

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 / <i>Thailand</i>) | LIU S-X. (Chine / <i>China</i>) |
| BEAULATON J. (France) | LU H-S. (Chine / <i>China</i>) |
| BECK D. (France) | MANO Y. (Japon / <i>Japan</i>) |
| BOSQUET G. (France) | MAUCHAMP B. (France) |
| COUBLE P. (France) | NARASIMHANNA M.N. (Inde / <i>India</i>) |
| DANDIN S.B. (Inde / <i>India</i>) | PERSOONS C.J. (Pays-Bas / <i>Netherlands</i>) |
| DAS B.C. (Inde / <i>India</i>) | PRUDHOMME J-C. (France) |
| DATTA R.K. (Inde / <i>India</i>) | REALI G. (Italie / <i>Italy</i>) |
| DOIRA H. (Japon / <i>Japan</i>) | SHIMURA K. (Japon / <i>Japan</i>) |
| FONSECA T.C. (Brésil / <i>Brazil</i>) | SHIRATA A. (Japon / <i>Japan</i>) |
| FOURCHE J. (France) | SOMASHEKAR T.H. (Inde / <i>India</i>) |
| FREDDI G. (Italie / <i>Italy</i>) | SONWALKAR T.N. (Inde / <i>India</i>) |
| GOLDSMITH M.R. (USA) | TAKAHASHI R. (Brésil / <i>Brazil</i>) |
| HORIE Y. (Japon / <i>Japan</i>) | TAZIMA Y. (Japon / <i>Japan</i>) |
| IATROU K. (Canada) | TRENCZEK T. (Suisse / <i>Switzerland</i>) |
| JOLLY M.S. (Inde / <i>India</i>) | VAGO C. (France) |
| KOBAYASHI M. (Japon / <i>Japan</i>) | VEY A. (France) |
| KRISHNASWAMY S. (Inde / <i>India</i>) | XIA J-G. (Chine / <i>China</i>) |
| LEA H. Z. (Corée / <i>Korea</i>) | YAMASHITA O. (Japon / <i>Japan</i>) |
| LEGAY J-M. (France) | YANAGAWA H. (Japon / <i>Japan</i>) |

SOMMAIRE - CONTENTS

Informations CSI	ix
ISC Announcements	xi

Actualités / News	xiii
-----------------------------	------

Revue / Review

Genetic analyses of polyphagous mutant strains of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	601
Analyses génétiques des souches mutantes polyphages du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	619
Y. TAZIMA	

Articles originaux / Original papers

Study on the effect of fluoride on growth, development and economic parameters of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	627
Etude de l'effet du fluor sur la croissance, le développement et les paramètres économiques du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	637
CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.	

Identification of region-specific silkworm (<i>Bombyx mori</i> L.) hybrids	641
Identification d'hybrides de vers à soie (<i>Bombyx mori</i> L.) selon l'aire géographique	649
J.L. RAZDAN, A.A. SIDDIQUI, R.K. BALI & P. MUKHERJEE	

Gene action studies in the multivoltine silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	653
Etudes sur l'action des gènes chez le ver à soie polyvoltin <i>Bombyx mori</i> L.	663
P. MUKHERJEE, S.K. RAINA, C.K. PUROHIT & S.N. SUMBLI	

Magnitude of heterosis and heterobeltiosis for eight quantitative traits in mulberry	669
Amplitude de l'hétérosis et de l'hétérobeltiosis pour huit caractères quantitatifs chez le mûrier	681
B.N. SUSHEELAMMA & S.B. DANDIN	

Mulberry mycorrhiza association — an effective tool to improve leaf nutrition	685
Association des mycorrhizes et du mûrier, un outil efficace pour l'amélioration de la nutrition foliaire	691
M. THIRIPURASUNDARI & M. VIVEKANANDAN	

Relative tolerance of certain mulberry (<i>Morus alba</i> L.) varieties to NaCl salinity	695
Tolérance relative de certaines variétés de mûrier (<i>Morus alba</i> L.) à la salinité due au NaCl	703
S. RAMANJULU, K. VEERANJANEYULU & C. SUDHAKAR	

Notes brèves / Brief notes

Field evaluation of fungicides against powdery mildew of mulberry in Kashmir	707
Evaluation sur le terrain de l'effet de fongicides sur l'oïdium du mûrier dans le Cachemire	713
N.A. MUNSHI, T.N. TANKI, M.A. ZARGAR, A.R. TRAG & R.K. GROVER	

Efficacy of different doses of neem cake on <i>Meloidogyne incognita</i> infecting mulberry	717
Effacité de différentes doses de tourteau de margousier sur <i>Meloidogyne incognita</i> , parasite du mûrier	723
GOVINDAIAH, S.B. DANDIN, K. GIRIDHAR & R.K. DATTA	

Le programme d'amélioration du mûrier dans l'Etat de São Paulo au Brésil	727
The mulberry improvement programme in the State of São Paulo, Brazil	735
T.C. FONSECA, J.E. ALMEIDA & F. OKAMOTO	

The silkworm chrysalis may be a food source for human nutrition	739
La chrysalide de ver à soie peut constituer une source de nourriture pour les humains	743
S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA & RANJIT KAR	

Brief introduction to five newly bred mulberry varieties of 'Yu' series and 'Feng-chi'	747
Brève présentation de cinq nouvelles variétés de mûrier : série "Yu" et "Feng-chi"	751
SUN X.-x.	

<i>Eutetranychus orientalis</i> (Klein) (Tetranychidae: Acari), a new record of an insect pest of <i>Morus</i> species in Nilgiris	755
<i>Eutetranychus orientalis</i> (Klein) (Tetranychidae : Acari) : première observation d'un insecte parasite du genre <i>Morus</i> dans les monts Nilgiri	757
V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ	

Varietal resistance of mulberry to leaf rust caused by <i>Aecidium mori</i> Berclay	759
Résistance variétale du mûrier à la rouille foliaire provoquée par <i>Aecidium mori</i> Berclay	765
R.S. TEOTIA, S.K. SEN, S.K. MANDAL & S.S. SINHA	

Survey on the distribution of the root-knot nematode (<i>Meloidogyne incognita</i>) in certain mulberry growing areas of Karnataka (India)	767
Etude de la répartition du nématode de la galle des racines (<i>Meloidogyne incognita</i>) dans certaines zones de culture de mûrier du Karnataka (Inde)	775
GOVINDAIAH, S.B. DANDIN, V. GUNASEKHAR, CHIKKANNA & R.K. DATTA	

Role of N, P and K nutrients on <i>in vivo</i> nitrate reductase activity in leaves of <i>Quercus serrata</i> Thun.	779
Rôle des éléments nutritifs N, P et K sur l'activité nitrate réductase <i>in vivo</i> chez les feuilles de <i>Quercus serrata</i> Thun.	785
M.K. GHOSH, M.K.R. NOAMANI, P.K. DAS & R.C. SRIVASTAVA	

Instructions aux auteurs / Information for contributors

INFORMATIONS CSI

LE XVI^e CONGRES DE LA CSI

Le XVI^e Congrès, qui s'est tenu à Bandung (Indonésie) du 21 au 25 mars 1995, a été organisé conjointement par l'Institut de Recherche de l'Université de Padjadjaran à Bandung, le Ministère de la Forêt d'Indonésie et le Secrétariat de la CSI.

Vingt et un pays étaient représentés ainsi que deux organisations internationales (le CCI, Nations Unies, et l'AIS). En tout, 136 participants ont animés les travaux de ce congrès qui ont été organisés autour des 6 sections de la CSI :

- *Bombyx mori*, présidée par M. Hajime Inoue (Japon) ;
- Mûrier, présidée par M. Jorge K. Watanabe et M. Rui L. Vaz (Brésil) ;
- Vers à soie non mûrier, présidée par M. Subba Rao (Inde) ;
- Bacologie, présidée par M. Gérard Chavancy ;
- Technologie post-cocons, présidée par Mme Chanya Pannengpet (Thaïlande) ;
- Economie, présidée par M. Abdel Rahman Hosny Sayed (Egypte).

En tout, 55 communications ont été présentées, sous forme orale ou d'affiches. Les textes des communications ont été remis à l'ensemble des participants. Les séances ont été complétées par une journée de visite sur le terrain qui a été très appréciée et a permis de mieux connaître la sériciculture et l'industrie de la soie en Indonésie.

La table ronde qui a clôturé le congrès a été très animée et a permis de constater que les participants souhaitent approfondir et élargir les coopérations internationales dans les domaines scientifiques et techniques liés à la sériciculture. Il a été proposé, en particulier, d'œuvrer à la création d'un centre international de génétique du ver à soie comprenant une banque génétique des différentes variétés et de réaliser un réseau à partir des laboratoires des différents Etats concernés et intéressés par les recherches en matière de génétique moléculaire.

La nécessité de poursuivre et d'élargir la collaboration entre la CSI, l'AIS et le CCI a également été soulignée.

Ce congrès a été une réussite grâce à la participation active des délégués et au Comité d'organisation, dont le chef d'orchestre, le Dr Hasbi Tirtapradja, a été fort apprécié.

Il a également été une réussite par les nombreux contacts bilatéraux ou multilatéraux qui ont été pris par les différentes délégations et qui ont amorcé, pour certains d'entre eux, des projets concrets de coopération et d'assistance technique.

Le XVII^e Congrès, qui aura lieu en 1997, doit permettre de faire un nouveau bilan de ces différentes questions qui ont été très débattues.

LE COMITE DE CLASSIFICATION DES COCONS (CCC)

Le Comité exécutif de la CSI, qui s'est tenu pendant le Congrès de Bandung, a été l'occasion d'entendre le rapport présenté par le Dr Mitsuo Yokozawa (Japon), Président du CCC, qui a fait le point sur les travaux engagés.

Malgré les difficultés de communication et de rencontre entre les membres du CCC, le Dr Yokozawa a pu élaborer un questionnaire et analyser les premières données. Elles confirment l'extrême diversité des méthodes et techniques utilisées dans les différents pays et soulignent l'importance et la nécessité de normes internationales communes dans ce domaine.

La tâche est lourde mais tous les participants ont pu se rendre compte que le Président du CCC avait bien pris les choses en mains et était décidé à mener les travaux en profondeur pour atteindre l'objectif fixé.

LE MEMORANDUM COMMUN CSI-AIS

L'édition 1995 du "Mémorandum commun sur les problèmes de développement séricicole" est disponible en anglais et en français aux secrétariats de l'AIS et de la CSI.

Elle peut être obtenue sur simple demande.

ISC ANNOUNCEMENTS

THE XVIth ISC CONGRESS

The XVIth Congress, which was held in Bandung (Indonesia) from 21-25 March 1995, was organised jointly by the Research Institute of the University of Padjadjaran, the Indonesian Ministry of Forestry and the ISC Secretariat.

Twenty-one countries were represented as well as two international organisations (ITC, United Nations, and ISA). Altogether, 136 participants actively attended the work of this congress which was organised around the 6 sections of the ISC:

- *Bombyx mori*, chaired by Mr Hajime Inoue (Japan);
- Mulberry, chaired by Mr Jorge K. Watanabe and Mr Rui L. Vaz (Brazil);
- Non mulberry silkworms, chaired by Mr Subba Rao (India);
- Bacology, chaired by Mr Gérard Chavancy;
- Post-cocoon technology, chaired by Mrs Chanya Pannengpet (Thailand) and
- Economy, chaired by Mr Abdel Rahman Hosny Sayed (Egypt).

A total of 55 papers were presented orally or as posters. The texts of the papers were handed to all participants. The sessions were completed with a day's field visit which was much appreciated and which enabled Indonesian sericulture and silk industry to be better known.

The round table which closed the congress was very lively and showed that all participants were eager to strengthen and extend international cooperation in the scientific and technical fields relating to sericulture. It was proposed, in particular, to work for the creation of an international centre of silkworm genetics including a gene bank of the various varieties and to set up a network with the laboratories of the various States concerned and interested in research in the domain of molecular genetics.

The need to pursue and extend collaboration between the ISC, the ISA and the ITC was also emphasised.

This congress was a success owing to the active participation of delegates and to the Organising Committee, whose leader, Dr Hasbi Tirtapradja, was much appreciated.

It was also a success in terms of the many bilateral and multilateral contacts which were established by the different delegations, some of which set up concrete projects for cooperation and technical assistance.

The XVIIth Congress, which will be held in 1997, should enable us to take stock of these much debated questions.

THE COCOON CLASSIFICATION COMMITTEE (CCC)

The ISC Executive Committee, which was held during the Bandung Congress, allowed Dr Mitsuo Yokozawa (Japan), Chairman of the CCC, to present his report on the work so far achieved.

Although it was difficult for the CCC members to organise meetings and exchanges, Dr Yokozawa drew up a questionnaire and analysed the first data. They confirm that the methods and techniques used differ widely from one country to the other and prove that common international standards in this field are an absolute necessity.

The task is heavy but all the participants realised that the Chairman of the CCC had the work well in hand and was determined to carry this work out to achieve the aim set.

THE ISC-ISA JOINT MEMORANDUM

The 1995 edition of the "Joint Memorandum on the Problems of Sericultural Development" is available in French and in English at the secretariats of the ISA and ISC.

It can be obtained on request.

INDE

Dans le cadre du programme indo-suisse de coopération technique et scientifique, le Centre international de formation et de recherche en sériciculture tropicale de Mysore propose une formation débouchant sur un Diplôme en sériciculture tropicale (DTS).

Ce diplôme est délivré à l'issue d'un stage de 6 mois. Deux sessions ont lieu chaque année du 1er avril au 30 septembre et du 1er octobre au 31 mars. Dix places sont réservées aux stagiaires étrangers dans chaque session.

Pour de plus amples informations, contacter :

Dr R.K. DATTA, Director, Central Sericultural Research and Training Institute and International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, India.

Tel.: +91 821 520757 / 521406. Fax: +91 821 520845. E mail: csrti @ nicfos.ernet.in.

INDIA

Under the Indo-Swiss economic and technical co-operation programme, the International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Mysore, offers a training leading on to a Diploma in Tropical Sericulture (DTS).

This diploma is conducted in two sessions of 6 months each from April 1st to September 30th and from October 1st to March 31st of every year. Ten seats are allotted to participants from overseas countries in each session.

Further information can be obtained from :

GENETIC ANALYSES OF POLYPHAGOUS MUTANT STRAINS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

Y. TAZIMA

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, Iikura 1054, Amimachi, Ibarakiken 300-03, Japan.

Polyphagous mutations, S_j and Brd , of spontaneous origin have been analyzed genetically with special regard to their feeding activity on basic diet. Breeding experiments between these two and with many Japanese races revealed that polyphagy is dominant to the normal feeding habit. However, similar breeding experiments using a number of Chinese races were reported to behave as if polyphagy were recessive. Using C136 as a representative of Chinese races crossing experiments were carried out which suggested that a dominant suppressor gene (S_u) possessed by those Chinese races suppressed the function of the S_j gene. It was demonstrated that S_u is located on chromosome pairs other than the third, where the major gene for polyphagy resides. The S_u gene is likely to have a limit in its potency, namely, $S_u > S_j$, but $S_u < 2 S_j$ and $S_u < Brd$. Polyphagous strains are taste-blind, lacking the function of discriminating repellent substances from mulberry. But, in the F_1 of $S_j \times C136$ the function is restored and they do not feed on basic diet. They start feeding on basic diet when mulberry powder is added, however. Therefore, S_u seems to act only for the restoration of this discrimination function.

Keywords: *Bombyx mori*, polyphagous mutation, suppressor, genetics.

1. INTRODUCTION

Since the publication of the previous review (Tazima, 1989), remarkable progress has been achieved with regard to our understanding of the food habit of the silkworm, *Bombyx mori*. Two polyphagous mutations of spontaneous origin have been analyzed genetically and since 1990 commercial breeds have already been established and released for practical use.

In this article I shall review further progress in the investigation of those mutants with special regard to the feeding activity on basic diet that does not contain mulberry leaf powder.

Of those mutations, one is named S_j^* and the other Brd . S_j was first discovered by Yokoyama (1974; see Tazima, 1989) through his screening experiment with the use of cabbage leaves. Whereas Brd was found by Mano (1990) among strains in the course of line breeding. Brd is the abbreviated symbol for broad food range. Both are unique in that they can feed and grow on artificial diet that does not contain mulberry leaf powder, which will be called basic diet hereafter (Horie *et al.*, 1964; see Tazima, 1989). Both are unable to discriminate other plant leaves from mulberry. In this respect they resemble Np (Non-preference), but differ from it with regard to the acceptability of beet leaves. S_j feeds on beet leaves fairly well, but Brd does not.

Strains S_j and Brd are almost identical to each other so far as their genetic behavior is concerned. In addition, major genes for polyphagy are known to be located on the third chromosome in both strains. In this respect they differ from Np , which is known to be located on the eleventh chromosome.

* In the previous review the author allocated Wfr as a symbol of this gene, but later he revised it to S_j (Tazima *et al.*, 1989).

Several other strains have recently been found to feed on artificial diet that does not contain mulberry leaf powder. Those are Aojuku, Kojiki, J-01 etc. Most of them belong to Japanese races. On the contrary, there are many Chinese races which do not accept mulberry-deficient basic diet. Among them the most characteristic is C136, which was analyzed by Yamamoto *et al.* (1983).

Using two polyphagous strains and the C136 strain, Tazima *et al.* (1991, 1992, 1993 and 1994) carried out genetic investigations which brought to light substantial interesting information concerning the food habit of the silkworm.

Table I. Comparative data on rates of development and survival for several food habit mutation strains and their hybrids.

Tableau I. Données comparatives sur les taux de développement et de survie chez plusieurs souches à mutantes des habitudes alimentaires et leurs hybrides.

Season Diet	Strain	Number of hatched larvae	Number of larvae at			Survival		Age of larvae examined** (in days)
			2nd std.	3rd std.	4th std.	Number	Rate (%)	
<i>Saison</i>	<i>Souche</i>	<i>Nombre</i>	<i>Nombre de larves au</i>			<i>Survie</i>		<i>Age des larves</i>
<i>Aliment</i>		<i>de larves</i>	<i>2e âge</i>	<i>3e âge</i>	<i>4e âge</i>	<i>Nombre</i>	<i>Taux (%)</i>	<i>examinées**</i>
		<i>écloses</i>						<i>(en jours)</i>
894	As	895	7	6	1	14	1.6	19
Basic diet	Is	918	0	117	152	269	29.3	15
<i>Aliment simple</i>	Sj	678	0	43	256	299	44.1	13
	Brd	648	0	76	425	501	77.3	13
	As × Sj	689	2	128	69	199	28.9	19
	Sj × As	770	2	68	49	119	15.5	19
	Is × Sj	862	0	65	152	217	25.2	13
	Sj × Is	685	0	59	281	340	49.6	13
	As × Brd	825	34	294	176	504	61.1	15
	Is × Brd	940	0	295	302	597	63.5	13
893	Is	520	0	41	330	371	71.3	15
Basic diet	Sj	402	0	27	326	353	87.8	14
<i>Aliment simple</i>	Brd	602	1	25	484	510	84.7	13
	Brd × Sj	613	0	26	528	554	90.4	13
893	Is	537	0	36	286	322	60.0	14
LPY-0*	Sj	407	0	4	303	307	75.4	12
	Brd	670	0	15	581	596	89.0	12
	Brd × Sj	562	0	2	502	504	89.7	12

(Tazima and Ohnuma, 1991).

* LPY-141, but from which mulberry leaf powder is removed / *LPY-141 sans poudre de feuilles de mûrier.*

** Days after hatching / *Jours après l'éclosion.*

2. CROSSING OF POLYPHAGOUS STRAINS, Sj AND Brd, WITH JAPANESE INDIGENOUS RACES, As AND Is

Dominance was tested between two polyphagous strains and the Japanese indigenous races, As and Is. Crosses were made between the two groups and their F₁s were tested for their food habit by rearing them on basic diet. The As strain feeds poorly on basic diet, showing only a 1-2% survival rate by the fourth stadium and 0-1% of the delete rate of beet feeding.

Newly hatched larvae of the F₁, BF₁ and F₂, were brushed on basic diet simultaneously with their parental strains and reared with the same diet until the beet feeding test. At the early stage of the fourth stadium they were starved for 12 hours and tested for their ability to feed on beet leaves for one hour, which is expressed as the rate of beet feeding. The feeding activity on basic diet is undoubtedly reflected in the quality and the rate of larval growth. When activity is high, growth proceeds favourably and rapidly. Hence, survival rate was used instead of the ability to feed on basic diet throughout this work. The number of surviving larvae was recorded at every stadium. In addition, the number of days required for arriving at the fourth stadium was recorded.

The survival rate varies considerably with the rearing season, even in the same strain or cross combination. Accordingly, the survival rate was not taken at its face value, but was determined as a relative value among those reared in the same season and with the same diet. Those data are shown in Tables I and II.

Table II. Rates of survival and beet feeding in strains Sj, As and Is when reared with basic diet.

Tableau II. Taux de survie et d'alimentation sur betteraves chez les souches Sj, As et Is élevées avec l'aliment simple.

Rearing season	Strain	Survival rate (%)	Rate of beet feeding (%)
Saison d'élevage	Souche	Taux de survie (%)	Taux d'alimentation sur betteraves (%)
892	Sj	81.0	29.3
	Is	68.6	0.0
894	Sj	44.1	46.5
	As	1.6	0.0
	Is	29.3	1.3
901	Sj	50.4	82.2
	As	0.2	0.0
	Is	32.9	0.0

(Tazima and Ohnuma, 1991).

(1) Crossing between Sj and Japanese races, As and Is:

F₁ hybrids were produced between polyphagous strain Sj and the almost normal food habit strain, As, or a fairly good feeding strain, Is, and reared with basic diet. The results are shown in Table I and

Figures 1 and 2. In these figures, 892, 894, etc. indicate the rearing season, namely, 892 is the abbreviation for 1989-2nd season.

Fig. 1: Inheritance of basic diet feeding ability in F₁ hybrids.

Numbers refer to season rearing (see text).

Fig. 1 : Transmission de la capacité à se nourrir sur un aliment de base chez les hybrides F₁.

Les numéros correspondent aux saisons d'élevage (voir texte).

(a) Sj × As. (b) Sj × Is.

(Tazima and Ohnuma, 1991).

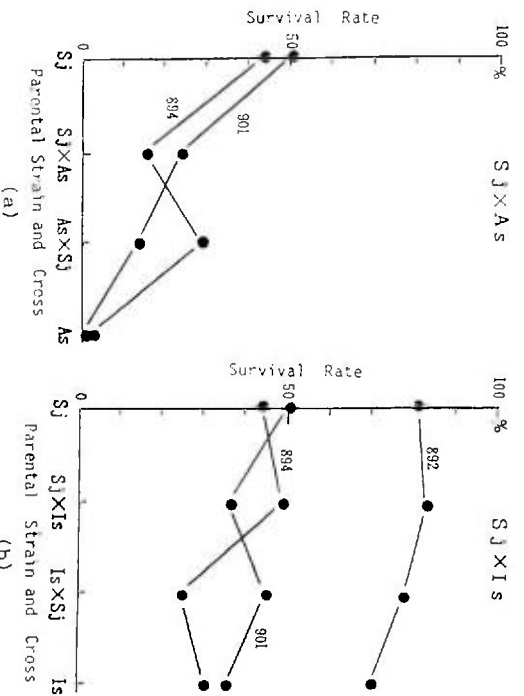


Fig. 2: Inheritance of beet feeding ability in F₁ hybrids reared with basic diet.

Numbers refer to season rearing (see text).

(a) Sj × As and their parents.

(b) Sj × Is and their parents.

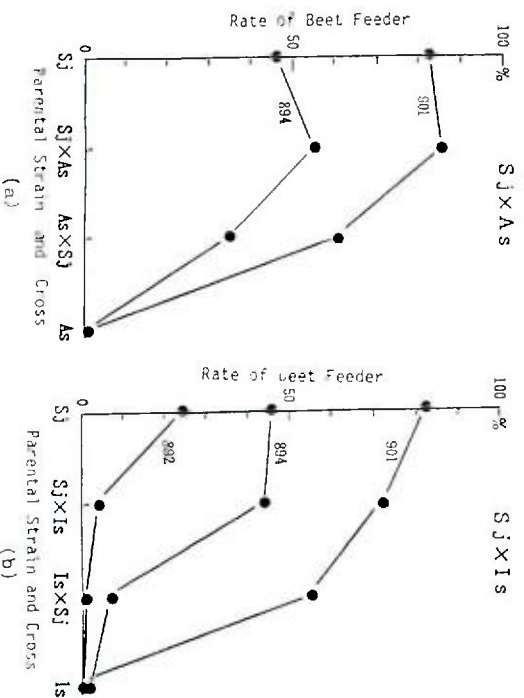
Fig. 2 : Transmission de la capacité à se nourrir de betteraves chez les hybrides F₁ élevés sur milieu artificiel.

