bombyx mori*.

FENG Y., JIANG X., LI Y.

1991 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 8(3), 1-5. (C)

Molecular modeling studies on silk peptides.

Modèle moléculaire des peptides de la soie.

FOSSEY S.A., KAPLAN D.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 270-282. (E)

Elastomeric network models for the frame and viscid silks from the orb web of the spider *Araneus diadematus*.

Modèles en réseau d'élastomère pour la structure et les soies visqueuses de la toile sphérique de l'araignée *Araneus diadematus*.

GOSLING J.M., POLLACK C.C., GUERETTE P.A., CHENG A., DEMONT M.E., DENNEY M.W.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 328-341. (E)

Chemical processing of silk.

Traitement chimique de la soie.

GULRAJANI M.L.

Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, New Delhi 110016, India.

1993 Edited by GULRAJANI M.L., 242 p. (E)

Effect of residual soap and acetic acid treatment on structural changes of wild silk fiber (*Antheraea pernyi*).

Effet des résidus de savon et du traitement à l'acide acétique sur les changements structuraux de la fibre de soie sauvage (*Antheraea pernyi*).

KAWAHARA Y.

Tokyo Metropolitan Textile Research Institute, 3-15-5, Honjo, Sumida-ku, Tokyo 130, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 105-109. (J,e)

Studies on silk/polyester compound silk.

Etudes sur la soie mélangée au polyester.

KIM Y.D., SONG K.E.

Rural Development Administration, Sericultural Experiment Station, Suwon, Korea Republic.

1992 *Research Reports of the Rural Development Administration*, Vol. 34(1), 43-47. (K,e)

Studies on silk/polyester compound silk and its fabrics.

Etudes sur la soie mélangée au polyester et ses tissus.

KIM Y.D., SONG K.E., LEE Y.W.

Rural Development Administration, Sericultural Experiment Station, Suwon, Korea Republic.

1992 *Research Reports of the Rural Development Administration*, Vol. 34(1), 48-52. (K,e)

Multiple regression analysis of relation between the moisture content of the cocoon layer and the atmospheric temperature and humidity.

Analyse des régressions multiples de la relation entre la teneur en humidité de la coque soyeuse, la température et l'humidité ambiantes.

KOBAYASHI K.

Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya Saitama 360, Japan.

1994 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 63(2), 110-115. (J,e)

Study on the aggregated structure of automatic reeling raw silk and multi end reeling raw silk.

Etude sur la structure agrégée de la soie grège dévidée automatiquement et de la soie grège dévidée sur une machine à bouts multiples.

LI M., LU X., YANG B.

1992 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 9(2), 6-11. (C)

Mechanism of fiber formation of silkworm.

Mécanisme de formation de la fibre chez le ver à soie.

MAGOSHI J., MAGOSHI Y., NAKAMURA S.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 292-310. (E)

Aspects of the morphology of dragline silk of *Nephila clavipes*.

Aspects de la morphologie de la soie de la toile de *Nephila clavipes*.

MAHONEY D.V., VEZIE D.L., EBY R.K., ADAMS W.W., KAPLAN D.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 196-210. (E)

New method of tasar silk reeling.

Nouvelle méthode de dévidage de la soie tasar.

MANIMARAN S., SIVAKUMAR M., THANGAVELU K.

National Silkworm Seed Project, N° 17 National High School Road, Visveswarapuram, Basavanagudi, Bangalore 560 004, India.

1994 *Indian Silk*, Vol. 32(12), 28-29. (E)

Toward single-fiber diffractions of spider dragline silk from *Nephila clavipes*.

Vers les diffractions d'une seule fibre de soie de la toile de l'araignée *Nephila clavipes*.

McNAMEE S.G., OBER C.K., JELINSKI L.W., RAY E., XIA Y., GRUBB D.T.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 174-186. (E)

Study of small angle X-ray scattering features of acid and alkali treated silk fiber (mulberry) using correlation functions.

Etude des caractères de diffraction des rayons X à angle faible de la fibre de soie (mûrier) traitée à l'acide et à l'alcali, par utilisation des fonctions de corrélation.

MISRA T., PANDA P., PATEL T., BISOVI D.K., PANDA D.K.

1993 *Jpn J. Appl. Phys., Part 1*, Vol. 32(10), 4615-4621. (E)

A study on antibacterial finishing of silk fibers.

Etude de la finition antibactérienne des fibres de soie.

NAHM J.H.