Les numéros correspondent aux saisons d'élevage (voir texte).

(a) Sj × As et leurs parents.

(b) Sj × Is et leurs parents.

(Tazima and Ohnuma, 1991).



As clearly seen from these figures, the F₁s were intermediate between both parents not only for survival rate but also for rate of beet feeding. From these results, it was concluded that the polyphagous trait is dominant to the normal food habit traits carried by the strain As and by the fairly good feeding strain, Is.

(2) Crossing between Brd and Japanese races, As and Is:

In the same way another polyphagous strain, Brd, was crossed with strains As and Is and their F_1 s were reared with basic diet (Fig. 3). Survival rates of F_1 s were also intermediate between their parents, but a little higher than mid-parent value, indicating that Brd also behaves as a dominant to As and Is, but it is a little higher in dominance potential than Sj.

Fig. 3: Inheritance of basic diet feeding ability in F_1 hybrids.

Numbers refer to season rearing.

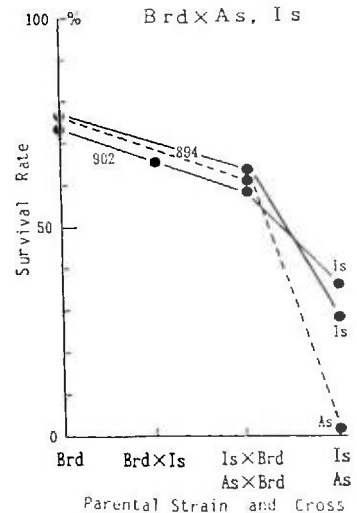
Shown are Brd $\times$ Is and As $\times$ Brd and the respective parents.

Fig. 3 : Transmission de la capacité à se nourrir sur l'aliment artificiel simple chez les hybrides F_1 .

Les chiffres correspondent aux saisons d'élevage.

Les souches présentées sont : Brd $\times$ Is et As $\times$ Brd ainsi que les parents respectifs.

(Tazima and Ohnuma, 1991).



It may also be noted from Figures 3 and 1 that the survival rate varies considerably depending on the rearing season in strain Is as well as in Sj. In contrast, strain Brd exhibits a fairly high survival rate and is less variable.

As to the potentiality to feed on beet leaves, Brd is almost incompetent, nor do its F_1 s feed on beet leaves (Fig. 4).

Fig. 4: Inheritance of beet feeding ability in F_1 hybrids reared with basic diet.

Numbers refer to season rearing.

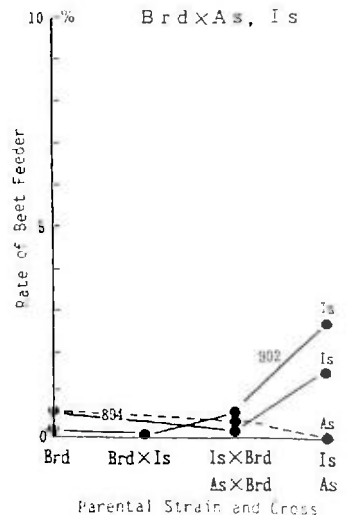
Shown are Brd $\times$ Is and As $\times$ Brd and the respective parents.

Fig. 4 : Transmission de la capacité à se nourrir de betteraves chez les hybrides F_1 nourris avec l'aliment artificiel simple.

Les chiffres correspondent aux saisons d'élevage.

Les souches présentées sont : Brd $\times$ Is et As $\times$ Brd ainsi que les parents respectifs.

(Tazima and Ohnuma, 1991).



3. CROSSING BETWEEN TWO POLYPHAGOUS STRAINS

F₁ larvae between Sj and Brd were also reared with basic diet. The survival rates in the F₁ and both parental strains were almost at the same level (Fig. 5). These results seemed to suggest that the genes responsible for each strain, *Sj* and *Brd*, might be similar in quality, although differences were observed to some extent with regard to their feeding activity and growth rate, being a little superior in the Brd strain.

Non-beet feeding characteristics of Brd behaved as dominant to those of beet feeding of Sj in the F₁s (Fig. 6).

Fig. 5: Survival of *Sj*, *Brd* and their F₁ and F₂ reared with basic diet.

Numbers refer to season rearing (Tazima and Ohnuma, 1991).

Fig. 5 : Survie de Sj, Brd et de leurs F₁ et de leurs F₂ élevés sur aliment artificiel simple.

Les chiffres correspondent aux saisons d'élevage (Tazima et Ohnuma, 1991).

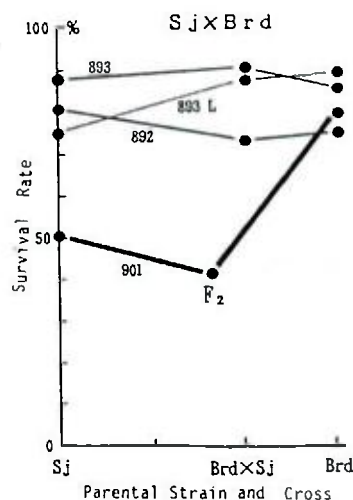
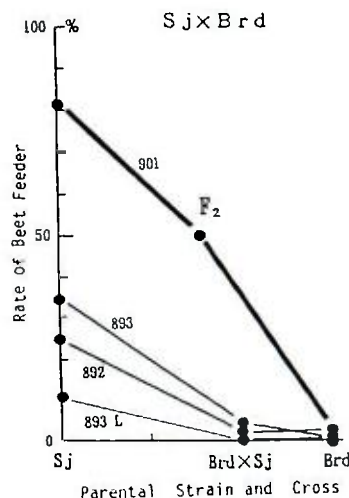


Fig. 6: Beet feeding ability of *Sj*, *Brd* and their F₁ and F₂ reared with basic diet.

Numbers refer to season rearing.
(Tazima and Ohnuma, 1991).

Fig. 6 : Capacité à se nourrir sur betteraves de Sj, Brd et de leurs F₁ et de leurs F₂ élevés sur aliment artificiel simple.

*Les chiffres correspondent aux saisons d'élevage.
(Tazima et Ohnuma, 1991).*



Although the genetic potential seemed almost similar between Sj and Brd, an interesting finding was made in the F₂. The survival in the F₂ was clearly lower than that in the F₁. A similar reduction was also observed in experiments carried out in other seasons.

Concerning the reduction in survival, at least two possibilities can be considered. The first one is that recessive modifiers that act in a negative direction were transmitted into F₁ zygotes from one of the parents. Under such circumstances, segregation of homozygotes for negative modifiers occurs in the F₂, which causes the decrease in feeding activity and in survival.

Another possibility is that genetic potential is different between major genes in the two strains, perhaps *Brd* > *Sj*. As will be described later, both the *Sj* and *Brd* genes have been shown to reside on the third chromosome. Accordingly, possible segregated genotypes for the third chromosome in F₂ offspring may be enumerated as *Brd/Brd* : 2 *Brd/Sj* : *Sj/Sj*. As seen in Fig. 5, the potential of *Brd/Sj* is nearly equal to that of *Brd/Brd*, but that of the segregated *Sj/Sj* might possibly be lower, and cause the decrease in feeding activity.

However, it is difficult to decide which of the two is true.

4. CROSSING OF THE POLYPHAGOUS STRAINS WITH CHINESE RACE C136

In contrast to the foregoing sections, cross combinations are known in which the polyphagous trait seems to behave as a recessive to the normal feeding trait. Kanda *et al.* (1988) reported that when *Sj* was crossed with some Chinese strains, C-01 and/or C-02, the F₁s did not feed on LP-1 diet (a kind of artificial diet that does not contain mulberry leaf powder, but is different from basic diet in that it contains fish meal; Yanagawa *et al.*, 1991). Tazima *et al.* immediately undertook a similar experiment by using Chinese strain C136 as a partner of *Sj*. C136 was shown by Yamamoto (1983) to reject artificial diet. The F₁ of this cross combination does not feed on basic diet at all. Therefore, they had to rear them with fresh mulberry so as to obtain further generations. The data from our studies are shown in Tables III and IV. For confirmation of feeding activity, the number of grown larvae was counted 24 hours after the brushing of newly hatched larvae on basic diet (Table III).

Table III. Rate of grown larvae after 24 hours' feeding on basic diet.

Tableau III. Taux de croissance des larves pendant 24 heures d'alimentation sur aliment simple.

Strain	Rate of grown larvae (%)
<i>Souche</i>	<i>Taux de croissance des larves (%)</i>
Sj	99.3
Brd	99.6
C136	0.0
Sj × C136	0.0
C136 × Sj	0.0
Brd × C136	16.4
C136 × Brd	7.6
Shokei × C136	3.4
C136 × Shokei	7.9

(Tazima and Ohnuma, 1994)

Table IV presents similar results, but expressed in terms of survival rate, not only for the parental strains but also for the F₁, F₂ and BF₁. The tables also include the data for some other strains.

Table IV. Comparison of survival rates between offspring generations F₁, F₂ and BF₁ of the crosses C136 × S_j and C136 × Brd.*

Tableau IV. Comparaison des taux de survie entre les descendants F₁, F₂ et BF₁ des croisements C136 × S_j et C136 × Brd.*

912		913		914	
Strain Souche	Survival (%) Survie (%)	Strain Souche	Survival (%) Survie (%)	Strain Souche	Survival (%) Survie (%)
S _j	73.3	(C136 × Brd) F ₂	78.0	(C136 × S _j) F ₂	31.5
Brd	87.4	(C136 × Brd) F ₂	78.3	(C136 × S _j) × S _j	67.0
C136	0.0	(C136 × Brd) × Brd	88.9		
C124	0.5	(C136 × Brd) × Brd	80.7		
Shokei	24.1	(C136 × Brd) × C136	21.3		
Kansen	0.0	(C136 × Brd) × C136	15.2		
C136 × S _j	0.0				
C136 × S _j	0.0				
C136 × Brd	30.1				
C136 × Brd	65.9				

(Tazima and Ohnuma, 1994)

* Reared with basic diet. Survival was recorded at the fourth stage.

* Elevées avec un aliment simple. La survie a été enregistrée au quatrième âge.

It may be seen from Table IV that in the offspring of the cross between S_j and C136 the survival rate is 0% in the F₁, but it rises as high as 31.5% in the F₂ and 67.0% in the backcross of F₁ females with S_j males.

In the F₁ of the cross between Brd and C136 the survival was definitely high, yielding 30.1% and 65.9%. It was also much higher in the F₂, yielding 78.0% and 78.3%. In the BF₁ with Brd, survival rose still higher, to 80.7% and 88.9%, whereas, in the BF₁ with C136, it was less than 21.3%.

These results are interpreted by assuming that in the F₁ the polyphagous gene S_j is inhibited in its expression by a dominant suppressor gene, Su, which was presumably inherited from the C136 parent. However, homozygous ^{Su}/_{Su} that can feed on basic diet is expected to segregate in the F₂. In this case, two possibilities could be considered for the locus of the Su gene. One possibility is that Su is allelic to S_j. The other possibility is that Su resides on another chromosome pair, independent of S_j.

To begin with, we examined the first possibility. If Su is allelic to S_j, segregation might occur in the F₂. As illustrated in Fig. 7, the segregation of three genotypic individuals is expected as 1 S_j/S_j : 2 S_j/Su : 1 Su/Su. Of those types only S_j/S_j can feed on basic diet. Hence, the incidence of feeding larvae is expected to be 1/4 (25%) among the F₂ offspring. Here we have to take into consideration the contribution of homozygous *nfad*. According to Enokijima *et al.* (1984) strain C136 possesses a recessive non-feeding gene (*nfad*). Consequently, *nfad/nfad* is expected to appear in the F₂ at the rate

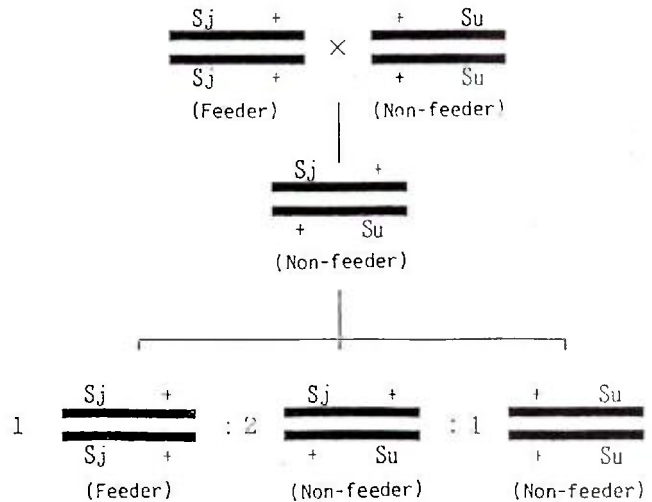
of 1/4. Subtracting the contribution of homozygous *nfad*, the incidence of feeding individuals is $1/4 \times (1 - 1/4) = 18.75\%$. Since the observed survival rate was 31.5%, a fairly large discrepancy is seen between the expected and the observed. Therefore, the first assumption could hardly be adopted.

Fig. 7: Expected segregation of feeders and non-feeders on basic diet in F_2 if *Su* and *Sj* are linked.

(Tazima and Ohnuma, 1994).

Fig. 7 : Ségrégation attendue de larves s'alimentant ou non sur aliment artificiel simple à la génération F_2 si *Su* et *Sj* sont liés.

(Tazima et Ohnuma, 1994).



Next, we examined the second possibility. This is the case in which *Su* is located on a chromosome other than the one where *Sj* resides. If this were the case, segregation of polyphagous individuals would be expected to be 75% in the F_2 , because *Sj* is assumed to be dominant. Of those zygotes, however, three genotypes are expected with regard to *Su*, i.e., 1 *Su/Su* : 2 *Su/+^{Su}* : 1 *+^{Su}/+^{Su}*. Among those, only *+^{Su}/+^{Su}* is free from suppression by *Su* and feeds on basic diet. Consequently, the expected frequency of feeding larvae is only $3/4 \times 1/4$ (18.75%). However, the observed frequency of feeding larvae was 31.5%. Again there is a fairly large discrepancy. It seemed, therefore, that the second possibility should also be abandoned.

But, then it occurred to us that an *Sj/Sj, Su/+^{Su}* individual might be able to eat the basic diet because of the insufficiency of suppression by *Su*. We have seen in the F_1 of the cross C136 $\times$ *Sj* (Table III) that a single dose of *Su* suppresses the action of a single dose of *Sj*, but it might be insufficient to suppress a double dose of *Sj*. We have already seen that even a single dose of *Su* is not sufficient to suppress the action of a single dose of *Brd* (Table III). This seems to provide good support for the above-mentioned idea. If it is true, then *Sj/Sj, Su/+^{Su}* individuals should be counted among feeding larvae. This type of individual comprises 2/16 (12.5%) of the F_2 offspring. By adding the calculated 12.5% to the 18.75% for the *+^{Su}/+^{Su}* genotype, we obtain a total of 31.25%, which is very close to the observed 31.8%. However, we must subtract from this figure the contributed fraction of *nfad*. This gives $31.25 \times (1 - 1/4) = 23.5\%$. The calculated value is still lower than the observed rate of 31.8%, but much nearer to it than the values calculated from the first assumption.

Next, we have to examine the relevance of the above two possibilities to the observed data for the backcross, (C136 $\times$ *Sj*) $\times$ *Sj*. As shown in Table IV, the observed survival rate was 67.0%. In comparison, the expected rate from the first assumption is 50%. On the contrary, based on the second assumption, feeding individuals might be *Sj/Sj, +^{Su}/+^{Su}* (1/4) and *Sj/+^{Su}, +^{Su}/+^{Su}* (1/4) (see Fig. 8). In addition, *Sj/Sj, Su/+^{Su}* (1/4) would also be able to feed. If this proves to be the case, then total rates

of feeding larvae and survival should come to 75%. This figure is slightly higher than those actually observed, but approximately coincides with them.

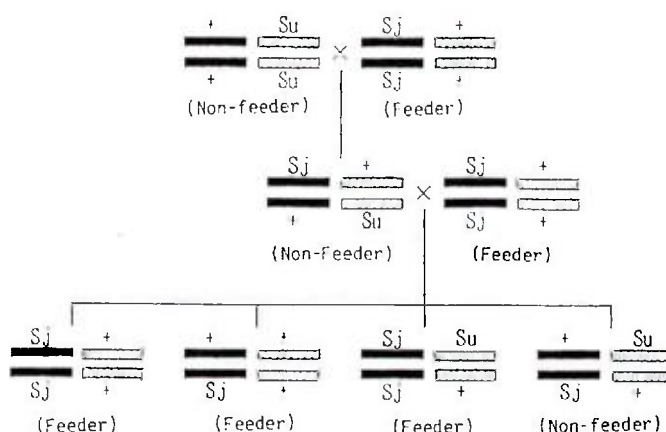
Given this context, we may conclude that the second hypothesis fits better than the first one. That is to say, *Su* is independent of the *Sj* allele.

Fig. 8: Expected segregation of feeders and non-feeders on basic diet in the backcross generation of $(C136 \times S_j) \times S_j$ if *Su* and *Sj* are on non-homologous chromosomes.

(Tazima and Ohnuma, 1994).

Fig. 8 : Ségrégation attendue de larves s'alimentant ou non sur aliment artificiel simple dans les résultats montrés pour le rétrocroisement $(C136 \times S_j) \times S_j$ si *Su* et *Sj* sont situés sur des chromosomes non homologues.

(Tazima et Ohnuma, 1994).



5. THE SEARCH FOR A LINKAGE GROUP TO WHICH MAJOR GENE FOR THE POLYPHAGOUS TRAITS BELONGS

The food habit mutant, *Np* (Non-preference), was first obtained by the use of X-ray irradiation, and its locus was determined at 11-7.3 by Tazima *et al.* (1984). Further X-irradiation experiments were carried out by them in 1988 to investigate the relative mutability of silkworm strains. In this experiment, they obtained several mutants. The locus of one of them, *Nps* (Non-preference S), was determined to be at 3-2.2 (Ohnuma *et al.*, 1989). Somewhat later, Kanda *et al.* (1992) reported that a major gene for the polyphagous trait, *Sj*, was likely to belong to the third linkage group. Ohnuma and Tazima (1992) followed up their work to confirm their finding.

By using *Ze*^F (Zebra faded, 3-20.8) as a marker for the third chromosome, a *Ze*^F, *Sj* female was crossed to a *Ze*⁺, *Sj* male and the F₁ offspring were reared with fresh mulberry leaves, because they did not feed on basic diet. F₁ females were crossed again with *Ze*⁺, *Sj* males and the BF₁ generation was reared with basic diet to determine its feeding ability. At the fourth stadium** survival was recorded separately for the segregated phenotypes, *Ze*^F and *Ze*⁺, (hereafter, the latter will be expressed as *Ze*⁺ for simplicity). If a polyphagous gene were on the third chromosome that was transmitted from the *Ze*⁺, *Sj* parent, then two kinds of genotypic individuals would be expected to segregate. Half of

* The *Ze*^F strain has the characteristic larval marking of zebra faded and does not ingest basic diet.

** The rate of larval growth was extremely variable in the BF₁ generation and the stage was determined when the majority of larvae entered into the fourth stadium.

the offspring would carry the Ze^F , $+Sj$ chromosome in heterozygous condition, i.e., $Ze^F/Sj/+Ze^F Sj$, whereas the other half is expected to be homozygous, $+Ze^F Sj/+Ze^F Sj$. The feeding activity of homozygous Sj , with the normal marking, might be far superior to the heterozygous Sj , with the zebra marking. Therefore, it was anticipated that normal marking larvae would show superior survival to zebra marking larvae.

In the backcross generation, $F_1 \times Sj$, ingestion was poor, showing a survival rate of only 38.8% for the Ze^F phenotype and 66.6% for the $+Ze^F$ phenotype, with an overall rate of 52.7%. Expressed as a ratio between the two phenotypes survival was 0.58:1.00 (Table V).

These results seemed to agree with the hypothesis that the major gene for Sj is located on the third chromosome.

Table V. Records of survival observed after consecutive backcross generations of the cross $Ze^F \times Sj$.

Tableau V. Taux de survie enregistrés après rétrocroisements successifs du croisement de $Ze^F \times Sj$.

Experiment season	Crossing	Number hatched	Number survived		% of Ze^F	Survival rate (%)		
			Ze^F	+		Ze^F	+	Whole
Saison expérimentale	Croisement	Nombre d'éclosions	Nombre de survivants		% de Ze^F	Taux de survie (%)		
			Ze^F	+		Ze^F	+	Total
921	$Ze^F \times Sj$	394	0	0	0.0			
922	$Ze^F \times Sj^2$	2554	496	850	36.8	38.8	66.6	52.7
923	$Ze^F \times Sj^3$	1328	597	623	48.9	89.9	93.8	90.4
924	$Ze^F \times Sj^4$	1378	455	586	43.7	66.0	85.0	75.5

(Tazima and Ohnuma, 1992)

Backcrossing to Sj parental strains was repeated for two more generations. Survival in $F_1 \times Sj^3$ was 90.4% and $F_1 \times Sj^4$ was 75.5% (Table V). Fluctuations were seen among backcross generations, but it is clear that the survival rate increased from 52.7% in $F_1 \times Sj^2$ up to 90.4% in $F_1 \times Sj^3$ and 75.5% in $F_1 \times Sj^4$. The discrepancy between $F_1 \times Sj^3$ and $F_1 \times Sj^4$ may perhaps be due to experimental error. However, it is almost certain that survival rate increased from 52.7% in $F_1 \times Sj^2$ to higher rates with the successive backcrossings.

The results suggest that modifiers are also involved in the expression of the polyphagous trait, as pointed out by Tazima *et al.* (1989).

6. THE FUNCTION OF THE SUPPRESSOR GENE, *Su*

As stated above, F_1 larvae of $C136 \times Sj$ do not feed on basic diet, which is deficient in mulberry leaf powder. By the use of electrophysiological techniques Ishikawa (1963, 1966) demonstrated that a R-neuron present on one of the sensory hairs, Sensilla styloconicum II, of the larval maxilla functions

as a receptor for bitter substances contained in the food. Yazawa *et al.* (1991) demonstrated that when this bitter substance or other repellent substances, such as leaf extract of elm or cherry leaves, is present in the food, the R-receptor of the normal strain has a sensitive response to those substances and feeding activity is arrested. By contrast, in the polyphagous strain, even when repellent substances are involved in the food, the R-receptor fails to respond and feeding proceeds without hindrance. In other words, polyphagous strains such as Sj and Brd lack the function of discriminating repellent substances from acceptable ones. In short, they are taste-blind.

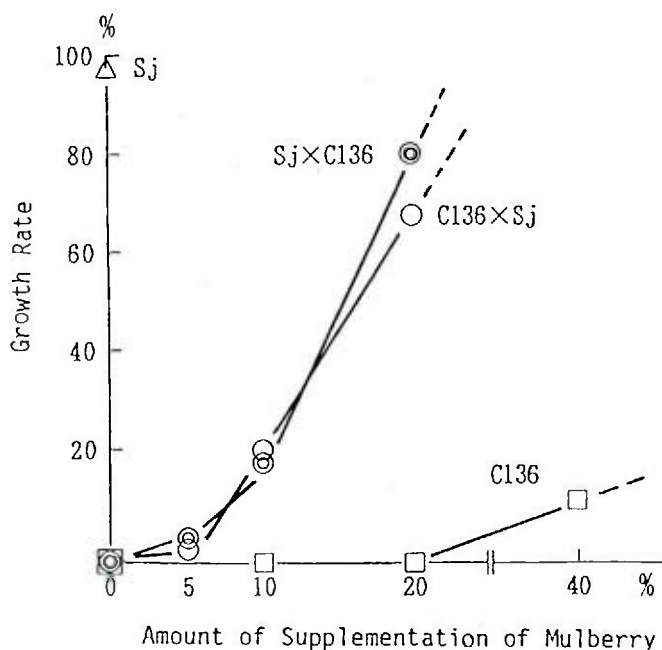
Sj feeds on basic diet that does not contain mulberry leaf powder. Hence, we may infer that it does not require mulberry for ingestion. In contrast, the F_1 of Sj $\times$ C136 does not feed on the same basic diet even when it is devoid of repellent substances. Far from that, they require mulberry. This was demonstrated by an experiment in which the F_1 was reared with basic diet supplemented with mulberry leaf powder at several concentrations (Fig. 9).

Fig. 9: Effect of supplementation of mulberry leaf powder to the basic diet.

Growth rate is indicated by % of grown larvae at 24 hr age for F_1 groups and at 48 hr age for the parental strain, C136. (Tazima and Ohnuma, 1994).

Fig. 9 : Effet de l'addition de poudre de feuilles de mûrier à l'aliment artificiel simple.

Le taux de croissance des larves est indiqué en pourcentage après 24 h pour les groupes F_1 et à 48 h pour la souche parentale C136. (Tazima et Ohnuma, 1994).



It may be seen from the figure that the larvae of strains C136 and Sj $\times$ C136 do not feed on the basic diet lacking mulberry leaf powder, but that as the supplementation of mulberry increases, the rate of grown larvae becomes higher. These results indicate that the presence of mulberry leaf powder is essential for the larvae to ingest basic diet. The curve rises very slowly for C136, but fairly steeply for Sj $\times$ C136.

Next, an experiment was carried out to clarify whether F_1 larvae of $Sj \times C136$ respond to repellent substances when they are supplemented to the basic diet. Prior to this experiment it was confirmed that the larvae of the normal strain as well as of the F_1 of $Sj \times C136$ do not ingest the basic diet supplemented with oak leaf powder (*Quercus acutissima* Carr.).

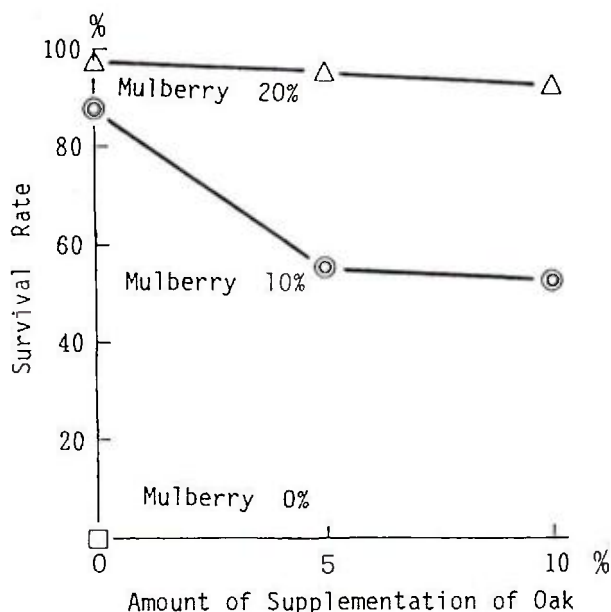
In the main experiment, four series of experimental groups were set up with varying amounts of mulberry supplementation to the basic diet, i.e., 0%, 5%, 10% and 20% in dry weight. Each group was again divided into subgroups of differential addition of oak leaf powder, i.e., 0%, 5% and 10%. These differentially prepared diets were given to newly hatched larvae of the F_1 of $Sj \times C136$ for 96 hours and their survival was recorded. The results are shown in Fig. 10.

Fig. 10: Effect of supplementation of mulberry and oak leaf powder on larval growth.

Growth rate is indicated at 96 hr age (Tazima and Ohnuma, 1994).

Fig. 10 : Effet de l'addition de poudre de feuilles de chêne et de mûrier sur la croissance larvaire.

Le taux de croissance est indiqué à 96 heures (Tazima et Ohnuma, 1994).



As shown in Fig. 10, when supplementation of mulberry powder is nil, the survival rate is only 0.3%. But in the 10% mulberry supplementation group survival rose up to 86.2%, and in the 20% group it reached as high as 98.5%. However, addition of oak powder caused a decrease in survival. For instance, in the 10% mulberry supplementation group 5% oak addition caused 30% decrease in survival. In the 20% mulberry supplementation group, however, the curve declined only slightly by oak addition. Nevertheless, a remarkable delay in larval growth was observed (Table VI).

Table VI shows larval development observed 96 hours after hatching. In lot No. 4, which was fed diet supplemented with 20% mulberry and 0% oak, 432 larvae (72%) were already in the second stadium. Whereas, in the other lots, No.'s 2, 3, 5 and 6, all larvae were still in the first stadium.

These results indicate that the presence of a certain amount of mulberry is a prerequisite for the larvae to ingest the basic diet. But, even when 20% mulberry leaf powder is present, if mixed with oak powder, then growth of the larvae is markedly retarded, perhaps due to their aversion to eating.

In summary, polyphagous strains are taste-blind, lacking the function of discriminating repellent substances from mulberry. But, in the F₁ of *Sj* × C136, the function is restored and they do not feed on basic diet. They do start feeding on basic diet when mulberry powder is added. Therefore, *Su* seems to act only for the restoration of the discrimination function.

Table VI. Developmental rate of larvae in relation to the supplementation of mulberry and oak leaf powder to basic diet.

Tableau VI. Taux de développement des larves en fonction de l'addition de poudre de feuilles de mûrier et de chêne à l'aliment de base.

Lot No.	Supplemented		Stage of larvae at 96 hr				Survival rate (%)
	Mulberry (%)	Oak (%)	1st instar	1st molt	2nd instar	Total	
Lot n°	Addition de		Stade des larves à 96 h				Taux de survie (%)
	Mûrier (%)	Chêne (%)	1er âge	1ère mue	2e âge	Total	
1	10	0	429	29	67	525	86.2
2	10	5	342	0	0	342	56.2
3	10	10	326	0	0	326	53.6
4	20	0	25	143	432	600	98.5
5	20	5	595	0	0	595	97.7
6	20	10	586	0	0	586	96.2

(Tazima and Ohnuma, 1994)

7. DISCUSSION

(1) Is the polyphagous gene dominant or recessive?

In section 2 of this article experimental results are described in which polyphagous genes, *Sj* and *Brd*, behave as dominant to the normal (non-polyphagous) gene. On the contrary, Kanda *et al.* (1988, 1992) advocated the reverse hypothesis, based on their experiments using several Chinese races. Specifically, *Sj* is recessive to the normal. Prior to their work, Fujimori *et al.* (1980) reported that polyphagy of the *Sj* strain is dominant to the normal character in the cross between *Sj* and several Japanese and some Chinese races, when reared with artificial diet that contains 22% mulberry leaf powder.

Taking those contradictory views into consideration, Kanda *et al.* (1988) asserted that *Sj* is dominant to the normal when reared with mulberry-containing diet, but behaves as a recessive when reared with a mulberry-deficient diet, LP-1. Such an assertion, however, cannot be exempted from criticism. As described in section 2, we have observed several races to which *Sj* behaves as a dominant when their F₁s were reared with mulberry-deficient basic diet. The number of races or strains that we have examined so far is not large, but our results are almost certain to infer that *Sj* is dominant to the majority of Japanese and some Chinese races. The reason why *Sj* behaves as if it were a recessive in the cross with several Chinese races is considered to be due to the effect of a suppressor gene, *Su*, that acted against the dominant *Sj*.

Here, let us examine once more the experimental data obtained by Kanda *et al.* In search of the linkage group to which *Sj* belongs, they carried out numerous crosses between *Sj* and several strains having dominant or recessive marker genes and reared the offspring with LP-1 diet. Their data on observed phenotypes in BF₁ and F₂ generations are reproduced in Tables VII and VIII.

Crosses No. 2-7 in Table VII represent the record of segregated phenotypes in the BF₁ of the cross between *Sj* and several dominant marker strains. The observed data for six crossings in total are *FD 390: F+ 381: ND 791: N+ 782. The phenotypic ratio is far from 1:1:1:1, which is expected theoretically for BF₁. But, considering different feeding activity between F phenotypes and N phenotypes, we can hardly expect a uniformity in survival rate between the two phenotypic groups. Hence, the author calculated the segregation ratio separately for each group. After such treatment each group came to agree with the expected 1:1 ratio, namely, $\chi^2 = 0.10$ ($p < 1\%$) for the fed group and $\chi^2 = 0.05$ ($p < 1\%$) for the unfed group. Consequently, their data accord with the expectation from the recessive hypothesis, if such correction is made.

Table VII. Segregation of phenotypes in BF₁ reared with LP-1 diet in several combinations of crosses between *Sj* and dominant marker strains.

*Tableau VII. Ségrégation de phénotypes chez des BF₁ élevés avec l'aliment LP-1 dans différentes combinaisons de croisements entre *Sj* et les souches marqueuses dominantes.*

No.	Cross / Croisement	Fed / Nourris		Not fed / Non nourris	
		D	+	D	+
1	(ZelZe × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	2	68	128	47
2	(L/L × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	32	38	90	79
3	(E ^{KP} /E ^{KP} × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	31	39	83	86
4	(Ia/Ia × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	155	122	179	199
5	(K/K × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	38	32	85	84
6	(U/U × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	93	90	227	225
7	(Bu/Bu × <i>Sj</i>) × <i>Sj</i>	41	60	127	109
Total (2 - 7)		390	381	791	782

(Kanda, 1992)

** Presence of linkage relation was assumed / *Présence supposée d'une relation de liaison.*

The data were also similarly treated for cross combinations with recessive marker strains (Table VIII). However, the corrected data did not accord with the expected ratio of 3:1 in the F₂, i.e., $\chi^2 = 6.83$ ($p > 5\%$) for the fed group and $\chi^2 = 9.03$ ($p > 5\%$) for the unfed group.

From these reasons, the recessive hypothesis can hardly be acceptable with regard to the nature of the *Sj* gene. Accordingly, we again have to return to the dominant hypothesis. The details of the test of conformity of the segregation ratio in the F₂ and/or BF₁ with theoretical expectations have

* F, N: represent fed and not fed, respectively. D, +: indicate presence and absence of dominant marker.

already been described in section 3. There seem to be fewer objections to the proposition of the dominance hypothesis. However, in order to reach a definite conclusion more information is necessary.

Table VIII. Segregation of phenotypes in F_2 , reared with LP-1 diet, in several combinations of crosses between *Sj* and recessive marker strains.

*Tableau VIII. Ségrégation de phénotypes chez des F_2 élevés avec l'aliment LP-1 dans plusieurs combinaisons de croisements entre *Sj* et les souches marqueuses récessives.*

No.	Cross / Croisement	Fed / Nourris		Not fed / Non nourris	
		+	rec*	+	rec
1**	(<i>lem/lem</i> × <i>Sj</i>) F_2	246	18	474	166
2	(<i>q</i> × <i>Sj</i>) F_2	239	92		
3	(<i>bts</i> × <i>Sj</i>) F_2	57	31	228	92
4	(<i>nb</i> × <i>Sj</i>) F_2	47	9		
5	(<i>oc</i> × <i>Sj</i>) F_2	50	22	110	48
6	(<i>st</i> × <i>Sj</i>) F_2	63	26	360	133
7	(<i>ms</i> × <i>Sj</i>) F_2	112	52	370	150
Total (2-7)		563	232	1068	423

(Kanda, 1992)

*Rec: Recessive phenotypes for marker gene / Phénotypes récessifs pour le gène marqueur.

**Linkage was assumed / Liaison présumée.

(2) Dose effect of the suppressor gene:

For the assumption that *Sj* is dominant, it is necessary to assume one more dominant gene which suppresses the activity of the *Sj* gene. In addition, still one more assumption is necessary, that *Su* can suppress the action of a single dose of the *Sj* gene, but it is not potent enough to suppress a double dose of *Sj* gene, i.e., $Su > Sj$, but $Su < 2Sj$. With those assumptions, the mode of segregation in the F_2 and BF_1 of the cross between *Sj* and C136 was explained without contradiction.

In Table III we see that the rate of grown larvae is 0% in both F_1 s of the cross *Sj* × C136 and its reciprocal, whereas, in F_1 s of *Brd* × C136 and its reciprocal, the rate of grown larvae is 7.6% and 16.4% or approximately 10% on average. A similar incidence of grown larvae is observed in the cross of Shokei × *Sj*, i.e., 3.4% and 7.9%.

These observations indicate that the suppression potency of *Su*, which came from the C136 parent, is not powerful enough to suppress completely the action of the *Brd* gene. In other words, it is not potent enough to restore the impaired function of R-neurons in perceiving repellent substances.

The above observation seems to support the reliability of the proposition that $Su > Sj$ but $Su < 2Sj$.

Finally, we conclude that the hypothesis that *Sj* is dominant to the normal feeding trait may be more reliable when compared to the recessive hypothesis.

REFERENCES

- ENOKIJIMA M., YAMAMOTO T., KAMIJO I. (1984) Gene analysis of the non-feeding mutant of C136 strain of the silkworm on artificial diet. *Acta Sericologica*, 130, 36-41.
- ISHIKAWA S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larva of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Cell Phys.*, 61, 1-10.
- ISHIKAWA S., HIRAO T. (1966) Studies on the feeding of the silkworm, *Bombyx mori* L. (I) Analysis of host plant preference, especially of feeding inhibition mechanism. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 20, 291-321.
- FUJIMORI H., YAMAMOTO T., TANAKA N. (1982) Genetical aspect of the feeding behavior on artificial diet in the larvae of Sawa-J, a strain of the silkworm with abnormal feeding preference. *J. Sericult. Sci. Japan*, 51, 235-236.
- HORIE Y., WANATABE K. (1969) Energy requirement by larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L., reared on mulberry leaves and artificial diet. *J. Sericult. Sci. Japan*, 38, 377-385.
- HORIE Y., WATANABE K. (1983) Design of the composition of the artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori*, by linear programming method: Application of the ingredients of feeds for domesticated animals and fowls. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 29, 259-263.
- KANDA T., TAMURA T., INOUE H. (1988) Feeding response of the silkworm larva to the LP-1 artificial diet designed by a linear programming method and its inheritance. *J. Sericult. Sci. Japan*, 57, 489-494.
- KANDA T. (1992) Genetical study of feeding habits of the silkworm, *Bombyx mori*, to new low-cost diet designed by linear programming method and application to the breeding. *Bull. Nat. Inst. Sericult. and Entomol. Sci.*, 5, 1-89.
- MANO Y. (1990) Breeding of polyphagous commercial breeds in the silkworm. *Sanshi Gijutsu*, 139, 33-37.
- OHNUMA A., TAZIMA Y. (1990) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (12) Determination of the locus of *Nps* gene on the third linkage map. *Rept. Silk Sci. Res. Inst.*, 38, 15-22.
- TAZIMA Y. (1989) Alteration of food habit of the domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 29(4), 437-453.
- TAZIMA Y., OHNUMA A., TANAKA Y. (1989) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (8) Characterization of food habit mutations as demonstrated by feeding on synthetic diet. *Rept. Silk Sci. Inst.*, 37, 1-19.
- TAZIMA Y., OHNUMA A. (1990) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (13) Genetic analyses of two non-preference mutations, *Sj* and *Brd*. *Rept. Silk Sci. Inst.*, 39, 1-9.
- TAZIMA Y., OHNUMA A. (1992) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (14) An experiment to demonstrate that polyphagous gene(s) locates on the third chromosome of the silkworm. *Rept. Silk Sci. Inst.*, 40, 1-9.
- TAZIMA Y., OHNUMA A. (1993) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (15) Genetic constitution of the wide food range mutation strains, *Sj* and *Brd*. *Rept. Silk Sci. Inst.*, 41, 1-9.
- TAZIMA Y., OHNUMA A. (1994) Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (16) Genetic analyses of wide food range mutation strains, *Sj* and *Brd*, by crossing them with C136 strain. *Rept. Silk Sci. Inst.*, 42.
- YAMAMOTO T. (1983) Genetical studies on a "non-feeding on artificial diet" mutant in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan*, 60, 363-371.
- YANAGAWA H., WATANABE K., SUZUKI K. (1991) Development of a low-cost artificial diet — Development of an artificial diet by applying a linear programming method for polyphagous strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Nat. Inst. Seric. and Entomol. Sci.*, 3, 57-75.
- YAZAWA M., HIRANO T., ARAI N., YAGI S. (1991) Feeding and gustatory responses in the "polyphagous strains" of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan*, 60, 563-571.

ANALYSES GENETIQUES DES SOUCHES MUTANTES POLYPHAGES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

Y. TAZIMA

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, Iikura 1054, Amimachi, Ibarakiken 300-03, Japon.

Les mutations polyphages S_j et Brd , d'origine spontanée, ont été soumises à une analyse génétique portant principalement sur leur activité de nourrissage sur aliment simple. Les expériences de sélection entre ces deux races ainsi que de nombreuses races japonaises montrent que la polyphagie est dominante par rapport à l'habitude alimentaire normale. Cependant, des expériences de sélection identiques utilisant un certain nombre de races chinoises ont révélé que celles-ci présenteraient une polyphagie récessive. Des expériences de croisement réalisées avec C136 comme souche représentative des races chinoises suggèrent qu'un gène inhibiteur dominant (S_u) présent chez ces races chinoises inhibe la fonction du gène S_j . Il est démontré que S_u est situé sur une paire de chromosomes autre que celle du troisième chromosome où réside le gène principal de la polyphagie. L'activité du gène S_u est vraisemblablement limitée, en d'autres termes $S_u > S_j$ mais $S_j < 2 S_j$ et $S_u < Brd$. Les souches polyphages sont insensibles au goût car il leur manque la fonction de discrimination des substances appétantes du mûrier. Cependant, chez les F_1 de $S_j \times C136$, cette fonction est rétablie et ils n'acceptent pas l'aliment simple. Ils commencent à se nourrir lorsque l'on ajoute de la poudre de feuilles de mûrier. Il semble donc que S_u agisse uniquement sur le rétablissement de cette fonction de discrimination.

INTRODUCTION

Depuis la parution de la revue précédente (Tazima, 1989), des progrès considérables ont été accomplis pour ce qui concerne la compréhension des habitudes alimentaires du ver à soie *Bombyx mori*. Deux mutations polyphages d'origine spontanée ont été analysées génétiquement et, depuis 1990, des souches commerciales ont pu être mises au point et distribuées aux producteurs.

Dans cet article, nous décrirons les progrès accomplis dans l'étude de ces mutants en nous intéressant particulièrement à l'activité de nourrissage sur aliment simple ne contenant pas de poudre de feuilles de mûrier.

L'une de ces mutations est appelée S_j^* et l'autre Brd . S_j a été mis en évidence pour la première fois par Yokoyama (1974 ; voir Tazima, 1989) lors d'une expérience de sélection utilisant les feuilles de choux. Brd a été découvert par Mano (1990) parmi plusieurs souches au cours d'une sélection de lignées. Brd est l'abréviation de "broad food range", c'est-à-dire spectre de nourrissage étendu. Ces deux souches sont uniques car elles peuvent se nourrir et se développer sur aliment artificiel sans feuilles de mûrier, que nous appellerons ici aliment simple (Horie et coll., 1964 ; voir Tazima, 1989). Elles sont toutes deux incapables de distinguer les feuilles de mûrier de celles des autres végétaux, caractère qu'elles ont en commun avec Np (Non préférence) ; toutefois, elles diffèrent de Np pour ce qui concerne l'acceptation des feuilles de betteraves. S_j accepte assez bien les feuilles de betteraves mais pas Brd .

* Dans la revue précédente, l'auteur avait attribué le symbole Wrf à ce gène qu'il a renommé S_j par la suite (Tazima et coll., 1989).

Les souches Sj et Brd sont pratiquement identiques sur le plan de leur comportement génétique. Par ailleurs, on sait que les gènes principaux de la polyphagie se situent sur le troisième chromosome chez ces deux souches. A cet égard, elles diffèrent de *Np*, qui est situé sur le onzième chromosome.

On a récemment découvert que plusieurs autres souches se nourrissaient sur aliment artificiel ne contenant pas de poudre de feuilles de mûrier. Il s'agit de : Aojuku, Kojiki, J-01, etc. La plupart d'entre elles sont des races japonaises. Au contraire, de nombreuses races chinoises n'acceptent pas l'aliment simple déficitaire en mûrier.

Tazima et coll. (1991, 1992, 1993 et 1994) ont réalisé des études génétiques sur deux souches polyphages et la souche C136, études qui ont permis de recueillir des informations intéressantes et concluantes sur les habitudes alimentaires du ver à soie.

2. CROISEMENT DES SOUCHES POLYPHAGES Sj ET Brd AVEC LES RACES JAPONAISES INDIGENES As ET Is

La dominance a été testée entre les deux souches polyphages et les races indigènes japonaises As et Is. Les croisements ont été réalisés entre les deux groupes et les habitudes alimentaires des F₁ ont été testées par nourrissage sur aliment simple. La souche As accepte mal l'aliment simple et donne un taux de survie de 1 à 2 % au quatrième stade et un taux d'alimentation sur betteraves de 0 à 1 %.

Les larves sorties d'éclosion des F₁, BF₁ et F₂, ont été élevées sur aliment simple en même temps que les souches parentales et élevées avec ce même aliment jusqu'au test d'alimentation sur betteraves. Au début du quatrième âge, elles ont été soumises à un jeûne de 48 heures puis, pendant une heure, à un test de capacité à s'alimenter sur feuilles de betteraves exprimé en taux d'alimentation sur betteraves. L'activité de nourrissage sur aliment simple se reflète toujours dans la qualité et le taux de croissance des larves : lorsque l'activité est élevée, le processus de croissance est positif et rapide. Nous nous sommes donc basés sur le taux de croissance plutôt que sur la capacité à se nourrir sur aliment simple pour l'ensemble de ces travaux. Le nombre de larves ayant survécu a été enregistré à chaque stade. Le nombre de jours nécessaires pour atteindre le quatrième âge a également été relevé.

Le taux de survie varie fortement en fonction de la saison d'élevage, même pour une même souche ou un même croisement. De ce fait, nous n'avons pas tenu compte de la valeur nominale du taux de survie mais de sa valeur relative par rapport au taux de survie des larves élevées à la même saison et avec le même aliment. Ces données sont présentées dans les tableaux I et II.

(1) Croisement entre Sj et les races japonaises As et Is :

Les hybrides F₁ ont été obtenus par croisement de la souche polyphage Sj avec la souche à alimentation presque normale As ou avec la souche à bon taux d'alimentation Is et ont ensuite été élevés sur aliment simple. Les résultats sont présentés dans le tableau I et les figures 1 et 2. Les chiffres indiqués sur ces dernières (892, 894, etc.) correspondent à la saison d'élevage ; par exemple, 892 est l'abréviation de 1989-2^e saison.

Comme le montrent clairement ces figures, les F₁ donnent des résultats intermédiaires par rapport aux deux parents non seulement pour le taux de survie mais également pour le taux d'alimentation sur betteraves. Sur la base de ces résultats, il a été conclu que le caractère polyphage est dominant par rapport aux caractères d'alimentation normale portés par la souche As et par la souche à bon taux d'alimentation Is.

(2) Croisement entre Brd et les races japonaises As et Is :

De la même façon, une autre souche polyphage, Brd, a été croisée avec les souches As et Is et leurs F₁ ont été élevés sur aliment simple (Fig. 3). Les taux de survie des F₁ sont également intermédiaires par rapport à ceux de leurs parents mais légèrement supérieurs à la valeur du parent moyen, ce qui indique que Brd agit également comme dominant par rapport à As et Is mais que son potentiel de dominance est un peu plus élevé que celui de Sj.

A la lecture des figures 3 et 1, on peut noter que le taux de survie varie considérablement suivant la saison d'élevage, tant chez la souche Is que chez la souche Sj. Par contraste, la souche Brd présente un taux de survie assez élevé et moins variable.

Pour ce qui concerne le potentiel d'alimentation sur feuilles de betteraves, *Brd* est pratiquement incompetent et ses F_1 ne s'alimentent pas non plus sur feuilles de betteraves (Fig. 4).

3. CROISEMENT ENTRE DEUX SOUCHES POLYPHAGES

Les larves F_1 issues du croisement entre *Sj* et *Brd* ont également été élevées sur aliment simple. Les taux de survie chez les F_1 et les deux souches parentales sont pratiquement au même niveau (Fig. 5). Ces résultats suggèrent que les gènes responsables pour chacune des souches, *Sj* et *Brd*, pourraient être de qualité identique bien que de légères différences aient été observées pour ce qui concerne leur activité de nourrissage et leur taux de croissance ; ces deux paramètres étant supérieurs chez la souche *Brd*.