Seoul National University, Department of National Fiber Science, Suwon, Korea Republic.

1988 *Agriculture Research of Seoul National University*, Vol. 13(2), 21-25. (K,e)

Thermal properties of silk proteins in silkworms.

Propriétés thermiques des protéines de soie chez les vers à soie.

NAKAMURA S., MAGOSHI J., MAGOSHI Y.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 211-221. (E)

The effect of acid chemicals on the physical properties of raw silk.

Effet des produits chimiques acides sur les propriétés physiques de la soie grège.

RHEE I.J., ROSARIO C.

Kyungpook National University, Department of Sericulture, Taegu, Korea Republic.

1989 *Agricultural Research Bulletin of Kyungpook National University*, Vol. 7, 73-81. (K,e)

Effects of methacrylamide treatment on silk fibers. 3. Polymerization behavior of methacrylamide.

Effets du traitement au méthacrylamide des fibres de soie. 3. Processus de polymérisation du méthacrylamide.

SHIN B.S., NAHM J.H.

Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1992 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 34(2), 32-40. (K,e)

Effects of methacrylamide treatment on silk fibers. 2. Thermal behavior of methacrylamide-treated silk fibers.

Effets du traitement au méthacrylamide des fibres de soie. 2. Comportement thermique des fibres de soie traitées au méthacrylamide.

SHIN B.S., NAHM J.H.

Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1992 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 34(1), 49-56. (K,e)

Changes in the fine structure of silk fibroin fibers following gamma irradiation.

Variations dans la structure fine des fibres de la fibroïne de soie après une irradiation gamma.

TSUKADA M., FREDDI G., MINOURA N.

1994 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 51(5), 823-829. (E)

Structural changes and dyeability of silk fibroin fiber following shrinkage in neutral salt solution.

Changements structuraux et prise de la teinture de la fibre de fibroïne de soie après la rentrée du tissu dans une solution salée neutre.

TSUKADA M., KATO H., FREDDI G., KASAI N., ISHIKAWA H.

1994 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 51(4), 519-624. (E)

On the conductivity mechanism of pyrolyzed silk samples.

Mécanisme de conductivité d'échantillons de soie pyrolysés.

UMAROV A.V., ISLAMOV B.K., KHAMIDOV S.R.

1992 *Uzb. Fiz. Zh.*, Vol. 3, 72-74. (E)

Processing natural and reconstituted silk under equilibrium and non-equilibrium conditions.

Transformation de la soie naturelle et reconstituée dans les conditions d'équilibre et de non-équilibre.

VINEY C., HUBER A.E., DUNAWAY D.L., CASE S.T., KAPLAN D.L.

1993 *Mater. Res. Soc. Symp. Proc., Biomolecular Materials*, Vol. 292, 211-217. (E)

Optical characterisation of silk secretions and fibers.

Caractérisation optique des fibres et des sécrétions de soie.

VINEY C., HUBER A.E., DUNAWAY D.L., KERKAM K., CASE S.T.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 120-136. (E)

Sericin silk protein : unique structure and properties.

La séricine de la soie : une structure unique et ses propriétés.

VOEGELI R., MEIER J., BLUST R., HOFSTETER R.

1993 *Cosmet. Toiletries*, Vol. 108(12), 101-104. (E)

General properties of some spider silks.

Propriétés générales de quelques soies d'araignées.

VOLLRATH F.

1994 *ACS Symposium Series 544, Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, 17-28. (E)

Graft copolymerization of methyl metacrylate onto silk fibers initiated by tetravalent ions.

Copolymérisation de greffage de méthacrylate de méthyle sur des fibres de soie induite par des ions tétravalents.

WANG X., LIU G.

1991 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 8(4), 11-15. (C)

Hydrolysis and fibroin damage parameters in real silk fabric degumming.

Hydrolyse et paramètres de détérioration de la fibroïne au cours du décreusage des tissus soie.

XIE R.

1991 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 8(4), 33-39. (C)

Utilization of sericin as raw materials for specialty polymers. 1. Ultrafiltration performance of sericin membranes.

Utilisation de la séricine comme matière première pour les polymères spéciaux. 1. Performances d'ultrafiltration des membranes de séricine.

YAMADA H., FUWA N., NOMURA M., YOSHIKAWA M., KUNUGI S.

1993 *Maku*, Vol. 18(5), 301-303. (J)

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. Serie. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés-à-part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés-à-part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés-à-part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to : **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.
- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.
- Acknowledgements.
- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 x 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.