Les caractéristiques de non-alimentation sur betteraves de *Brd* se présentent comme dominantes par rapport à celles de l'alimentation sur betteraves de *Sj* chez les F_1 (Fig. 6).

Bien que le potentiel génétique semble presque identique entre *Sj* et *Brd*, un résultat intéressant a été obtenu à la génération F_2 . La survie chez les F_2 est nettement inférieure à celle des F_1 . On a observé une diminution identique lors des expériences réalisées au cours des autres saisons.

Pour ce qui concerne la diminution de survie, on peut envisager au moins deux hypothèses. La première est que les modificateurs récessifs qui agissent dans une direction négative ont été transmis dans les zygotes F_1 par l'un des deux parents. Dans ces conditions, la ségrégation d'homozygotes pour les modificateurs négatifs se produit chez les F_2 , ce qui entraîne une diminution de l'activité d'alimentation et de la survie.

La deuxième hypothèse est que le potentiel génétique diffère entre les gènes principaux de ces deux souches et que peut-être *Brd* > *Sj*. Comme nous le verrons plus loin, il a été démontré que les gènes *Sj* et *Brd* étaient situés sur le troisième chromosome. De ce fait, les génotypes ségrégués possibles pour le troisième chromosome chez les descendants F_2 peuvent être classés ainsi : *Brd/Brd* : 2 *Brd/Sj* : *Sj/Sj*. Comme le montre la figure 5, le potentiel de *Brd/Sj* est pratiquement égal à celui de *Brd/Brd* ; par contre, celui de *Sj/Sj* pourrait être inférieur et entraîner une diminution de l'activité de nourrissage.

Cependant, il est difficile de déterminer laquelle de ces deux hypothèses est la bonne.

4. CROISEMENT DES SOUCHES POLYPHAGES AVEC LA RACE CHINOISE C136

Contrairement aux rubriques précédentes, on connaît des combinaisons de croisement dans lesquelles le caractère polyphage semble récessif par rapport au trait de nourrissage normal. Kanda et coll. (1988) ont observé que, lorsque *Sj* était croisé avec certaines souches chinoises, C-01 et/ou C-02, les F_1 n'acceptaient pas l'aliment LP-1 (milieu artificiel ne contenant pas de poudre de feuilles de mûrier mais différant de l'aliment simple par le fait qu'il contient de la farine de poisson ; Yanagawa et coll., 1991). Tazima et coll. ont alors mis en place une expérience identique utilisant la souche chinoise C136 comme partenaire de *Sj*. Yamamoto (1983) a démontré que C136 rejetait l'aliment artificiel. Les F_1 de ce croisement n'acceptent absolument pas l'aliment artificiel. Ils ont donc dû les élever sur mûrier frais pour obtenir les générations suivantes. Les données de nos études sont présentées dans les tableaux III et IV. Afin de confirmer l'activité de nourrissage, le nombre de larves obtenues a été compté 24 heures après la levée des larves sortie d'éclosion sur aliment simple (Tableau III).

Le tableau IV présente des résultats identiques mais exprimés en termes de taux de survie non seulement pour les souches parentales mais également pour les F_1 , les F_2 et les BF_1 . Les tableaux comprennent également les données obtenues pour d'autres souches.

Ce tableau montre que, chez les descendants du croisement entre *Sj* et C136, le taux de survie est de 0 % à la génération F_1 mais atteint 31,5 % à la génération F_2 et 67,0 % chez le rétrocroisement des femelles F_1 avec des mâles *Sj*.

Chez les F_1 du croisement entre *Brd* et C136, la survie est nettement élevée, avec des taux de 30,1% et 65,9 %. Elle est également beaucoup plus élevée chez les F_2 , avec des taux de 78,0 % et

78,3 %. Chez les BF₁ obtenus avec Brd, la survie augmente encore et atteint 80,7 % et 88,9 % ; tandis que, chez les BF₁ obtenus avec C136, elle est inférieure à 21,3 %.

Ces résultats ont été interprétés sur la base que, chez les F₁, l'expression du gène de la polyphagie *Sj* est réprimée par un gène dominant inhibiteur, *Su*, qui est vraisemblablement issu du parent C136. Cependant, l'homozygote $+^{Su}/+^{Su}$, qui accepte l'aliment simple, doit se ségréguer à la génération F₂. Dans ce cas, deux hypothèses peuvent être envisagées pour le locus du gène *Su*. La première est que *Su* est allélique de *Sj* ; la deuxième que *Su* est situé sur une paire de chromosomes indépendante de *Sj*.

Pour commencer, nous avons examiné la première hypothèse. Si *Su* est allélique de *Sj*, la ségrégation pourrait se produire à la génération F₂. Comme l'illustre la figure 7, la ségrégation de trois individus génotypiques devrait se présenter ainsi : 1 *Sj/Sj* : 2 *Sj/Su* : 1 *Su/Su*. De ces types, seul *Sj/Sj* peut se nourrir sur aliment simple. L'incidence de larves acceptant l'aliment simple est donc estimée à 1/4 (25 %) chez les descendants F₂. Il nous faut donc tenir compte de la contribution de l'homozygote *nfad*. D'après Enokijima et coll. (1984) la souche C136 possède un gène de non-alimentation récessif (*nfad*). En conséquence, *nfad/nfad* devrait apparaître à la génération F₂ à raison de 1/4. Si l'on soustrait la contribution de l'homozygote *nfad*, l'incidence d'individus acceptant l'aliment simple est de : $1/4 \times (1-1/4) = 18,75\%$. Etant donné que le taux de survie observé est de 31,5 %, on observe un écart assez important entre le taux estimé et le taux réel. La première hypothèse ne peut donc être retenue.

Nous avons ensuite examiné la deuxième hypothèse selon laquelle *Su* est situé sur un chromosome autre que celui sur lequel se trouve *Sj*. En ce cas, la ségrégation d'individus polyphages serait estimée à 75 % à la génération F₂ en présumant que *Sj* est dominant. Cependant, parmi ces zygotes, on prévoit trois génotypes pour *Su* : 1 *Su/Su* : 2 *Su/+^{Su}* : 1 $+^{Su}/+^{Su}$. Parmi ceux-ci, seul $+^{Su}/+^{Su}$ n'est pas inhibé par *Su* et se nourrit sur aliment simple. La fréquence estimée de larves acceptant l'aliment simple est donc seulement de $3/4 \times 1/4$ (18,75 %). Cependant, la fréquence observée de larves acceptant l'aliment simple est de 31,5 %. On constate à nouveau un écart assez important. Il semble donc que la deuxième hypothèse doit également être écartée.

Puis, il nous est venu à l'idée qu'un individu *Sj/Sj*, *Su/+^{Su}* pourrait être capable d'accepter l'aliment simple en raison de l'insuffisance de l'inhibition par *Su*. Nous avons vu, chez les F₁ du croisement C136 × *Sj* (Tableau III), qu'une seule dose de *Su* permet d'inhiber l'action d'une seule dose de *Sj*, mais il est possible qu'elle ne suffise pas à inhiber à une double dose de *Sj*. Nous avons déjà vu qu'une seule dose de *Su* ne suffit pas pour inhiber l'action d'une seule dose de *Brd* (Tableau III). Ceci semble étayer tout à fait l'hypothèse émise ci-dessus. Si celle-ci est vraie, alors les individus *Sj/Sj*, *Su/+^{Su}* doivent être inclus dans les larves acceptant l'aliment simple. Ce type d'individu comprend 2/16e (12,5 %) des descendants F₂. Si l'on ajoute les 12,5 % calculés aux 18,75 % pour le génotype $+^{Su}/+^{Su}$, on obtient un total de 31,25 % qui est très proche des 31,8 % observés. Cependant, il faut soustraire de ce chiffre la fraction de *nfad* ; ce qui donne $31,25 \times (1-1/4) = 23,5\%$. La valeur calculée est inférieure au taux observé de 31,8 % mais s'en approche beaucoup plus que les valeurs calculées d'après la première hypothèse.

Il faut ensuite examiner l'applicabilité des deux hypothèses décrites ci-dessus aux données observées pour le rétrocroisement (C136 × *Sj*) × *Sj*. Comme le montre le tableau IV, le taux de survie observé est de 67,0 %. En comparaison, le taux estimé pour la première hypothèse est de 50 %. Au contraire, sur la base de la deuxième hypothèse, les individus acceptant l'aliment simple pourraient être : *Sj/Sj*, $+^{Su}/+^{Su}$ (1/4) et *Sj/+^{Su}* (1/4) (voir Fig. 8). De plus, *Sj/Sj*, *Su/+^{Su}* (1/4) seraient également capables de s'alimenter. Si c'est le cas, alors le total des taux de larves acceptant l'aliment simple et des taux de survie devrait s'élever à 75 %. Ce chiffre semble légèrement supérieur aux chiffres réels mais coïncide à peu près avec ces derniers.

Dans ce contexte, on peut conclure que la deuxième hypothèse se vérifie mieux que la première ; c'est-à-dire que *Su* est indépendant de l'allèle *Sj*.

5. RECHERCHE D'UN GROUPE DE LIAISON AUQUEL APPARTIENT LE GENE PRINCIPAL DES CARACTERES DE LA POLYPHAGIE

Le mutant pour l'habitude alimentaire *Np* (non-préférence) a été obtenu pour la première fois par utilisation des rayons X et son locus a été situé à 11-7,3 par Tazima et coll. (1984). En 1988, ils ont poursuivi ces expériences d'exposition aux rayons X afin d'étudier la capacité de mutation relative des souches de vers à soie et ont obtenus plusieurs mutants. Le locus de l'un d'entre eux, *Nps* (non préférence S) a été situé à 3-2,2 (Ohnuma et coll., 1989). Un peu plus tard, Kanda et coll. (1992) ont observé qu'un gène majeur pour le caractère de la polyphagie (*Sj*) appartenait vraisemblablement au troisième groupe de liaison. Ohnuma et Tazima (1992) ont repris leur travail afin de confirmer ces résultats.

En utilisant Ze^F * (rayé fondu, 3-20,8) comme marqueur pour le troisième chromosome, une femelle Ze^F , *Sj* a été croisée avec un mâle $+Ze$, *Sj* et les descendants F_1 ont été élevés sur feuilles de mûrier fraîches car ils n'acceptent pas l'aliment simple. Les femelles F_1 ont été à nouveau croisées avec des mâles $+Ze$, *Sj* et la génération BF_1 a été élevée sur l'aliment simple afin de déterminer sa capacité de nourrissage. Au quatrième stade**, le taux de survie a été relevé séparément pour les phénotypes ségrégués Ze^F et $+Ze$ (qui sera appelé plus simplement $+Ze$ à partir de ce point). Si un gène de polyphagie hypothétiquement situé sur le troisième chromosome était transmis par le parent $+Ze$ /*Sj*, alors deux types d'individus génotypiques devraient se ségréguer. La moitié de la descendance porterait le chromosome Ze^F , *Sj* en condition d'hétérozygotie, soit : Ze^F , *Sj*/ $+Ze$, *Sj*, tandis que l'autre moitié devra être homozygote, $+Ze$, *Sj*/ $+Ze$, *Sj*. L'activité de nourrissage du *Sj* homozygote, à marquage normal, pourrait être nettement supérieure à celle du *Sj* hétérozygote, à marquage zébré. On a donc supposé que les larves à marquage normal présenteraient une survie supérieure à celle des larves à marquage zébré.

Chez le rétrocroisement $F_1 \times Sj$, l'ingestion est médiocre et le taux de survie seulement de 38,8 % pour le phénotype Ze^F et de 66,6 % pour le phénotype $+Ze$, avec un taux global de 52,7 %. La survie exprimée sous forme de rapport entre les deux phénotypes est de 0,58:1,00 (Tableau V).

Ces résultats semblent corroborer l'hypothèse selon laquelle le gène principal pour *Sj* est situé sur le troisième chromosome.

Le rétrocroisement avec les souches parentales *Sj* a été répété sur les deux générations suivantes. La survie est de 90,4 % chez $F_1 \times Sj^3$ et de 75,5 % chez $F_1 \times Sj^4$ (Tableau V). Bien que des fluctuations aient été observées entre les rétrocroisements, il est clair que le taux de survie passe de 52,7 % chez $F_1 \times Sj^2$ à 90,4 % chez $F_1 \times Sj^3$ et à 75,5 % chez $F_1 \times Sj^3$. L'écart entre $F_1 \times Sj^3$ et $F_1 \times Sj^4$ pourrait être dû à des écarts expérimentaux. Il est cependant certain que le taux de survie, de 52,7 % chez $F_1 \times Sj^2$, augmente chez les rétrocroisements successifs.

Ces résultats suggèrent que des modificateurs sont également impliqués dans l'expression du caractère de la polyphagie, comme l'ont montré Tazima et coll. (1989).

6. FONCTIONNEMENT DU GENE INHIBITEUR *Su*

Comme on l'a vu plus haut, les larves F_1 de $C136 \times Sj$ n'acceptent pas l'aliment simple qui est déficitaire en poudre de feuilles de mûrier. Ishikawa (1963, 1966) a démontré, en s'appuyant sur des techniques électrophysiologiques, qu'un R-neurone présent dans l'une des sensilles sensorielles, Sensilla styloconicum II, de la maxille larvaire sert de récepteur pour les substances amères contenues dans la nourriture. Yazawa et coll. (1991) ont démontré que, lorsque cette substance amère ou d'autres substances antiappétantes, comme l'extrait foliaire d'orme ou les feuilles de cerisier, sont présentes dans la nourriture, le R-récepteur de la souche normale réagit à ces substances et l'activité de nourrissage est suspendue. Par contraste, chez la souche polyphage, même lorsque des substances

* La souche Ze^F présente le marquage caractéristique rayé fondu et n'ingère pas l'aliment simple.

**Le taux de croissance des larves varie fortement à la génération BF_1 et leur âge a été établi lorsque la majorité des larves sont entrées dans le quatrième âge.

antiappétantes sont présentes dans l'aliment, le R-récepteur ne réagit pas et le nourrissage se poursuit sans être inhibé. En d'autres termes, il manque aux souches polyphages comme *Sj* et *Brd* la capacité de discerner les substances antiappétantes des substances acceptables : elles sont donc insensibles au goût.

Sj accepte l'aliment simple qui ne contient pas de poudre de feuilles de mûrier. Nous pouvons donc en conclure que le mûrier n'est pas nécessaire à son ingestion. A l'inverse, les *F₁* de *Sj* × *C136* non seulement n'acceptent pas ce même aliment même lorsqu'il est exempt de substances antiappétantes mais le mûrier leur est indispensable. Ceci a été démontré lors d'une expérience au cours de laquelle les *F₁* ont été élevés sur aliment simple additionné de poudre de feuilles de mûrier à différentes concentrations (Fig. 9).

Cette figure montre que, si les larves des souches *C136* et *Sj* × *C136* n'acceptent pas l'aliment simple sans poudre de feuilles de mûrier, le taux de croissance des larves augmente proportionnellement à l'addition de mûrier dans l'aliment. Ces résultats indiquent que la présence de poudre de feuilles de mûrier est indispensable pour que les larves ingèrent l'aliment de base. La courbe augmente lentement pour *C136* mais de manière assez abrupte pour *Sj* × *C136*.

Une expérience a ensuite été réalisée afin de déterminer si les larves *F₁* de *Sj* × *C136* réagissent aux substances antiappétantes lorsqu'elles sont ajoutées dans l'aliment simple. Avant de réaliser cette expérience, nous nous sommes assurés que les larves de la souche normale ainsi que les *F₁* de *Sj* × *C136* n'ingèrent pas l'aliment simple additionné de poudre de feuilles de chêne (*Quercus acutissima* Carr.).

L'expérience principale comprend quatre séries de groupes expérimentaux composés d'aliment simple additionné de quantités différentes de poudre de feuilles de mûrier : 0 %, 5 %, 10 % et 20 % en poids sec. Chaque groupe a ensuite été divisé en sous-groupes composés de différentes quantités de poudre de feuilles de chêne : 0 %, 5 % et 10 %. Ces aliments préparés différenciellement ont été donnés aux larves sorties d'éclosion des *F₁* de *Sj* × *C136* pendant 96 heures et leur survie a été enregistrée. Les résultats sont présentés dans la figure 10.

Comme le montre cette figure, lorsque l'addition de poudre de mûrier est de 0 %, le taux de survie ne dépasse pas 0,3 %. Mais chez le groupe comportant 10 % d'addition de mûrier, la survie passe à 86,2 % et, chez le groupe à 20 %, la survie atteint 98,5 %. Cependant, l'addition de poudre de chêne entraîne une diminution de la survie. Par exemple, chez le groupe à 10 % d'addition de mûrier, une addition de 5 % de chêne entraîne une diminution de 30 % de la survie. Chez le groupe à 20 % d'addition de mûrier, la courbe ne diminue que légèrement après addition de chêne. Néanmoins, on relève un retard important de la croissance larvaire (Tableau VI).

Le tableau VI présente le développement larvaire à 96 heures de l'éclosion. Chez le lot n° 4, nourri avec de l'aliment additionné de 20 % de mûrier et de 0 % de chêne, 432 larves (72 %) avaient déjà atteint le 2^e âge, tandis que, chez les lots n° 2, 3, 5 et 6, toutes les larves étaient encore au 1^{er} âge.

Ces résultats indiquent que la présence d'une certaine quantité de mûrier est indispensable pour l'ingestion de l'aliment simple par les larves. Cependant, en cas de mélange avec de la poudre de chêne, même avec 20 % de poudre de feuilles de mûrier, la croissance des larves est fortement retardée probablement en raison de leur aversion pour cette nourriture.

En résumé, les souches polyphages, n'ayant pas la capacité de distinguer les substances antiappétantes du mûrier, sont insensibles au goût. Cependant, chez les *F₁* de *Sj* × *C136*, cette capacité est rétablie et les larves refusent l'aliment simple. Elles commencent à accepter l'aliment simple après addition de poudre de mûrier. *Su* semble donc servir uniquement au rétablissement de la capacité de discrimination.

7. DISCUSSION

(1) Le gène de la polyphagie est-il dominant ou récessif ?

Dans la section 2 de cet article sont présentés des résultats expérimentaux indiquant que les gènes de la polyphagie *Sj* et *Brd* avaient un comportement de dominance par rapport au gène normal (non polyphage). Néanmoins, Kanda et coll. (1988, 1992), sur la base de leurs expériences portant sur

plusieurs races chinoises, soutiennent l'hypothèse opposée, à savoir que *Sj* est récessif par rapport au gène normal. Avant ces travaux, Fujimori et coll. (1980) avaient observé que la polyphagie de la souche *Sj* est dominante par rapport au caractère normal chez le croisement entre *Sj* et plusieurs races japonaises et chinoises lorsque les larves étaient élevées sur milieu artificiel contenant 22 % de poudre de feuilles de mûrier.

Prenant en compte ces interprétations contradictoires, Kanda et coll. (1988) ont affirmé que *Sj* est dominant par rapport au gène normal lorsque les larves sont élevées avec un milieu contenant du mûrier mais avant un comportement récessif lorsque les larves sont élevées sur le milieu sans mûrier LP-1. Cette affirmation est cependant sujette à caution. Comme on l'a décrit dans la section 2, nous avons observé plusieurs races pour lesquelles *Sj* avait un comportement dominant lorsque les *F*₁ étaient élevés sur un milieu déficitaire en mûrier. Le nombre de races ou de souches que nous avons examinés jusqu'à présent n'est pas considérable mais nos résultats permettent de conclure de manière pour ainsi dire certaine que *Sj* est dominant par rapport à la majorité des races japonaises et par rapport à quelques races chinoises. Le fait que *Sj* ait un comportement récessif lors de croisement avec plusieurs races chinoises peut être attribué à l'effet d'un gène inhibiteur, *Su*, qui agit contre le gène dominant *Sj*.

Examinons encore une fois les données expérimentales obtenues par Kanda et coll. Lors de la recherche du troisième groupe de liaison auquel appartient *Sj*, ils ont réalisé de nombreux croisements entre *Sj* et plusieurs souches possédant des gènes marqueurs dominants ou récessifs et ont élevés les descendance sur l'aliment LP-1. Leurs données sur les phénotypes observés aux générations *BF*₁ et *F*₂ sont reproduites dans les tableaux VII et VIII.

Les croisements numérotés 2 à 7 dans le tableau VII représentent l'ensemble des phénotypes ségrégués chez les *BF*₁ du croisement entre *Sj* et plusieurs souches à marqueur dominant. Les données observées pour les six croisements sont au total de *FD390:F+281:ND791:N+782. Le ratio phénotypique est loin de 1:1:1:1, qui est le ratio théorique pour *BF*₁. Or, si l'on considère la différence d'activité de nourrissage entre les phénotypes *F* et les phénotypes *N*, on peut difficilement escompter une uniformité du taux de survie entre les deux groupes phénotypiques. Aussi, l'auteur a calculé le ratio de ségrégation séparément pour chacun des groupes. Après ce traitement, chaque groupe est parvenu au ratio escompté de 1:1, soit : $\chi^2 = 0,10$ ($p < 1\%$) pour le groupe nourri et $\chi^2 = 0,05$ ($p < 1\%$) pour le groupe non nourri. Les données qu'ils ont obtenues correspondent donc bien avec l'estimation basée sur l'hypothèse récessive si l'on effectue cette correction.

Les données ont été traitées de manière similaire pour les combinaisons de croisement avec les souches à marqueur récessif (Tableau VIII). Cependant, les données corrigées ne concordent pas avec le rapport estimé de 3:1 chez les *F*₂, soit $\chi^2 = 6,83$ ($p > 5\%$) pour le groupe nourri et $\chi^2 = 9,03$ ($p > 5\%$) pour le groupe non nourri.

Il apparaît que l'hypothèse récessive est difficilement acceptable pour ce qui concerne la nature du gène *Sj*. Nous avons donc dû revenir à l'hypothèse dominante. Les détails du test de conformité du ratio de ségrégation chez les *F*₂ et/ou les *BF*₁ aux estimations théoriques ont été décrits dans la section 3. L'hypothèse de la dominance semble soulever moins d'objections. Cependant, il est nécessaire d'obtenir un plus grand nombre d'informations pour arriver à une conclusion définitive.

(2) Effet de la dose du gène inhibiteur :

L'hypothèse que *Sj* est dominant présuppose la présence d'un gène dominant supplémentaire qui supprime l'activité du gène *Sj*. De plus, un autre postulat est également nécessaire : *Su* peut inhiber l'action d'une seule dose du gène *Sj* mais n'est pas assez puissant pour inhiber une double dose du gène *Sj*, c'est-à-dire *Sj* > *Sj*, mais *Su* < 2*Sj*. Ces deux postulats permettent d'expliquer le mode de ségrégation chez les *F*₂ et les *BF*₁ du croisement entre *Sj* et *c*136 sans aucune contradiction.

Nous avons vu, dans le tableau III, que le taux de croissance des larves est de 0 % chez les *F*₁ du croisement *Sj* × *C*136 et de leur réciproque, tandis que, chez les *F*₁ de *Brd* × *C*136 et de leur réciproque, le taux de croissance des larves est de 7,6 % et de 16,4 % ou, approximativement, 10 %

* *F* et *N* représentent respectivement les groupes nourris et non nourris. *D* et + indiquent la présence et l'absence d'un marqueur dominant.

en moyenne. On observe une incidence de croissance larvaire similaire chez le croisement de Shokei $\times$ Sj, soit 3,4 % et 7,9 %.

Ces observations indiquent que le potentiel d'inhibition de *Su*, qui est issu du parent C136, n'est pas assez fort pour inhiber totalement l'action du gène *Brd*. En d'autres termes, il n'est assez fort pour rétablir la capacité des R-neurones à percevoir les substances antiappétantes.

Ces remarques semblent étayer l'hypothèse que $Su > Sj$ mais $Su < 2Sj$.

En définitive, nous concluons que l'hypothèse selon laquelle *Sj* est dominant par rapport au caractère du nourrissage normal est plus fiable que l'hypothèse de la récessivité.

STUDY ON THE EFFECT OF FLUORIDE ON GROWTH, DEVELOPMENT AND ECONOMIC PARAMETERS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, P.R. China.

*In the present investigation two silkworm races, viz. Zhenong 1 and Hang 8, were selected to study the larval duration, larval weight, silk gland and fat body weight at different development periods of the 4th and 5th instar, and economic parameters of cocoon weight, cocoon shell and shell ratio after oral administration of NaF at the time of feeding mulberry leaves. It was observed that larval growth and development were retarded in batches treated with various concentrations of NaF solution compared to controls. Silk gland and fat body weight were significantly decreased when fluoride concentration was increased on mulberry leaves, and these effects were strengthened as administration times were increased. The cocooning rate of *B. mori* decreased significantly after the treatment with fluoride. It was also observed that fluoride has no significant effect on the cocoon shell ratio. Hang 8 was more susceptible to fluoride pollution than the race, Zhenong 1. These findings suggest that breeding high fluoride-resistant races of *B. mori* is possible.*

Keywords: *Bombyx mori*, fluoride, larval weight, silk gland, fat body, cocoon shell weight.

INTRODUCTION

Fluorides are recognised as common gas and particulate pollutants emitted from many industrial processes and coal burning. They often cause serious economic loss and ecological damage. Consequently, some aspects of the effects of fluoride have been extensively studied, especially with reference to the effects on plants (Mansfield, 1976). Similarly, the effects of fluoride on humans and animals are well known (National Academy of Science, 1974; World Health Organization, 1984). However, the effect of fluoride is very little known on many other aspects of insects. Some effects have been experimentally studied in the pine shoot moth, honey bee, bark beetle, cabbage looper caterpillar, flour beetle, and fruit fly (Alstad *et al.*, 1982; Buse, 1986; Dewey, 1973; Davies *et al.*, 1992; Gerdes *et al.*, 1971; Gong *et al.*, 1991; Hugues, 1985; Johansson *et al.*, 1972; Mayer *et al.*, 1988). These studies have shown that fluoride can alter insect populations, fecundity and growth rate, as well as cause mortality.

Since the 1980s in China, rural industries have been developing rapidly. The airborne fluoride emitted from brick kilns, phosphate fertilizer plants and other industries have resulted in serious impact on agriculture, horticulture and forestry. This problem is particularly serious for the silk industry and causes great damage resulting from the ingestion of fluoride-polluted mulberry leaves in the main sericultural regions of China. There is extensive literature available on the effects of fluoride on mulberry growth and development. Further, the decline of cocoon yield resulting from fluoride pollution was studied by Bian *et al.* (1987), He (1984), Qian *et al.* (1984), Shong (1985) and Wang *et al.* (1980, 1988). Wang *et al.* (1988) have established the quantitative relationship between silkworm cocoon yield and fluoride contents in mulberry leaves and atmosphere. It is also well known that fluoride-polluted mulberry leaves depress the feeding rate of silkworm larvae, cause reduction in growth rate and increase mortality, and that the toxicity of fluoride pollution for silkworm larvae

depends on the quantity of fluoride accumulation on the mulberry leaves. However, these published data are descriptive, and detailed discussion on the effects of fluoride on silkworm growth, development, economic parameters and its toxicology are lacking. This paper deals with the effects of fluoride on larval duration, larval weight, silk gland, fat body weight and economic parameters of cocoon characters.

MATERIALS AND METHODS

For the present investigation, a Chinese and a Japanese bivoltine race of *B. mori*, namely, Zhenong 1 and Hang 8, were obtained from the Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University (China). Three grams of newly hatched silkworm larvae of each race were reared under standard laboratory conditions adopting a general rearing method. Fourth instar larvae were grouped into seven treatments of three replicates, each containing 100 worms. A known quantity of sodium fluoride (NaF) was dissolved in a small quantity of distilled water and then diluted to 30, 60, 120, 240, 480 and 960 mg/kg solution in distilled water. Freshly collected mulberry leaves from the field were soaked in the above concentrations for ten minutes individually and dried at room temperature. The control group was fed with mulberry leaves soaked in distilled water.

The first test on the effect of fluoride on silkworm larvae deals with larval duration and economic parameters of cocoon characters. Mulberry leaves soaked in solutions of NaF of different concentrations were fed to the newly exuviated fourth instar larvae for 48 hours. Then the silkworms were fed with untreated mulberry leaves. After treatment the toxic symptoms of larvae were recorded and photographed. The larval duration was calculated from the beginning of the fourth instar to the end of the fifth instar. Post-cocooning parameters, such as female and male cocoon weight, shell weight and cocooning rate were calculated for the post-cocooning period.

The procedure for the second test was the same as that of the first test except feeding of NaF-treated mulberry leaves began from the 2nd day of the fifth instar. The larva was weighed, and then silk gland and fat body were removed and weighed at intervals of 24 hr, 48 hr and 96 hr after treatment.

All of the data collected in this experiment were subjected to a one-way analysis of variance test to determine the significance between corresponding parameters of the treated groups and control group following the method of Zhong (1992). The percent index was calculated for each parameter of treated group over the corresponding parameters of control groups. In addition, the treated and non-treated mulberry leaves in the present experiments were subjected to determination of fluoride concentration. The fluoride analyses were carried out using a fluoride ion selective electrode following the method of Wu (1982). The actual corresponding fluorine ion concentrations of treated mulberry leaves are 24.7, 53.3, 85.6, 158.9, 361.9, 603.9, 949.9 mg/kg for the first test and 38.8, 67.3, 104.3, 255.8, 390.6, 975.6 and 1250 mg/kg for the second test, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Larval duration and larval weight:

Silkworm larvae fed with mulberry leaves soaked in different concentrations of NaF solution are shown in Figures 1 and 2. Larvae affected by fluoride are characterized by a low uptake of food, softening of the body and sluggishness. High fluoride concentrations caused the silkworms to die within 24 hours from acute poisoning (over 361.9 mg/kg for Hang 8 and over 975.6 mg/kg for Zhenong 1). Further, black specks were observed on the intersegmental membranes of the succeeding instar larvae and the skin was nonelastic, hence easy to be broken, which resulted in mortality due to blood leakage.

The resulting larval duration and larval weights after treatment with different solutions of NaF concentrations are presented in Table I. Larvae grew less and developed more slowly on mulberry leaves treated with NaF solution than on non-treated mulberry leaves. These effects were more pronounced when the fluoride content in mulberry leaves was increased. It was reported by Wang *et al.* (1988) that the threshold concentration of fluoride in mulberry leaves which is toxic to silkworm larvae is above 30-50 mg/kg. Our results agree with the findings of Wang *et al.* (1988) that above

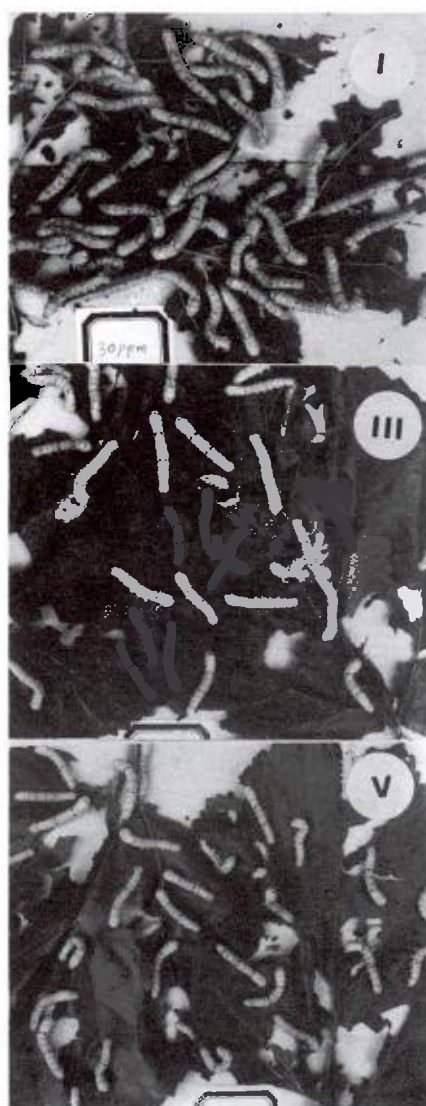
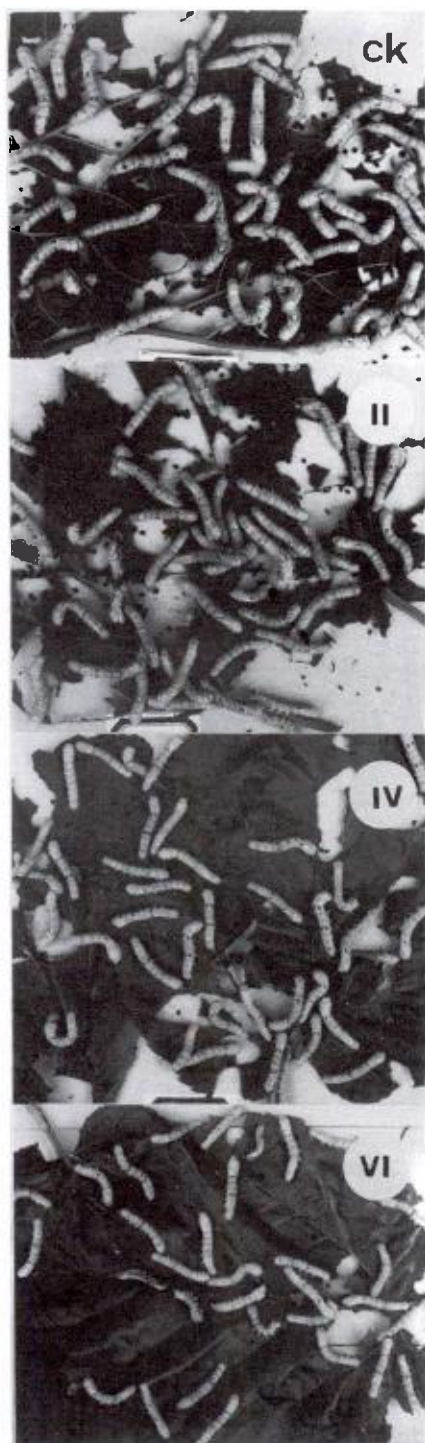


Fig. 1: Fourth instar larvae of *B. mori* feeding on mulberry leaves of different fluoride content for 48 hours starting at the first feeding of the fourth instar.

The race is Zhenong 1.

Fig. 1 : Larves de B. mori au 4e âge se nourrissant pendant 48 heures à partir du premier nourrissage du 4e âge de feuilles de mûrier présentant des contenus en fluorure différents.

La race est Zhenong 1.

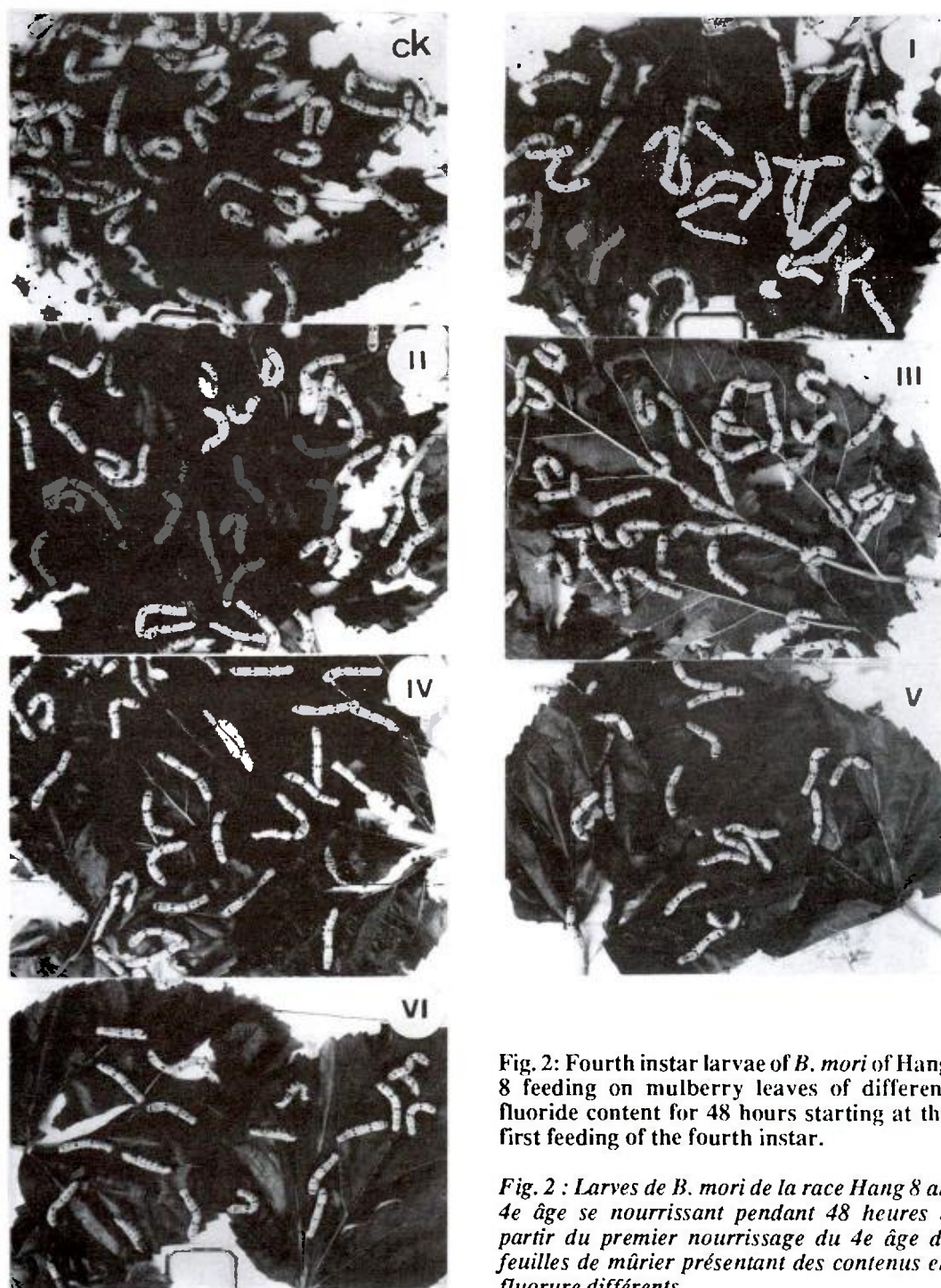


Fig. 2: Fourth instar larvae of *B. mori* of Hang 8 feeding on mulberry leaves of different fluoride content for 48 hours starting at the first feeding of the fourth instar.

Fig. 2 : Larves de *B. mori* de la race Hang 8 au 4^e âge se nourrissant pendant 48 heures à partir du premier nourrissage du 4^e âge de feuilles de mûrier présentant des contenus en fluorure différents.

67.3 mg/kg fluoride concentration in mulberry leaves will have a significant effect on larval weight ($P > 0.01$). Chen (1993) reported that Zhenong 1 is a high fluoride-resistant race and Hang 8 is a low fluoride-resistant race. For Zhenong 1, a concentration of 85.6 mg/kg fluoride significantly increased larval duration, while for Hang 8, a concentration of 53.3 mg/kg fluoride significantly increased larval duration. An increase of fluoride to 158.9 mg/kg resulted in death for the low resistance race, Hang 8. Similar results were reported after treatment with NaF in the cabbage looper and army worm by Hugues *et al.* (1985) and Gung *et al.* (1991). These results agree with our findings showing that the increase in the larval duration and the decrease of larval weight in insects may be due to the retarding effect of fluoride in their metabolic system.

Table I. Effect of fluoride on larval duration and larval weight of *Bombyx mori*.

Tableau I. Effet du fluorure sur la durée et le poids larvaires de *Bombyx mori*.

Groups	Larval duration (mean $\pm$ SD) (hours)	Larval weight (g) (mean $\pm$ SD)		
		24 hr	48 hr	96 hr
Groupes	Durée larvaire (moyenne $\pm$ SD) (heures)	Poids larvaire (g) (moyenne $\pm$ SD)		
		24 h	48 h	96 h
Zhenong 1				
CK	340 $\pm$ 6.93 (100)	1.9023 $\pm$ 0.0585 (100)	2.0967 $\pm$ 0.2192 (100)	2.7942 $\pm$ 0.145 (100)
I	347 $\pm$ 10.07(102)	1.7041 $\pm$ 0.1607 (90)	1.8814 $\pm$ 0.0310 (89)	2.7621 $\pm$ 0.1766 (99)
II	362 $\pm$ 4.53 (106)**	1.6944 $\pm$ 0.0682 (89)**	1.8862 $\pm$ 0.0788 (89)**	2.1206 $\pm$ 0.1125 (76)*
III	407 $\pm$ 7.78 (120)**	4.6299 $\pm$ 0.0861 (86)**	1.6477 $\pm$ 0.0423 (79)**	1.8973 $\pm$ 0.0949 (68)**
IV	433 $\pm$ 12.73(127)**	1.5560 $\pm$ 0.730 (82)**	1.4404 $\pm$ 0.0304 (69)**	1.6516 $\pm$ 0.0332 (59)**
V	462 $\pm$ 9.90 (136)**	1.4638 $\pm$ 0.0194 (77)**	1.4504 $\pm$ 0.0332 (69)**	1.6341 $\pm$ 0.2013 (58)**
VI	467 $\pm$ 9.19 (137)**	1.4438 $\pm$ 0.0442 (76)**	1.3646 $\pm$ 0.1446 (65)**	1.5202 $\pm$ 0.1237 (54)**
LSD _{0.05}	12.25	0.0958	0.1230	0.1547
LSD _{0.01}	17.00	0.1330	0.1706	0.2143
Hang 8				
CK	502 $\pm$ 0.00 (100)	1.8362 $\pm$ 0.1250 (100)	2.1038 $\pm$ 0.1125 (100)	2.6335 $\pm$ 0.0557 (100)**
I	516 $\pm$ 28.28(107)**	1.5782 $\pm$ 0.1080 (86)**	1.7063 $\pm$ 0.2341 (81)**	2.0316 $\pm$ 0.0696 (77)**
II	570 $\pm$ 5.66 (114)**	1.4733 $\pm$ 0.0160 (80)**	1.5051 $\pm$ 0.1126 (72)**	1.5677 $\pm$ 0.2370 (60)**
III	-	1.3811 $\pm$ 0.0340 (75)**	1.3150 $\pm$ 0.1212 (64)**	1.4585 $\pm$ 0.0829 (55)**
IV	-	1.2176 $\pm$ 0.2690 (66)**	1.2722 $\pm$ 0.0347 (60)**	-
V	-	-	-	-
VI	-	-	-	-
LSD _{0.05}	17.86	0.2001	0.1953	0.2169
LSD _{0.01}	24.79	0.2846	0.2777	0.3156

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

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

SD: Standard deviation / Ecart type.

CK: Check / Témoin.

Percentage over CK in parentheses / Pourcentage du témoin entre parenthèses.

Table II. Effect of fluoride on silk gland and fat body weight of *Bombyx mori*.Tableau II. Effet du fluorure sur le poids de la glande séricigène et du corps adipeux de *Bombyx mori*.

Groups	Silk gland weight (g) (mean $\pm$ SD)			Fat body weight (g) (mean $\pm$ SD)		
	24 hr	48 hr	96 hr	24 hr	48 hr	96 hr
	<i>Poids de la glande séricigène (g) (moyenne $\pm$ SD)</i>			<i>Poids du corps adipeux (g) (moyenne $\pm$ SD)</i>		
<i>Groupes</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>96 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>96 h</i>
Zhenong 1						
CK	0.2388 $\pm$ 0.0150 (100)	0.3150 $\pm$ 0.0074 (100)	0.7576 $\pm$ 0.0727 (100)	0.0942 $\pm$ 0.0060 (100)	0.0857 $\pm$ 0.1112 (100)	0.2542 $\pm$ 0.0320 (100)
I	0.1968 $\pm$ 0.0051 (83)**	0.3130 $\pm$ 0.0094 (101)	0.7270 $\pm$ 0.0281 (96)	0.0786 $\pm$ 0.0074 (83)**	0.0887 $\pm$ 0.0066 (104)	0.2647 $\pm$ 0.0406 (104)**
II	0.2010 $\pm$ 0.0113 (84)**	0.2853 $\pm$ 0.0318 (91)	0.6250 $\pm$ 0.0552 (82)**	0.0824 $\pm$ 0.0133 (87)**	0.0870 $\pm$ 0.0015 (102)	0.1934 $\pm$ 0.0079 (76)**
III	0.1711 $\pm$ 0.0221 (72)**	0.1896 $\pm$ 0.0180 (60)**	0.2653 $\pm$ 0.1350 (35)**	0.0709 $\pm$ 0.0031 (75)**	0.0579 $\pm$ 0.0098 (68)**	0.0991 $\pm$ 0.0360 (39)**
IV	0.1632 $\pm$ 0.0276 (68)**	0.1676 $\pm$ 0.0026 (53)**	0.2346 $\pm$ 0.0121 (31)**	0.0616 $\pm$ 0.0081 (65)**	0.0581 $\pm$ 0.0098 (68)**	0.0668 $\pm$ 0.0122 (26)**
V	0.1479 $\pm$ 0.0140 (62)**	0.1105 $\pm$ 0.0259 (35)**	0.1574 $\pm$ 0.0468 (21)**	0.0503 $\pm$ 0.0090 (53)**	0.0420 $\pm$ 0.0035 (49)**	0.0479 $\pm$ 0.0159 (19)**
VI	0.1565 $\pm$ 0.0060 (65)**	0.1097 $\pm$ 0.0153 (34)**	0.1874 $\pm$ 0.0107 (20)**	0.0552 $\pm$ 0.0032 (59)**	0.0392 $\pm$ 0.0010 (46)**	0.0493 $\pm$ 0.0177 (19)**
LSD _{0.05}	0.0186	0.0215	0.0743	0.0097	0.0115	0.0302
LSD _{0.01}	0.0259	0.0298	0.1031	0.0143	0.0159	0.0420
Hang 8						
CK	0.1976 $\pm$ 0.0090 (100)	0.2471 $\pm$ 0.0314 (100)	0.6862 $\pm$ 0.0300 (100)	0.1007 $\pm$ 0.0090 (100)	0.0880 $\pm$ 0.0128 (100)	0.2315 $\pm$ 0.0193 (100)
I	0.1349 $\pm$ 0.0480 (68)**	0.1768 $\pm$ 0.0608 (72)**	0.3798 $\pm$ 0.0358 (55)**	0.0857 $\pm$ 0.0161 (85)**	0.0618 $\pm$ 0.0153 (70)**	0.1811 $\pm$ 0.0096 (78)**
II	0.1015 $\pm$ 0.0140 (51)**	0.2094 $\pm$ 0.0356 (24)**	0.2055 $\pm$ 0.0190 (30)**	0.0754 $\pm$ 0.0161 (75)**	0.0617 $\pm$ 0.0060 (70)**	0.0992 $\pm$ 0.0102 (42)**
III	0.1119 $\pm$ 0.0017 (57)**	0.0807 $\pm$ 0.0214 (33)**	0.0964 $\pm$ 0.0120 (14)**	0.0580 $\pm$ 0.0011 (58)**	0.0416 $\pm$ 0.0113 (47)**	0.0564 $\pm$ 0.0071 (24)**
IV	0.0734 $\pm$ 0.0340 (37)**	0.0601 $\pm$ 0.0039 (24)**		0.0423 $\pm$ 0.0265 (42)**	0.0214 $\pm$ 0.0074 (25)0**	
V						
VI						
LSD _{0.05}	0.0381	0.0508	0.0431	0.0231	0.0178	0.0225
LSD _{0.01}	0.0541	0.0723	0.0628	0.0329	0.0254	0.0327

* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %.*SD: Standard deviation / *Ecart type.*** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %.*CK: Check / *Témoin.*Percentage over CK in parentheses / *Pourcentage du témoin entre parenthèses.*

Table III. Effect of fluoride on cocoon economic characters of *Bombyx mori*.Tableau III. Effet du fluorure sur les caractères économiques du cocon de *Bombyx mori*.

Groups	Female			Male			Cocooning rate (%)
	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	
Groupes	Femelles			Mâles			Taux de filage (%)
	Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse (%)	
Zhenong 1							
CK	2.003 ± 0.084 (100)	0.339 ± 0.004 (100)	16.91 ± 0.51 (100)	1.570 ± 0.013 (100)	0.315 ± 0.006 (100)	20.26 ± 0.19 (100)	79.41 ± 2.15 (100)
I	1.993 ± 0.016 (100)	0.336 ± 0.009 (99)	16.86 ± 0.13 (100)	1.568 ± 0.011 (100)	0.312 ± 0.015 (99)	19.91 ± 0.31 (98)	80.60 ± 1.86 (101)
II	1.916 ± 0.048 (96)	0.323 ± 0.018 (95)	16.76 ± 0.50 (99)	1.452 ± 0.039 (93)	0.294 ± 0.015 (93)	20.22 ± 0.36 (100)	70.11 ± 2.51 (88)**
III	1.914 ± 0.058 (96)	0.323 ± 0.008 (95)	16.90 ± 0.68 (100)	1.457 ± 0.053 (93)	0.301 ± 0.013 (96)	20.65 ± 0.13 (102)	67.02 ± 2.47 (84)**
IV	1.837 ± 0.042 (92)	0.315 ± 0.014 (93)	17.12 ± 0.36 (101)	1.356 ± 0.028 (86)**	0.276 ± 0.004 (88)**	20.31 ± 0.27 (100)	59.13 ± 2.76 (74)**
V	1.625 ± 0.164 (81)**	0.260 ± 0.034 (77)**	15.98 ± 0.56 (95)	1.200 ± 0.047 (76)**	0.246 ± 0.005 (78)**	20.54 ± 0.65 (101)	38.56 ± 1.39 (49)**
VI	1.514 ± 0.177 (76)**	0.241 ± 0.043 (71)**	15.89 ± 0.94 (94)	1.017 ± 0.134 (66)**	0.204 ± 0.034 (65)**	20.06 ± 0.79 (99)	29.26 ± 1.88 (37)**
LSD _{0.05}	0.184	0.036	-	0.133	0.037	-	3.82
LSD _{0.01}	0.255	0.049	-	0.185	0.052	-	5.30
Hang 8							
CK	1.701 ± 0.080 (100)	0.368 ± 0.017 (100)	21.65 ± 0.46 (100)	1.271 ± 0.029 (100)	0.304 ± 0.015 (100)	23.92 ± 0.71 (100)	47.32 ± 6.45 (100)
I	1.675 ± 0.018 (98)	0.345 ± 0.056 (94)	20.56 ± 1.38 (95)	1.241 ± 0.044 (98)	0.306 ± 0.025 (101)	24.61 ± 1.56 (100)	34.70 ± 3.55 (73)**
II	1.455 ± 0.159 (86)**	0.267 ± 0.101 (73)*	20.57 ± 1.06 (95)	1.132 ± 0.060 (89)	0.207 ± 0.06 (68)**	21.36 ± 3.21 (89)	18.15 ± 3.73 (38)**
III	-	-	-	-	-	-	10.40 ± 1.94 (22)
IV	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	-	-	-	-
LSD _{0.05}	0.034	0.096	-	0.207	0.031	-	2.825
LSD _{0.01}	0.051	0.144	-	0.313	0.046	-	4.279

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

SD: Standard deviation / Ecart type.

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

CK: Check / Témoin.

Percentage over Ck in parentheses / Pourcentage du témoin entre parenthèses.

The cocooning rate is expressed in angular transformed values / Le taux de filage est exprimé en transformées angulaires.

Silk gland and fat body weights:

The results presented in Table II revealed that silk gland and fat body weights are significantly decreased in fifth instar larvae by feeding mulberry leaves treated with NaF. The silk gland is the place where sericin and fibroin are synthesised. The decrease of the silk gland weight after treatment with NaF might be due to the harmful effects of fluoride on the synthetic activity of the silk gland, which resulted in the decrease of silk gland protein synthesis, DNA replication and accumulation of RNA, as reported by Elsair *et al.* (1988). Thus larvae poisoned by fluoride spun very little silk. Table II also shows that the decrease of silk gland weight of the high fluoride-resistant race of *Bombyx mori*, Zhenong 1, is less than that of the low fluoride-resistant race of *B. mori*, Hang 8.

The results of fat body weight changes with fluoride concentration in mulberry leaves and feeding time indicate that fluoride has a harmful effect on growth and development of this organ. The larval fat body is an important site of metabolic activity and a major storage organ. After feeding mulberry leaves treated with NaF, the larval fat body weight was significantly decreased. Further, the harmful effects of fluoride were observed with an increase in the feeding time of mulberry leaves treated with NaF. Feeding of mulberry leaves treated with 255.8 mg/kg fluoride for 24 hours resulted in decreases of fat body weight of Zhenong 1 and Hang 8 by 28% and 42%, respectively. Furthermore, feeding for a period of 48 hours caused decreases of fat body weight by 32% and 53%, respectively. The silk gland and fat body appeared to more sensitive to fluoride than the wet mass of larvae, cocoon weight, and cocoon shell weight.

Cocooning rate and cocoon characters:

The cocooning percentage index, which indicates the healthiness of *B. mori*, significantly decreased in the fluoride-treated groups. The female and male cocoon weight and shell weight decreased significantly when the fluoride concentration was above 361.9 mg/kg for Zhenong 1 and 85.6 mg/kg for Hang 8, respectively. The cocoon weight and cocoon shell weight of the low fluoride-resistant race were more susceptible to fluoride pollution and the toxic effects of fluoride on cocoon characters of males were more obvious than those of the females. The non significant effect (Table III) of fluoride on the cocoon shell ratio suggests that the cocoon shell ratio is a stable genetic character and not altered by fluoride pollution. It was also observed that a concentration above 53.3 mg/kg fluoride in mulberry leaves resulted in a significant decrease of cocooning rate in low fluoride-resistant race of *B. mori*, whereas for the high fluoride-resistant race, a significant decrease was observed only when mulberry leaves contained more than 85.6 mg/kg fluoride. These results clearly indicate that fluoride has a harmful effect on economic characters of *B. mori*, which results in a significant decrease of cocoon yield.

CONCLUSIONS

The findings of the present experiments indicate that the harmful effects of fluoride on growth, development and economic characters of *B. mori* are related to its resistance to fluoride. In the case of a high fluoride-resistant silkworm race, the harmful effects were manifested mainly when the fluoride concentration in mulberry leaves is very high. But in the low fluoride-resistant race, serious effects were observed even with low concentrations of fluoride. Under the present circumstances, it is suggested that breeding a high fluoride-resistant race of *B. mori* could be of great use to the sericulture industry of the country. These results also agree with earlier findings. The possibility of breeding *B. mori* with high fluoride resistance is also evident from the work presented here.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the International Foundation for Science (IFS) for providing financial support.

REFERENCES

- ALSTAD D.N., EDMUNDS G.F. Jr, WEINSTEIN L.H. (1982) Effects of air pollutants on insect populations. *Ann. Rev. Plant Entomol.*, 27, 369-384.
- BIAN Y.-M., WANG J.-X. (1987) Characteristics of fluoride accumulation in mulberry leaves and pollution forecasting. *J. Environ. Sci. China*, 8, 71-74.
- BUSE A. (1986) Fluoride accumulation in invertebrates near an aluminium reduction plant in Wales. *Environ. Pollut. (Series A)*, 41, 199-217.
- CHEN Y.-Y. (1993) Changes in fluoride and calcium in the blood of the fluorosis-affected silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 33(1), 153-157.
- DEWEY J.E. (1973) Accumulation of fluorides by insects near an emission source in Western Montana. *Environ. Entomol.*, 2, 179-182.
- DAVIES M.T., DANISON A.W., PORT G.R. (1992) Fluoride loading of larvae of pine sawfly from a polluted site. *J. Applied Ecology*, 29, 63-69.
- ELSAIR J., KHEFAT K. (1988) Subcellular effects of fluoride. *Fluoride*, 21, 93-99.
- FUJI I.M., HAYASHI H. (1972) Fluoride contained in mulberry leaves and silkworms in the area around a tile factory. *J. Sericult. Sci. Japan*, 41, 150-153.
- FUJI I.M., HONDA S. (1972) The relative oral toxicity of fluoride compounds for silkworm larvae. *J. Sericult. Sci. Japan*, 41, 104-110.
- GERDES R.A., SMITH J.D., APPLGATE H.G. (1971) The effects of atmospheric hydrogen fluoride upon *Drosophila melanogaster*: II. Fecundity, hatchability and fertility. *Atmos. Environ.*, 5, 117-122.
- GONG P.-Y., LI X.-Z., WU K.-J. (1991) Effects of atmospheric fluoride pollution on the growth and reproduction of army worm, *Mythimna separata* (Walker). *Acta Ecologica Sinica*, 11, 219-224.
- HUGUES P.R. (1985) Fluoride transfer in the environment: accumulation and effects on the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, of fluoride from water soluble salts and HF-fumigated leaves. *Environ. Pollut. (Series A)*, 37, 175-192.
- HE Y.-T. (1984) A preliminary note on the effect of fluoride pollution in the atmosphere on silkworm cocoon production. *Guangdong Sericult. Bull.*, 1, 1-4.
- JOHANSSON T.S.K., JOHANSSON M.P. (1972) Sublethal doses of sodium fluoride affecting fecundity of confused flour beetles. *J. Econ. Entomol.*, 65, 365-367.
- MANSFIELD T.A. (Editor) (1976) Effects of air pollutants on plants. *Soc. Experimental Biol. Seminar, Series, 1*. Cambridge University Press.
- MAYER D.F., LUNDER J.D., WEINSTEIN L.H. (1988) Evaluation of fluoride levels and effects on honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *Fluoride*, 21, 113-120.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE (1974) Effects of fluorides on animals. *US National Acad. Sci.*, Washington, D.C.
- QIAN D.-F., LI Z.-F., WANG J.-X., GAO X.-P. (1984) A study on fluoride and mulberry-silkworm ecosystem. *J. Environ. Sci. China*, 5, 7-11.
- SHONG L.-F. (1985) A report on the effect of fluoride pollution on sericulture production. *Jiangsu Seric.*, 3, 16-19.
- WANG J.-X., LI Z.-F., QIAN D.-F., GAO X.-P., MA D.-H., LI R.-Q. (1980) Accumulation and translocation of fluoride in mulberry-silkworm ecosystem. *Environ. Qual. China*, 1, 22-25.
- WANG J.-X., BIAN Y.-H. (1988) Fluoride effects on the mulberry-silkworm system. *Environ. Pollut. (Series A)*, 52, 11-18.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1984) Fluoride and Fluorides Environmental Health Criteria. Series 36, World Health Organization, Geneva.
- WU F.-Z. (1982) A rapid method to determine trace fluoride in mulberry leaves and silkworm. *Bull. of Seric.*, 4, 30-32.
- ZHONG B.-X. (1992) Statistics for Biology. Shanghai Sci. and Technol. Press.

ETUDE DE L'EFFET DU FLUOR SUR LA CROISSANCE, LE DEVELOPPEMENT ET LES PARAMETRES ECONOMIQUES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, R.P. Chine.

*Dans cette étude, deux races de vers à soie, Zhenong 1 et Hang 8, ont été sélectionnées afin d'étudier la durée larvaire, le poids larvaire, le poids de la glande séricigène et du corps adipeux à différents stades du développement au 4^e et au 5^e âge, ainsi que les paramètres économiques relatifs au poids du cocon, à la coque et à la richesse soyeuse après administration orale de NaF au moment du nourrissage avec des feuilles de mûrier. La croissance et le développement larvaires sont retardés chez les lots traités avec différentes concentrations de solutions de NaF par rapport aux lots témoins. Le poids de la glande séricigène et du corps adipeux diminue de manière significative lorsque la concentration en fluorure des feuilles de mûrier augmente et ces effets sont encore plus prononcés lorsque le nombre d'administrations augmente. Le taux de filage de *B. mori* diminue de manière significative après traitement au fluorure. Le fluorure n'a pas d'effet significatif sur la richesse soyeuse. Hang 8 est plus sensible à la pollution par le fluorure que la race Zhenong 1. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de sélectionner des races de *B. mori* fortement résistantes au fluorure.*

INTRODUCTION

On sait que les fluorures sont des gaz communs et des microparticules polluantes émis par de nombreux processus industriels et la combustion du charbon. Ils occasionnent souvent de lourdes pertes économiques et des dégâts écologiques. Certains aspects des effets du fluorure, particulièrement sur les végétaux (Mansfield, 1976), ont donc été étudiés de manière approfondie. De même, les effets du fluorure sur les humains et les animaux sont bien connus (National Academy of Science, 1974 ; World Health Organization, 1984). Cependant, l'effet du fluorure chez les insectes est mal connu. Certains effets ont été étudiés en laboratoire chez le papillon de la poussée du pin, l'abeille, la bostryche, l'arpeuteuse du chou, le ténébrion et la drosophile (Alstad et coll., 1982 ; Buse, 1986 ; Dewey, 1973 ; Davies et coll., 1992 ; Gerdes et coll., 1971 ; Gong et coll., 1991 ; Hugues, 1985 ; Johansson et coll., 1972 ; Mayer et coll., 1988). Ces études ont démontré que le fluorure peut modifier les populations, la fécondité et le taux de croissance des insectes et provoquer une mortalité.

Depuis les années quatre-vingts, les industries rurales se sont développées rapidement en Chine. Le fluorure, qui est porté par l'air et émis par les fours à briques, les fermenteurs à phosphate et autres activités industrielles, a des effets nocifs sur l'agriculture, l'horticulture et la sylviculture. Ce problème est particulièrement grave pour l'industrie de la soie et occasionne des pertes importantes dues à l'ingestion de feuilles de mûrier polluées par les fluorures dans les principales régions séricicoles de Chine. On dispose d'une documentation importante sur les effets du fluorure sur la croissance et le développement du mûrier. En outre, la baisse du rendement en cocons due à la pollution par les fluorures a été étudiée par Bian et coll. (1987), He (1984) Qian et coll. (1984), Shong (1985) et Wang et coll. (1980, 1988). Wang et coll. (1988) ont déterminé la relation quantitative entre le rendement en cocons et les teneurs en fluorure dans les feuilles de mûrier et dans l'atmosphère. Il est également bien connu, d'une part, que les feuilles de mûrier polluées par le fluorure entraînent une diminution de taux de nourrissage des larves de vers à soie, provoquant une réduction du taux de croissance et

une augmentation de la mortalité et, d'autre part, que la toxicité de la pollution par les fluorures pour les larves de vers à soie dépend de la quantité de fluorure accumulée dans les feuilles de mûrier. Cependant, ces données sont purement descriptives et il n'existe pas de discussion détaillée sur les effets du fluorure sur la croissance, le développement et les paramètres économiques du ver à soie ni sur sa toxicologie. Cet article traite des effets du fluorure sur la durée larvaire, le poids larvaire, le poids de la glande séricigène et du corps adipeux et sur les paramètres économiques du cocon.

MATERIELS ET METHODES

Pour cette étude, une race bivoltine chinoise, Zhenong 1, et une race bivoltine japonaise, Hang 8, ont été fournies par le Département de sériciculture de l'Université agricole de Zhejiang (Chine). Trois grammes de larves sorties d'éclosion de chacune des races ont été élevés en laboratoire dans des conditions standard selon une méthode d'élevage générale. Les larves du quatrième âge ont été réparties en sept traitements de trois réplicats contenant chacun 100 vers. Une quantité connue de fluorure de sodium (NaF) a été dissoute dans une petite quantité d'eau distillée puis diluée dans l'eau distillée jusqu'à obtention de solutions à 30, 60, 120, 240, 480 et 960 mg/kg. Des feuilles de mûrier fraîchement cueillies ont été trempées individuellement dans ces solutions pendant 10 minutes et séchées à température ambiante. Le groupe témoin a été nourri avec des feuilles de mûrier trempées dans de l'eau distillée.

Le premier test sur l'effet du fluorure sur les larves de vers à soie concerne la durée larvaire et les paramètres économiques des caractères du cocon. Les feuilles de mûrier imbibées de NaF à différentes concentrations ont été données comme nourriture aux larves du quatrième âge juste après leur mue pendant 48 heures. Les vers à soie ont ensuite été nourris avec des feuilles de mûrier non traitées. Après traitement, les symptômes de toxicité ont été enregistrés et photographiés. La durée larvaire a été calculée du début du quatrième âge à la fin du cinquième âge. Les paramètres post-filage, comme le poids d'un cocon mâle et d'un cocon femelle, le poids de la coque et le taux de filage ont été pris en compte pour la période post-filage.

La méthode suivie pour le deuxième test est identique à celle du premier test à la différence que le nourrissage avec des feuilles de mûrier traitées au NaF a commencé au 2^e jour du cinquième âge. Les larves ont été pesées, puis la glande séricigène et le corps adipeux ont été prélevés et pesés 24, 48 et 96 heures après le traitement.

Toutes les données recueillies dans cette expérience ont été soumises à une analyse de variance unidimensionnelle afin de déterminer la signification entre les paramètres des groupes traités et ceux des groupes témoins, suivant la méthode de Zhong (1992). Le pourcentage a été calculé pour chaque paramètre du groupe traité par rapport aux paramètres correspondants des groupes témoins. De plus, on a calculé les teneurs en fluorure des feuilles de mûrier traitées et non traitées utilisées dans ces expériences. Les analyses concernant le fluorure ont été réalisées à l'aide d'une électrode sélective à ions fluorures suivant la méthode de Wu (1982). Les concentrations en ions fluorures correspondantes réelles des feuilles de mûrier traitées sont respectivement : 24,7, 53,3, 85,6, 158,9, 361,9, 603,9 et 949,9 mg/kg pour le premier test et 38,8, 67,3, 104,3, 255,8, 390,6, 975,6 et 1250 mg/kg pour le deuxième test.

RESULTATS ET DISCUSSION

Durée et poids larvaires :

Les larves de vers à soie nourries avec des feuilles de mûrier imbibées de différentes concentrations de NaF sont montrées dans les figures 1 et 2. Les larves affectées par le fluorure se caractérisent par une ingestion faible de nourriture, un corps mou et une atonie. Les concentrations élevées en fluorure entraînent la mort par empoisonnement aigu des vers à soie dans les 24 heures (plus de 361,9 mg/kg pour Hang 8 et plus de 975,6 mg/kg pour Zhenong 1). De plus, des taches noires apparaissent sur les membranes intersegmentales des larves des âges suivants ; leur peau est tendue et, de ce fait, se fend facilement, entraînant une mortalité due à la perte de sang.

La durée et le poids larvaires après traitement avec différentes concentrations de NaF sont présentés dans le tableau I. La croissance et le développement larvaires sont plus lents après

nourrissage avec des feuilles traitées avec du NaF qu'après nourrissage avec des feuilles non traitées. Ces effets sont plus marqués lorsque le contenu en fluorure des feuilles de mûrier augmente. Wang et coll. (1988) ont observé que le seuil de toxicité du fluorure dans les feuilles de mûrier est supérieur à 30-50 mg/kg. Nos résultats concordent avec ceux de Wang et coll. (1988) montrant qu'une concentration en fluorure de 67,3 mg/kg a un effet significatif sur le poids larvaire ($P > 0,01$). Chen (1993) a observé que Zhenong 1 est une race fortement résistante au fluorure et que Hang 8 est une race peu résistante. Chez Zhenong 1, une concentration de 85,6 mg/kg de fluorure entraîne une augmentation significative de la durée larvaire tandis que, chez Hang 8, une concentration de 53,3 mg/kg suffit pour augmenter la durée larvaire. Une concentration en fluorure de 158,9 mg/kg entraîne la mort des larves de la race peu résistante Hang 8. Des résultats similaires ont été observés après traitement au NaF chez l'arpentuse du chou et chez la chenille de la leucanie par Hugues et coll. (1985) et Gung et coll. (1991). Ces résultats concordent avec nos observations montrant que l'augmentation de la durée larvaire et la diminution du poids larvaire chez les insectes pourraient être dues à un effet de retardement sur leur système métabolique.

Poids de la glande séricigène et du corps adipeux:

Les résultats présentés dans le tableau II révèlent que les poids de la glande séricigène et du corps adipeux diminuent de manière significative chez les larves du cinquième âge nourries avec des feuilles de mûrier traitées au NaF. La glande séricigène est l'organe de synthèse de la séricine et de la fibroïne. La diminution de la glande séricigène après traitement au NaF pourrait être due aux effets nocifs du fluorure sur l'activité de synthèse de la glande séricigène qui se traduisent par une diminution de la synthèse de protéines de la glande séricigène, de la réplication d'ADN et de l'accumulation d'ARN, comme l'ont montré Elsair et coll. (1988). Les larves affectées par le fluorure filent donc très peu de soie. Le tableau II montre également que la diminution du poids de la glande séricigène chez la race de *Bombyx mori* fortement résistante au fluorure, Zhenong 1, est inférieure à celle observée chez la race peu résistante, Hang 8.

Les résultats concernant les variations du poids du corps adipeux en fonction de la concentration en fluorure des feuilles de mûrier et du nombre de nourrissages indiquent que le fluorure a un effet nocif sur la croissance et le développement de cet organe. Le corps adipeux larvaire constitue un site important d'activité métabolique et un organe de stockage majeur. Après nourrissage avec des feuilles traitées au NaF, le poids du corps adipeux diminue de manière significative. De plus, on observe des effets négatifs du fluorure lorsque le nombre de nourrissage avec des feuilles traitées au NaF augmente. Le nourrissage avec des feuilles traitées à la concentration de 255,8 mg/kg de fluorure pendant 24 heures entraîne une diminution de poids du corps adipeux de 28 % chez Zhenong 1 et de 42 % chez Hang 8. La glande séricigène et le corps adipeux semblent être plus sensibles au fluorure que le poids frais des larves, le poids du cocon et le poids de la coque.

Taux de filage et caractères du cocon:

Le pourcentage de filage, qui est un indicateur de l'état de santé de *B. mori*, diminue de manière significative chez les groupes traités au fluorure. Le poids d'un cocon mâle et d'un cocon femelle diminue fortement lorsque la concentration en fluorure dépasse 361,9 mg/kg pour Zhenong 1 et 85,6 mg/kg pour Hang 8. Le poids du cocon et le poids de la coque chez la variété peu résistante sont plus affectés par la pollution au fluorure et les effets toxiques du fluorure sur les caractères des cocons sont plus marqués chez les mâles que chez les femelles. L'effet non significatif (Tableau III) du fluorure sur la richesse soyeuse suggère que c'est un caractère génétiquement stable qui n'est pas affecté par la pollution au fluorure. On observe également qu'une concentration supérieure à 53,3 mg/kg de fluorure dans les feuilles de mûrier suffit à diminuer de manière significative le taux de filage chez la race de *B. mori* peu résistante au fluorure ; tandis que, chez la race fortement résistante, le taux de filage diminue seulement si les feuilles de mûrier contiennent plus de 85,6 mg/kg de fluorure. Ces résultats indiquent clairement que le fluorure a un effet nocif sur les caractères économiques de *B. mori*, qui se traduit par une diminution significative du rendement en cocons.

CONCLUSIONS

Les résultats présentés ici indiquent que les effets nocifs du fluorure sur la croissance, le développement et les caractères économiques de *B. mori* sont fonction de la résistance de cet insecte au fluorure. Chez les races fortement résistantes au fluorure, les effets nocifs se manifestent surtout lorsque la concentration en fluorure dans les feuilles de mûrier est élevée ; tandis que, chez les races peu résistantes, on observe des effets prononcés même avec de faibles concentrations. Dans ces circonstances, il apparaît que la sélection d'une race de *B. mori* fortement résistante au fluorure pourrait être très utile à l'industrie séricicole de ce pays. Nos résultats corroborent également des observations antérieures. L'étude présentée ici montre clairement qu'il est possible de sélectionner des races de *B. mori* qui soient fortement résistantes au fluorure.

IDENTIFICATION OF REGION-SPECIFIC SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) HYBRIDS

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.

Nine parents, namely, PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂, and CC₁, were examined for genetic divergence among parents in a diallel cross experiment in *Bombyx mori* L. during the spring-autumn rearings of 1991. Based on spring rearing data in 1991, the parents were grouped into 5 clusters. Genetic divergence showed no relationship with geographical origin of the parents. Highly significant specific combining abilities (SCAs) and their corresponding heterotic values were obtained in most of the important economic characters in four intercluster crosses during the autumn rearing, 1991. These four crosses were PAM-101 × NB₄D₂, PAM-109 × SH₆, PAM-109 × SF₁₉, and PAM-109 × NB₄D₂. The F₁s include one of the parents from Pampore-evolved lines, giving scope to identify region-specific crosses.

Keywords: D² statistic, combining ability, *Bombyx mori* L., region-specific, heterosis.

INTRODUCTION

Bivoltine silk in India is produced from hybrid silkworm seed. A silkworm breeder is, therefore, constantly looking for F₁ hybrids that are productive and adaptable to a local region. Selection of parents is thus most important and it is often challenging to a breeder involved in hybrid breeding to develop such heterotic combinations. Determination of genetic divergence among the parents may facilitate the selection of parents for achieving the desired hybrid combination(s). Crossing more diverged parents is believed to increase the chances of obtaining hybrid vigour (Joshi and Dhawan, 1966; Anand and Murty, 1986). Manifestation of heterosis in F₁s is reported to be related to the optimum level of genetic divergence between parents (Arunachalam *et al.*, 1984). In rice, Jinfei and Luin (1983) found the manifestation of heterosis proportional to the genetic diversity between the parents.

The present studies were undertaken to (i) study the extent of genetic diversity among nine bivoltine silkworm breeds (viz., three from Pampore-evolved lines, five from the National Silkworm Seed Project, Dehradun, and one from the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore), and (ii) evaluate F₁s from these nine parents for expression of heterosis in relation to statistically determined clusters.

MATERIALS AND METHODS

Nine bivoltine silkworm races, of which three were from the Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, five from the National Silkworm Seed Project, Dehradun, and one from the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, were reared cellularly in three replications in spring, 1991 (March-April). Of these, five races from the National Silkworm Seed Project (Dehradun), viz., YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂ and SH₆, represent a spectrum of widely used hybrid seed for commercial silk production; three silkworm races, viz., PAM-101, PAM-109 and PAM-111,

are recently evolved lines from the Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, undergoing various tests for field release and CC₁ is an evolved line of the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. Seed in the nine parents and their 36 diallel F₁s were raised in spring, 1991, by the Griffing (1956) method and subjected to a diapause schedule of 90 days' chilling followed by hot hydrochloric acid treatment for 5 min. at 46 °C and reared at ambient temperature of about 23 °C (Tazima, 1978). Treated seed from the nine parents and 36 F₁s was reared cellularly in three replications in autumn, 1991 (Sept.-Oct.). A standard prescribed schedule of bivoltine silkworm rearing was followed during each season (Krishnaswami, 1971, 1978). Data were recorded during both rearing seasons on eggs/disease-free laying (DFL), larval weight (g), larval duration (days), cocoon yield/10000 brushed larvae (kg), cocoon weight (g), shell weight (g), filament length (m) and denier. Analysis of variance, parental divergence between the parents as measured by the D² statistic and cluster formation as suggested by K.D. Tocher (given in Rao, 1952) and canonical root analysis as described by Rao (1952) were followed to classify the nine parents into clusters based on spring rearing data. Specific combining ability effects among the 36 F₁s were estimated by method 2, Model I (parents and one set of F₁s) advocated by Griffing (1956). The mathematical model used is:

$$x_{ij} = u + g_i + g_j + s_{ij} + \frac{1}{bc} \sum_k \sum_l e_{ijkl}$$

where,

$i, j = 1, \dots, p$; $k = 1, \dots, b$; $l = 1, \dots, c$; u is the population mean; g_i and g_j is the general combining ability effect; s_{ij} is the specific combining ability effect such that $s_{ij} = s_{ji}$ and e_{ijkl} is the effect peculiar to the $ijkl$ -th observation with certain restrictions. Specific combining ability effects (s_{ij}) were estimated according to the model as follows:

$$s_{ij} = x_{ij} - \frac{1}{p+2} \{x_{i.} + x_{.j} + x_{.j.} + x_{ij.}\} + \frac{2}{(p+1)(p+2)} X_{..}$$

RESULTS

Significant differences were found among the means of the populations for each of the seven characters studied, except for denier, indicating that variability was present among the nine parents (Table I).

Comparisons of the means (Table I) revealed that in cocoon yield and filament length strain CC₁ has significantly higher mean values compared to other races. In cocoon weight CC₁ also has a higher mean value, followed by PAM-111. In shell weight, PAM-111 has the highest significant mean value over most of the parents, followed by CC₁. Further scrutiny of the values in Table I reveals the lowest larval maturity period in PAM-101, PAM-111 and JD₆ (24.9 to 26.4 days) compared to the other parents studied. Average fecundity (eggs/DFL) was significantly lower in PAM-109, NB₄D₂ and CC₁.

Nature and magnitude of diversity:

The differences between the parents on the aggregate of eight characters tested by Wilk's Λ criterion were highly significant (χ^2 for 64 d.f. = 249.6). Based on the divergence between the parents as measured using Mahalanobis's D² statistic, the parents were grouped into five distinct clusters (Table II) using Tocher's method as described by Rao (1952).

Perusal of Table II reveals that, out of the five races from the National Silkworm Seed Project, Dehradun, three races, SF₁₉, YS₃ and SH₆, fall in cluster I, whereas the other two fall in clusters II and IV. CC₁, PAM-109 and NB₄D₂ singly form three distinct clusters. The pattern thus reveals that there is no clear-cut relationship between genetic diversity and the geographical origin of the races. However, the emerging pattern has clearly put the three Pampore-evolved lines into two different clusters, establishing the presence of considerable diversity, especially between the PAM-101/PAM-111 and PAM-109 lines.

Table I. Means of nine parents for eight characters during the spring rearing, 1991 (March-April).

Tableau I. Moyennes de neuf parents pour huit caractères au cours de l'élevage de printemps 1991 (mars-avril).

Sl no.	Cluster	Eggs/ disease- free laying	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10000 larvae brushed (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)	Denier
N° de série	Groupe	Oeufs par ponte saine	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)	Denier
1	PAM-101	540.25	46.50	25.28	12.59	1.650	0.308	912.25	2.60
2	PAM-109	425.00	47.50	28.97	14.14	1.788	0.355	1130.25	2.55
3	PAM-111	557.50	50.75	26.69	16.03	1.805	0.378	1101.50	2.63
4	SH ₆	618.50	49.25	27.51	13.81	1.663	0.340	1004.25	2.65
5	SF ₁₉	640.00	48.25	29.70	14.88	1.700	0.335	968.00	2.54
6	YS ₃	631.00	51.75	29.11	15.33	1.803	0.348	955.25	2.52
7	NB ₄ D ₂	518.25	59.00	27.57	14.53	1.711	0.363	1029.25	2.84
8	JD ₆	563.75	48.00	25.26	13.70	1.568	0.288	899.50	2.55
9	CC ₁	527.75	51.50	27.12	17.38	1.880	0.368	1235.50	2.31
	SE	49.00	2.20	0.64	0.83	0.070	0.020	65.36	0.13

SE: Standard error / *Ecart type*.

Table II. Distribution of nine parents of bivoltine breeds into various clusters.

Tableau II. Répartition des neuf parents de souches bivoltines dans les différents groupes.

Cluster / Groupe	Race	Source
I	SF ₁₉ YS ₃ SH ₆	National Silkworm Seed Project, Dehradun ditto / <i>idem</i> ditto / <i>idem</i>
II	JD ₆ PAM-101 PAM-111	ditto / <i>idem</i> Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore ditto / <i>idem</i>
III	CC ₁	Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore
IV	NB ₄ D ₂	National Silkworm Seed Project, Dehradun
V	PAM-109	Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore

Table III. Inter-cluster and intra-cluster $\sqrt{D^2}$ values of the five clusters of nine bivoltine silkworm races.Tableau III. Valeurs $\sqrt{D^2}$ entre les groupes et à l'intérieur d'un groupe chez les neuf races de vers à soie bivoltins.

Cluster / Groupe	I	II	III	IV	V
I	3.142	4.652	4.989	5.611	4.717
II		3.882	4.869	5.198	6.091
III			0.000	5.848	4.815
IV				0.000	6.567
V					0.000

Table IV. Means for five clusters formed in nine bivoltine silkworm races.

Tableau IV. Moyennes des cinq groupes formés à partir de neuf races de vers à soie bivoltins.

Sl no.	Cluster	Eggs/ disease- free laying	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Cocoon yield/ 10000 larvae brushed (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)	Denier
N° de série	Groupe	Oeufs par ponte saine	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)	Denier
1	I	629.83	49.80	28.44	14.67	1.722	0.341	975.80	2.57
2	II	553.83	48.41	25.43	14.11	1.677	0.324	971.08	2.59
3	III	527.75	51.50	26.65	17.38	1.880	0.368	1235.50	2.31
4	IV	518.30	59.00	27.52	14.53	1.711	0.363	1029.30	2.84
5	V	425.00	47.50	28.61	14.14	1.755	0.355	1130.30	2.55

Intra- and inter-cluster distances are presented in Table III and cluster means in Table IV.

Perusal of the intra- and inter-cluster values in Table III reveals small differences among the intra-cluster values of clusters I and II. Inter-cluster values range between 4.65 and 6.57, the highest being between clusters IV and V (6.57), followed by II-V (6.09). An examination of the means of these clusters (Table IV) reveals that races of the first cluster are rich in fecundity but larval maturity duration is longer (28.44 days). Races of cluster II have the shortest larval maturity period (25.43 days). Clusters III, IV and V, which had only one race in each, were unique, with higher mean values in almost all of the characters studied. However, among these, cluster III, which comprises

CC₁, shows the highest mean values in cocoon characters. Among the eight characters, larval duration (41.67% of the total pairwise comparisons) has contributed the maximum to inter-cluster divergence, followed by cocoon yield and larval weight (19.44%), shell weight (8.33%), fecundity (5.56%) and, lastly, cocoon weight and filament length (2.78%).

From canonical analysis of the data (Table V), values of λ_1 , λ_2 , λ_3 and λ_4 were 36.45, 24.57, 16.65 and 10.97, respectively, accounting for 37.77%, 25.44%, 17.24% and 11.36% variability of the total. Thus 91.81% of the variation is accounted for so that a 3-dimensional representation gives a fairly accurate picture of the configuration of the groups in eight-dimensional space (Fig. 1). An examination of four vectors confirmed the potent role of larval duration, larval weight, filament length and shell weight in differentiating among the races as seen from the magnitude of the coefficients in Z₁, Z₂, Z₃ and Z₄ (Table V).

Table V. Values of the coefficients of the canonical vectors, Z₁, Z₂, Z₃ and Z₄.

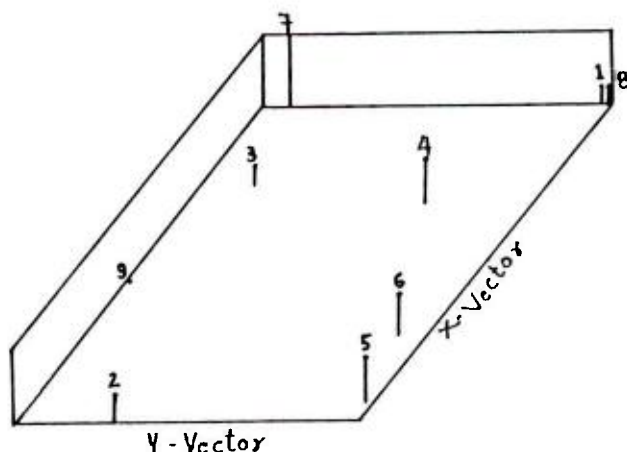
Tableau V. Valeurs des coefficients des vecteurs canoniques, Z₁, Z₂, Z₃ and Z₄.

Characters / Caractères	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄
Eggs/disease free laying / Oeufs par ponte saine	0.003	0.324	0.128	0.603
Larval weight / Poids larvaire	0.151	-0.404	0.533	0.341
Larval duration / Durée larvaire	-0.872	-0.042	0.435	-0.142
Cocoon yield/10000 larvae / Rendement en cocons/10 000 larves	-0.355	-0.303	-0.528	0.495
Cocoon weight / Poids du cocon	-0.098	-0.137	-0.400	-0.222
Shell weight / Poids de la coque	0.235	-0.385	0.188	0.166
Filament length / Longueur de la bave	-0.043	-0.649	-0.127	-0.040
Denier	0.153	-0.224	0.145	-0.421
Root / Racine	36.49	24.57	16.65	10.97
% variation / Pourcentage de variation	37.77	25.44	17.24	11.36
Cumulative variation / Variation cumulée	37.77	63.21	80.45	91.81

Fig. 1: 3-dimensional chart of group constellations.

Fig. 1 : Carte tridimensionnelle des constellations de groupes.

Groups Groupes	Races included Races incluses
I	4 SH ₆ ; 5 SF ₁₉ ; 6 YS ₃
II	1 PAM-101; 8 JD ₆ ; 3 PAM-111
III	9 CC ₁
IV	7 NB ₄ D ₂
V	2 PAM-109



Relationship between genetic divergence and realised heterosis:

Diallel analysis of the nine parents and their 36 F₁s as proposed by Griffing (1956) revealed significant specific combining ability mean squares with respect to eggs/DFL, larval duration, larval weight, cocoon weight, shell weight and filament length. Among the 36 F₁s, only those crosses were identified whose specific combining ability estimates as well as the heterotic values were significant. The differences of the means of the hybrids from those of the superior parent and mid parent were tested for their statistical significance. Heterosis over the mid and superior parent was calculated only when the difference was significant and in the desired direction; otherwise, it was considered absent. The results of the combining ability analysis are presented in Table VI.

Table VI. Significant specific combining ability (SCA) and heterosis (%) of the crosses of *Bombyx mori* L. identified during autumn, 1991.

Tableau VI. Signification de la capacité combinatoire spécifique et de l'hétérosis (%) des croisements de Bombyx mori L. identifiés au cours de l'automne 1991.

SI no.	Crosses	Eggs/ disease- free laying	Larval duration (days)	Larval weight (kg)	Cocoon yield (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (m)	Filament length (m)
N° de série	Croisement	Oeufs par pontée saine	Durée larvaire (jours)	Poids larvaire (kg)	Rendement en cocons (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (m)	Longueur de la bave (m)
1	PAM-101 × NB ₄ D ₂							
	SCA	+9.95	-1.18**	+4.61**	+3.97*	+0.16*	+0.04*	+118.82*
	MH %	+2.18	-9.55**	+34.93**	+22.47*	+23.14**	+31.41**	+39.72**
	SH %	-1.24	-8.14*	+23.03**	+10.56	+19.02**	+23.29**	+32.88**
2	PAM-109 × SF ₁₉							
	SCA	+69.86*	-1.11**	+2.30	+30.60**	+0.25**	+0.04*	+23.73
	MH %	+11.91*	-4.45**	+16.74*	+73.92**	+31.17**	+26.85**	+9.97*
	SH %	+5.49	-2.96**	+16.24*	+35.06	+31.02**	+23.49*	-1.25
3	PAM-109 × NB ₄ D ₂							
	SCA	-57.66	+0.02	+3.91**	-26.37**	+0.21**	+0.04*	+162.03**
	MH %	-5.91	-1.89	+36.45**	-19.23*	+29.92**	+29.25**	+27.70**
	SH %	-9.73	+0.36	+25.86**	-35.34*	+27.17*	+22.75**	+11.78**
4	PAM-109 × SH ₆							
	SCA	+67.64*	-0.13	+4.03**	+14.48*	+0.17**	+0.03**	-6.91
	MH %	+15.77**	-1.83	+28.70**	+53.31**	25.57**	+22.58**	+2.47
	SH %	+8.53	-1.68	+27.59**	+17.20*	+23.59**	+20.63	-7.35

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

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

MH %: Mid heterosis percentage / Pourcentage d'hétérosis moyenne.

SH %: Superior heterosis percentage / Pourcentage d'hétérosis supérieure.

Scrutiny of Table VI reveals significant to highly significant results for specific combining ability effects and heterotic expression for most of the important characters. In PAM-101 × NB₄D₂ and

PAM-109 $\times$ SF19, specific combining ability and heterosis were negatively significant, which is understandable since the larval duration in these crosses is less than in their respective parents, which is an advantage as far as this character is concerned. However, for the cross PAM-109 $\times$ NB4D2, negatively significant results were recorded for cocoon yield. It may be mentioned that cocoon yield is also influenced by the environment which, perhaps, did not interact favourably with this cross. The parents in each cross belong to distinct clusters (Table II) and, as such, genetic divergence shows a relationship with heterotic expression only when parents from divergent clusters were crossed. Mean (m) and standard deviation (SD) of D^2 s among parents were calculated and the limit $m \pm s$ established as 13.5 and 33.2. It was observed that of the four crosses, two crosses, viz., PAM-109 $\times$ SF19 and PAM-109 $\times$ SH6 had D^2 values falling within these limits. By contrast, from the autumn, 91, D^2 analysis (not included here), three, viz. PAM-109 $\times$ SF19, PAM-109 $\times$ SH6 and PAM-101 $\times$ NB4D2, of these four crosses fell well within the prescribed limits as advocated by Arunachalam *et al.* (1984). Thus, the concept advocated by these authors that a cross between two parents whose genetic divergence falls within $m \pm S$ has a higher chance of manifesting heterosis has been more or less found to be true in the present study. In addition, the presence of one of the parents from Pampore-evolved lines in the crosses so identified is a striking feature, indicating that Pampore lines have combined well with Dehradun races.

DISCUSSION

Divergence analysis is often used to identify suitable parents for realising heterosis and recombination in breeding programmes. In the present study, nine bivoltine silkworm races were found to form five distinct clusters, indicating the presence of diversity among the races used. A Mahalanobis's D^2 statistic, which was calculated here, has also been used on a number of crop species for the study of genetic diversity and identification of characters responsible for divergence (Ram and Panwar, 1970; Vairavan *et al.*, 1973; Maurya and Singh, 1977; Rao *et al.*, 1981; Jinfei and Luin, 1983).

The present study revealed that genetic diversity is not synonymous with geographical diversity in that no such relationship could be established here. Studies undertaken by Jolly *et al.* (1989) and Rao *et al.* (1981) have also reported that there is no relationship between silkworm breeds from diverse eco-geographic origins and detectable genetic differences. This may be explained on the basis that the races under study were derived through hybridisation by mixing various indigenous and exotic strains. Due to their broad genetic base the resulting hybrids have adapted well to the conditions of Jammu and Kashmir most conducive for silkworm rearing, and ultimately expressed their actual genetic diversity. Moreover, stringent selection pressure applied for maintaining the stocks may be another reason nullifying the divergent features of these races arising from their place of origin and the geographic distance between them. The geographic diversity thus becomes an unrealistic property in the manifestation of character differences. The most striking feature in the clustering pattern is that the Pampore-evolved lines have fallen into distinct clusters, thereby establishing an appreciable degree of variability present in the evolved lines. The most important characters that have contributed to the genetic divergence are larval duration, followed by cocoon yield, larval weight, shell weight, fecundity and, lastly, cocoon weight and filament length. Therefore it is important to consider these characters when selecting parents for a hybridisation breeding programme.

The study of heterosis from a diallel analysis of 36 F_1 s identified four crosses, viz., PAM-101 $\times$ NB4D2, PAM-109 $\times$ SF19, PAM-109 $\times$ NB4D2 and PAM-109 $\times$ SH6, with significant specific combining ability effects and heterotic values in the desired direction for most of the important characters. It is interesting to note that in each cross the Pampore-evolved lines are involved as one of the parents, thus establishing that Pampore-101 and Pampore-109 have combined well with the Dehradun races. A second striking feature is that the parents in the four crosses belong to different clusters, although the genetic distances between them are within a limited range. Arunachalam *et al.* (1984) have given the concept that if m and s are the mean and standard deviation of the values of divergence (given by D^2) among parents, the chances for occurrence of a high frequency of heterotic crosses and with high values of heterosis are greater for parents whose divergence falls within the

interval ($m - s$, $m + s$), compared to crosses between parents whose divergence falls outside that interval. It was found that the D^2 values of two crosses, PAM-109 $\times$ SF19 and PAM-109 $\times$ SH6, fell within the prescribed limit; moreover three among four crosses identified with significant SCA effects and heterotic values fell within this range when D^2 's of the nine parents were studied by diallel analysis during autumn rearing 1991 (data not shown). It is thus established that there is a limit to parental divergence within which there is a reasonably high chance of occurrence of heterosis. The above observations are consistent with theoretical concepts of heterosis (Falconer, 1964).

It may be mentioned that SF19, SH6 and NB4D2 are currently used as hybrid seed for raising commercial bivoltine cocoon crops, especially in the Jammu and Kashmir State. However, the hybrid seed mostly suffers due to adaptability problems in the region. Thus combining them with Pampore-evolved lines gives further scope for identifying region-specific crosses. Further, since the nine parents under consideration have been selected for a hybridisation programme for the evolution of improved bivoltine silkworm breeds for sub-temperate regions, the four heterotic F_1 s identified here may produce desirable segregants in advanced generations.

REFERENCES

- ANAND I.J., MURTHY B.R. (1968) Genetic divergence and hybrid performance in linseed. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 28, 178-185.
- ARUNACHALAM V., BANDYOPADHYAY S., NIGAM S.N., GIBBONS R.W. (1984) Heterosis in relation to genetic divergence and specific combining ability in ground nut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 33, 33-39.
- FALCONER D.S. (1964) Introduction to quantitative genetics. 3rd ed., Oliver and Boyd, Edinburgh and London.
- GRIFFING B. (1956) Concepts of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9, 463-493.
- JINFEI XU, WANG LUIN (1983) The utility of multivariate analysis on predicting heterosis in rice. *In Proc. Int. Genet. Congress*, New Delhi, p. 551.
- JOLLY M.S., DATTA R.K., NOAMANI M.K.R., SITARAMA IYENGAR M.N., NAGARAJ C.S., BASAVARAJ H.K., SHAMA G., RAMAMOHANA RAO (1989) Studies on genetic divergence in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 29(4), 545-553.
- JOSHI A.B., DHAWAN N.L. (1966) Genetic improvement of yield with special reference to self-fertilising crops. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 264, 101-113.
- KRISHNASWAMY S. (1971) On some aspects of the improved technique of rearing mulberry silkworms. *Indian Silk*, 10(2), 9.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, Bull. no. 2.
- MAURYA D.M., SINGH D.P. (1977) Genetic divergence in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 37, 394-402.
- RAM J., PANWAR D.V.S. (1970) Interspecific divergence in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 30, 1-10.
- RAO A.V., PRASAD A.S.R., SAI KRISHNA T., SESHUN D.V., SRINIVASAN T.E. (1981) Genetic divergence among some brown planthopper resistant rice varieties. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 41, 179-185.
- RAO C.R. (1952) Advanced statistical methods in biometric research. John Wiley and Sons, New York.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., DAS N.K., NANDI S. (1989) Genetic divergence among bivoltine races of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Indian J. of Agri. Sci.*, 59(12), 761-765.
- TAZIMA Y. (1978) The silkworm: an important laboratory tool. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.
- VAIRAVAN S., SIDDIQ E.A., ARUNACHALAM V., SWAMINATHAN M.S. (1973) A study on the nature of genetic divergence in rice from Assam and Northeast Himalayas. *Theor. Appl. Genet.*, 43, 213-221.

IDENTIFICATION D'HYBRIDES DE VERS A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) SELON L'AIRE GEOGRAPHIQUE

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.

*On a examiné la divergence génétique chez des croisements dialléliques de neuf parents (PAM-101, PAM-109, PAM-111, YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂ et CC₁ de *Bombyx mori* L. au cours des élevages de printemps et d'automne 1991. Sur la base des données de l'élevage de printemps 1991, les parents ont été répartis en 5 groupes. La divergence génétique ne présente aucune relation avec l'origine géographique des parents. On a obtenu des capacités combinatoires spécifiques et des valeurs hétérotiques fortement significatives pour la plupart des caractères d'intérêt économique chez quatre croisements réalisés entre les groupes au cours de l'élevage 1991. Ces quatre croisements sont PAM-101 × NB₄D₂, PAM-109 × SH₆, PAM-109 × SF₁₉ et PAM-109 × NB₄D₂. Chez tous les F₁, l'un des parents est issu des lignées Pampore, ce qui ouvre des perspectives de recherches pour identifier des croisements géographiquement spécifiques.*

INTRODUCTION

La soie bivoltine en Inde provient de graines de vers à soie hybrides. Tout sélectionneur doit donc régulièrement rechercher des hybrides F₁ qui soient productifs et adaptables à une région donnée. La sélection des parents est très importante et il est souvent difficile pour un éleveur impliqué dans la sélection d'hybrides de mettre au point ce type de combinaisons hétérotiques. La détermination de la divergence génétique entre les parents peut faciliter la sélection de parents permettant d'aboutir à la (ou aux) combinaison(s) hybride(s) recherchée(s). Il est admis que le croisement de parents divergents améliore les chances d'obtenir une vigueur hybride (Joshi et Dhawan, 1966 ; Anand et Murthy, 1986). La manifestation de l'hétérosis chez les F₁ semble être liée au niveau optimal de divergence génétique entre les parents (Arunachalam et coll., 1984). Chez le riz, Jinfei et Luin (1983) ont observé que la manifestation de l'hétérosis était proportionnelle à la diversité génétique entre les parents.

Cette étude a été réalisée afin, d'une part, d'étudier l'étendue de la diversité génétique entre neuf souches de vers à soie hybrides (trois souches isolées à Pampore, cinq souches du National Silkworm Seed Project de Dehradun et une souche du Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore) et, d'autre part, d'évaluer l'expression de l'hétérosis en fonction de groupes déterminés statistiquement chez les F₁ de ces neuf parents.

MATERIELS ET METHODES

Neuf races de vers à soie bivoltins, dont trois proviennent du Central Sericultural Research and Training Institute de Pampore, cinq du National Silkworm Seed Project de Dehradun et une du Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore) ont été élevées selon la méthode cellulaire en trois réplicats au printemps 1991 (mars-avril). Parmi celles-ci, les cinq races du National Silkworm Seed Project (Dehradun), soit : YS₃, SF₁₉, JD₆, NB₄D₂ et SH₆, représentent un échantillon de graines hybrides couramment utilisées à l'échelle commerciale, les trois races PAM-101, PAM-109 et PAM-111 sont des lignées récemment isolées au Central Sericultural Research and Training Institute de Pampore qui ont subi plusieurs tests avant d'être exploitées sur le terrain et CC₁ est une lignée

isolée au Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore. Les graines des neuf parents et de leurs 36 F₁ dialléliques ont été élevées au printemps 1991 selon la méthode de Griffing (1956) et soumises à une diapause de 90 jours par réfrigération puis traitées à l'acide chlorhydrique pendant 5 minutes à 46 °C et élevées à une température ambiante d'environ 23 °C (Tazima, 1978). Les graines traitées des neuf parents et des 36 F₁ ont été élevées selon la méthode cellulaire en trois réplicats à l'automne 1991 (sept.-oct.). On a suivi une méthode standard d'élevage des vers à soie bivoltins pour chaque saison (Krishnaswami, 1971, 1978). Les données enregistrées au cours des deux saisons d'élevage concernent le nombre d'œufs par ponte saine (DFL), le poids larvaire (g), la durée larvaire (jours), le rendement en cocons pour 10 000 larves levées (kg), le poids du cocon (g), le poids de la coque (g), la longueur de la bave (m) et le denier. L'analyse de variance, la mesure de la divergence parental entre les parents selon la statistique D₂, le regroupement selon la méthode de K.D. Tocher (présentée par Rao, 1952) et l'analyse des racines canoniques décrite par Rao (1952) ont été utilisées pour répartir les neuf parents en différents groupes sur la base des données collectées au printemps. Les effets de la capacité combinatoire spécifique chez les 36 F₁ ont été estimés selon la méthode 2, Modèle I (les parents et un lot de F₁) proposée par Griffing (1956). Le modèle mathématique utilisé est le suivant :

$$x_{ij} = u + g_i + g_j + s_{ij} + \frac{1}{bc} \sum_k \sum_l c_{ijkl}$$

dans lequel :

$i, j = 1, \dots, p$; $k = 1, \dots, b$; $l = 1, \dots, c$; u est la moyenne de la population ; g_i et g_j représentent les effets de capacité combinatoire générale ; s_{ij} représente les effets de la capacité combinatoire spécifique, tels que $s_{ij} = s_{ji}$ et c_{ijkl} représente l'effet spécifique de la $ijkl^{\text{ème}}$ observation avec certaines restrictions. Les effets de la capacité combinatoire spécifique (s_{ij}) ont été estimés d'après le modèle suivant :

$$s_{ij} = x_{ij} - \frac{1}{p+2} \{x_i + x_{ii} + x_j + x_{jj}\} + \frac{2}{(p+1)(p+2)} X_{..}$$

RESULTATS

Des différences significatives ont été relevées pour ce qui concerne les moyennes des populations pour chacun des sept caractères étudiés, sauf pour le denier ; ce qui indique la présence d'une variabilité entre les neuf parents (Tableau I).

La comparaison des moyennes (Tableau I) révèle que, pour le rendement en cocons et la longueur de la bave, la souche CC₁ donne des valeurs nettement supérieures à celles des autres races. CC₁ donne également une valeur supérieure pour le poids du cocon, devant PAM-111. Pour le poids de la coque, PAM-111 donne la valeur maximale par rapport à tous les autres parents, devant CC₁. De plus, la lecture du tableau I révèle que la période de maturité larvaire est minimale chez PAM-101, PAM-111 et JD₆ (de 24,9 à 26,4 jours). La fécondité moyenne (nombre d'œufs/DFL) est nettement inférieure chez PAM-109, NB₄D₂ et CC₁.

Nature et amplitude de la diversité :

Les différences entre les parents sur l'agrégat des neuf caractères testées selon le critère A de Wilks sont fortement significatives (χ^2 pour 64 d.f. = 249,6). Sur la base de la divergence, mesurée d'après la statistique D₂ de Mahalanobis, les parents ont été répartis en cinq groupes distincts (Tableau II) en utilisant la méthode de Tocher décrite par Rao (1952).

La lecture du tableau II révèle que, sur les cinq races du National Silkworm Seed Project de Dehradun, trois races (SF₁₉, YS₃ et SH₆) entrent dans le groupe I, tandis que les deux autres entrent dans les groupes II et IV. CC₁, PAM-109 et NB₄D₂ forment individuellement trois groupes distincts. Le profil obtenu révèle qu'il n'y a pas de relation bien définie entre la diversité génétique et l'origine géographique des races. Cependant, ce profil fait clairement ressortir que les trois lignées de Pampore entrent dans deux groupes distincts, mettant en évidence une diversité importante, particulièrement entre les lignées PAM-101/PAM-111 et PAM-109.

Les distances entre les groupes et à l'intérieur d'un groupe sont présentées dans le tableau III et les moyennes des groupes sont présentées dans le tableau IV.

La lecture des valeurs entre les groupes et à l'intérieur d'un groupe du tableau III fait apparaître de petites différences entre les valeurs internes pour les groupes I et II. Les valeurs entre les groupes varient de 4,65 à 6,57, la plus forte étant entre les groupes IV et V (6,57), devant II-V (6,09). L'examen des moyennes de ces groupes (Tableau IV) révèle que les races du premier groupe ont une fécondité élevée mais que leur période larvaire est plus longue (28,44 jours). Les races du groupe II ont la maturité larvaire la plus courte (25,43 jours). Les groupes III, IV et V, qui contiennent chacun une seule race, sont uniques, avec des valeurs moyennes supérieures pour la plupart des caractères étudiés. Cependant, parmi ceux-ci, le groupe III, qui comprend CC₁, présente les valeurs moyennes les plus fortes pour les caractères du cocon. Sur les huit caractères, la durée larvaire (41,67 % des comparaisons des paires) contribue de manière maximale à la divergence entre groupes, devant le rendement en cocons et le poids larvaire (19,44 %), le poids de la coque (8,33 %), la fécondité (5,56 %) et, en dernier lieu, le poids du cocon et la longueur de la bave (2,78 %).

D'après l'analyse canonique des données (Tableau V), les valeurs de λ_1 , λ_2 , λ_3 et λ_4 sont respectivement 36,45, 24,57, 16,65 et 10,97 ; représentant 37,77 %, 25,44 %, 17,24 % et 11,36 % de la variabilité totale. On peut ainsi expliquer 91,81 % de la variation ; de ce fait, une représentation en trois dimensions donne une image assez exacte de la configuration des groupes dans un espace à huit dimensions (Fig. 1). L'examen de quatre vecteurs confirme le rôle de la durée larvaire, du poids larvaire, de la longueur de la bave et du poids de la coque dans la différenciation des races, comme le montre l'amplitude des coefficients chez Z₁, Z₂, Z₃ et Z₄ (Tableau V).

Relation entre la divergence génétique et l'hétérosis réalisée :

L'analyse diallélique des neuf parents et de leurs 36 F₁, selon la méthode proposée par Griffing (1956) fait apparaître des carrés moyens significatifs pour la capacité combinatoire spécifique chez le nombre d'œufs/DFL, la durée larvaire, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave. Sur les 36 F₁, on a identifié uniquement les croisements pour lesquels les estimations de la capacité combinatoire et les valeurs hétéroïques sont significatives. On a testé la signification statistique des différences de moyennes entre les hybrides et leur parent supérieur et leur parent moyen. L'hétérosis par rapport au parent moyen et au parent supérieur a été calculée uniquement lorsque la différence s'avère significative dans la direction souhaitée ; dans le cas contraire, on a considéré qu'il n'y avait pas d'hétérosis. Les résultats de l'analyse de la capacité combinatoire sont présentés dans le tableau VI.

La lecture du tableau VI fait apparaître des résultats significatifs à fortement significatifs pour les effets de la capacité combinatoire spécifique et l'expression de l'hétérosis pour la plupart des caractères importants. Chez PAM-101 × NB₄D₂ et PAM-109 × SF₁₉, la capacité combinatoire spécifique et l'hétérosis sont négativement significatives, ce qui est compréhensible étant donné que la durée larvaire chez ces croisements est inférieure à celle des parents respectifs ; ceci est par ailleurs un avantage pour ce caractère. Cependant, pour le croisement PAM-109 × NB₄D₂, des résultats négativement significatifs ont été relevés pour le rendement en cocons. Il n'est pas inutile de rappeler que le rendement en cocons est également affecté par l'environnement qui n'a peut-être pas interagit favorablement pour ce croisement. Les parents de chaque croisement appartiennent à des groupes distincts (Tableau II) et la divergence génétique présente donc une relation avec l'expression de l'hétérosis seulement pour les croisements dont les parents sont issus de groupes divergents. La moyenne (m) et l'écart type (SD) des D^2 entre les parents ont été calculés et la limite $m \pm s$ établie à 13,5 et 33,2. Sur les quatre croisements, deux croisements (PAM-109 × SF₁₉ et PAM-109 × SH₆) donnent des valeurs D^2 qui entrent dans ces limites. Par contraste, à partir de l'automne 1991, l'analyse D^2 (non présentée) montre que trois de ces quatre croisements (PAM-109 × SF₁₉, PAM-109 × SH₆ et PAM-101 × NB₄D₂) sont bien entrés dans les limites établies, comme l'ont proposé Arunachalam et coll. (1984). Le concept proposé par ces auteurs, selon lequel un croisement entre deux parents dont la divergence génétique entre dans $m \pm S$ a une chance plus grande de manifester une hétérosis, est donc plus ou moins vérifié dans cette étude. De plus, la présence, dans les croisements identifiés, de l'un des parents issus des lignées isolées à Pampore est un trait marquant qui indique que les lignées Pampore se combinent bien avec les races Dehradun.

DISCUSSION

On fait souvent appel à l'analyse de divergence pour identifier des parents adaptés à la réalisation de l'hétérosis et à la recombinaison dans les programmes de sélection. Dans cette étude, neuf races de vers à soie bivoltins forment cinq groupes distincts, ce qui indique une diversité entre les races utilisées. La statistique D^2 de Mahalanobis, qui a été utilisée ici, a également été utilisée chez un grand nombre de cultures pour l'étude de la diversité génétique et l'identification des caractères responsables de la divergence (Ram et Panwar, 1970 ; Vairavan et coll., 1973 ; Maurya et Singh, 1977 ; Rao et coll., 1981 ; Jinfei et Luin, 1983).

Cette étude révèle que la diversité génétique n'est pas synonyme de diversité géographique dans la mesure où aucune relation de ce type n'a pu être établie. Des études réalisées par Jolly et coll. (1989) et Rao et coll. (1981) ont également montré qu'il n'y a pas de relation entre les races de vers à soie d'origines éco-géographiques différentes et les différences génétiques détectées. Ceci peut s'expliquer par le fait que les races étudiées ont été obtenues par hybridation de diverses races indigènes et exotiques. Du fait de leur base génétique large, les hybrides obtenus se sont bien adaptés aux conditions très favorables à l'élevage du ver à soie de l'Etat de Jammu et Cachemire et ont finalement exprimé leur diversité génétique réelle. De plus, la forte pression de sélection appliquée pour maintenir les stocks pourrait également être l'une des causes de la nullification des caractères divergents de ces races, différentes pour ce qui concerne leur origine et la distance géographique qui les sépare. La diversité géographique ne constitue donc plus un critère réaliste de la manifestation des différences de caractères. Le trait le plus marquant dans le canevas de regroupement est que les lignées isolées à Pampore entrent dans des groupes distincts ; ce qui montre clairement un degré sensible de variabilité chez les lignées isolées. Les caractères qui contribuent à la divergence génétique sont, par ordre d'importance, la durée larvaire, le rendement en cocons, le poids larvaire, le poids de la coque, la fécondité et, en dernier, le poids du cocon et la longueur de la bave. Il est donc essentiel de tenir compte de ces caractères lors de la sélection de parents dans un programme de sélection par hybridation.

L'étude de l'hétérosis par analyse diallélique des 36 F_1 fait ressortir que quatre croisements (PAM-101 $\times$ NB4D₂, PAM-109 $\times$ SF₁₉, PAM-109 $\times$ NB4D₂ et PAM-109 $\times$ SH₆) présentent des effets significatifs pour la capacité combinatoire générale et les valeurs hétérotiques dans la direction désirée pour la plupart des caractères importants. Il est intéressant de noter que les lignées isolées à Pampore forment l'un des parents dans tous les croisements, ce qui montre que Pampore-101 et Pampore-109 se combinent bien avec les races Dehradun. Un autre fait intéressant est que les parents des quatre croisements appartiennent à des groupes différents bien que les distances génétiques entre eux soient limitées. Arunachalam et coll. (1984) ont proposé un concept selon lequel si m et s sont la moyenne et l'écart type des valeurs de divergence (données par D^2), alors les chances de présence d'une fréquence élevée de croisements avec de fortes valeurs hétérotiques seront plus grandes pour les parents dont la divergence entre dans l'intervalle $m - s$, $m + s$ que pour les parents dont la divergence n'entre pas dans cet intervalle. Les valeurs D^2 des croisements PAM-109 $\times$ SF₁₉ et PAM-109 $\times$ SH₆ entrent dans les limites établies ; de plus, une analyse diallélique réalisée en automne 1991 a montré que trois des quatre croisements identifiés dont les effets SCA étaient significatifs ainsi que les valeurs hétérotiques entrent dans cet intervalle (résultats non présentés). Il est donc bien établi qu'il y a une limite à la divergence parentale, à l'intérieur de laquelle il existe une chance raisonnable de présence d'hétérosis. Ces observations concordent avec les concepts théoriques de l'hétérosis (Falconer, 1964).

Il faut également souligner que SF₁₉, SH₆ et NB4D₂ sont actuellement utilisés comme graines hybrides pour l'exploitation commerciale des cocons bivoltins, particulièrement dans l'Etat de Jammu et Cachemire. Cependant, les graines hybrides présentent des problèmes d'adaptation à la région. Aussi, le croisement de ces graines avec les lignées isolées à Pampore pourrait permettre d'identifier des croisements géographiquement spécifiques. De plus, étant donné que les neuf parents étudiés ont été sélectionnés pour un programme d'hybridation visant à isoler des races de vers à soie améliorées adaptées aux régions sub-tempérées, les quatre F_1 hétérotiques identifiés ici pourraient produire des ségrégations désirables aux générations ultérieures.

GENE ACTION STUDIES IN THE MULTIVOLTINE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

P. MUKHERJEE*, S.K. RAINA, C.K. PUROHIT & S.N. SUMBLI

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

*With the objective of understanding gene action and to identify appropriate parents for multivoltine crosses, eight popular multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) races, namely, Nistari, G, O, M-2 and OS-616, characterised by yellow cocoons, and Raj, Tamil Nadu White and Sarapat producing white cocoons, have been subjected to diallel graphic, component and combining ability analyses. The graphic analysis revealed that the parents possessed a higher proportion of dominant genes for cocoon weight and shell weight, whereas cocoon yield/100 disease-free layings (DFLs) and shell ratio percentage were under the control of complete and partial dominance, respectively. However, component and combining ability analyses showed a preponderance of dominance effects for all of the characters. The graph of standard deviation indicated that G, M-2 and Sarapat races have higher concentrations of positive dominant genes and could be used for multi × bivoltine combinations.*

Keywords: Multivoltine, characterised, overdominance, preponderance.

INTRODUCTION

In the State of Jammu and Kashmir, presently only one commercial rearing of bivoltine silkworm hybrids is conducted. However, a modest beginning has also been made to introduce autumn rearing of bivoltine silkworms. After demonopolisation of sericulture in the State, a huge mulberry plantation was raised in the private sector. The time is now ripe to establish sericulture as a full-fledged industry. As a first step, it is felt that a multiple crop system should be implemented; i.e., between the spring and autumn bivoltine rearings at least one multi × bivoltine (henceforth called multibi) rearing could be conducted during the summer months. Identification of suitable multibi combinations thus becomes imperative. Knowledge of gene action helps in selecting the parents required for hybrid seed preparation. Hence, the eight most popular multivoltine races of the country maintained by the Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, at the Research Extension Centre, Sujanpur, were examined in the present study to select the female component of multibi crosses based on the gene action of the parents.

MATERIALS AND METHODS

Five multivoltine silkworm races characterised by yellow cocoons, namely, Nistari, G, O, M-2 and OS-616, and three races, Raj, Tamil Nadu White and Sarapat, producing white cocoons of varying nature formed the base material. These races are used extensively throughout India and represent a wide range of cocoon characters. The origin and characteristics of the races are as follows.

* Present address : Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Central Silk Board, Thally Road, Hosur - 635109, India

Race			Characteristics
Code	Name	Origin	
1	Nistari	West Bengal, India	Oldest among the multivoltine races known in India. Elongated cocoon with pointed ends.
2	G	CSR & TI, Berhampore, India	Mutant line with high yield potential. Proved to be a good combiner in different multi $\times$ bi crosses. Larvae pigmented and cocoons elongated with round ends.
3	O	CSR & TI, Berhampore, India	Mutant line with pigmented larvae. Cocoons elongated oval with round ends, small in size and with medium grain.
4	M-2	CSR & TI, Berhampore, India	Selected line from mutation breeding. Elongated oval cocoons with pointed ends. Recommended for field rearing.
5	OS-616	CSR & TI, Berhampore, India	Highly productive mutant line. Presently used for field rearing. Elongated round end cocoons with pigmented larvae and coarse texture of cocoons.
6	Raj	Bangladesh	A race from Bangladesh well adapted to Indian conditions. Plain larvae, cocoons having a fine texture and pointed ends.
7	Tamil Nadu White	Tamil Nadu, India	Popular race in South India. Plain larvae, cocoons with one end round and the other pointed.
8	Sarupat	Assam, India	A long-established race from Assam. Larvae plain, spindle-shaped cocoons with slight greenish tinge and one end pointed.

Non-reciprocal crosses in all possible combinations (diallel) were made among these races. The 28 F_1 s, together with eight parents, were prepared following a randomised block design with three replications at the Research Extension Centre, Sujampur, during spring (March-April), 1992. One disease-free laying was used for each replication and treatment. The rearing was carried out by following the standard practices. Observations were recorded on four characters, namely, cocoon yield/100 DLFs (henceforth called cocoon yield), cocoon weight, shell weight and shell ratio percentage. The shell ratio per cent values were subjected to angular transformation before analysis. The graphic and component analyses of the diallel crosses were carried out by the methods of Jinks (1954) and Hayman (1954a), respectively. The combining ability analysis was performed following Griffing (1956).

RESULTS AND DISCUSSION

The present investigation was designed to study the genetic architecture of multivoltine silkworms with respect to the components of genetic variation, the proportion of each of the components, and the combining ability. The model assumes diploid segregation, homozygous parents, absence of reciprocal differences, absence of multiple allelism, uncorrelated gene distribution between the parents and lack of epistasis. Failure of one or more of the assumptions invalidates the inferences

derived from the analysis. The races ordered in the present study were not sampled at random but were selected on the basis of their cocoon characters. Since a large number of diverse parents form the base material, it was expected that the results obtained and inferences drawn from the study would be of general application.

The analysis of variance of the diallel F_1 s, together with their parents, was carried out for four characters (Table I). The mean sum of squares was significant for all of the characters, indicating a considerable amount of variability among the parents and crosses; this was also evident from the performances of the parents *per se* for different cocoon characteristics, as depicted in Table II. Highly significant variances for general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) effects were also observed for all of the characters, except for the GCA effects of cocoon weight. The silkworm, *Bombyx mori* L., is (strictly) diploid with normal meiosis. Although reciprocal differences were not studied in the present investigation, no reciprocal differences have been reported for the characters studied. With regard to the homozygosity of the parents, the lines were (completely) uniform and have been maintained by selfing every year and thus are expected to be homozygous. There is no information on the question of multiple allelism, but Hayman (1954b) and Kempthorne (1956) pointed out that its presence would not markedly alter the validity of the conclusions for these kinds of analyses. The restriction that the genes for the different traits be independently distributed in the parents would apparently not be satisfied, however, since the selected parents were not a random sample of the silkworm populations studied. Thus, the choice of parents was appropriate and purposeful.

Table I. Analysis of variance of four characters in multivoltine *Bombyx mori* L.

Tableau I. Analyse de variance de quatre caractères chez *Bombyx mori* L. polyvoltin.

Character	Mean sum of squares				
	Parents	Hybrids	Parents vs hybrids	GCA	SCA
Caractères	Somme moyenne des carrés				
	Parents	Hybrides	Parents/hybrides	GCA	SCA
Cocoon yield / Rendement en cocons (kg) ⁽¹⁾	137.342**	184.850**	717.271**	54.4736**	65.7818**
Cocoon weight / Poids du cocon (g)	0.025**	0.022**	0.364**	0.0004**	0.0126**
Shell weight / Poids de la coque (g)	0.001**	0.001**	0.006**	0.0003**	0.0004**
Shell ratio / Richesse soyeuse (%)	3.866**	2.178**	0.174	2.0128**	0.5313

(1) for 100 disease-free layings / pour 100 pontes saines.

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

A graphic analysis of diallel crosses (Jinks, 1954) was carried out for the four characters. The linear regression of W_r on V_r , limiting parabola and distribution of the parental points around the regression line are graphically presented in Figures 1 to 4. In order to determine whether dominance was due to positive or negative genes, a graph of the standard deviation for parental effects ($\bar{Y}_r$) and

parental order of dominance ($\frac{W_r + V_r}{2}$) was drawn by the method described by Hayman (1954b) and Johnson and Aksel (1959) and has been presented, together with graphs of W_r , V_r (Fig. 1 to Fig. 4).

Table II. *Per se* performance of the parents and ' t^2 ' values for four characters in multivoltine *Bombyx mori* L.

Tableau II. Performance per se des parents et valeurs " t^2 " pour quatre caractères de *Bombyx mori* L. polyvoltin.

Code	Components	Cocoon yield ⁽¹⁾	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio percentage
Code	Composants	Rendement en cocons ⁽¹⁾	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
1	Nistari	31.25	1.020	0.115	11.26
2	G	41.15	1.140	0.155	13.58
3	O	30.80	1.125	0.140	12.47
4	M-2	37.50	1.105	0.145	13.12
5	OS-616	43.80	1.295	0.140	10.83
6	Raj	24.50	1.060	0.125	12.29
7	Tamil Nadu White	27.25	1.180	0.175	14.84
8	Sarupat	36.75	1.025	0.140	13.64
	SE $\pm$	0.664	0.0089	0.0015	0.083
	t^2	1.095	0.836	0.641	0.051

(1) for 100 disease-free layings / pour 100 pontes saines.

SE: Standard error / Ecart type.

The validity of the assumptions of diallelism was tested by ' t^2 ' (Hayman, 1954a), which was non-significant for all characters studied (Table II). This indicates that most of the assumptions were fulfilled. When basic assumptions are valid, Hayman's method permits interpretation of the regression of the array covariance (W_r) on the array variance (V_r). However, the slope of the regression line ' b ' significantly deviates from unity in the case of cocoon yield, suggesting the presence of epistasis. On the other hand, the regression coefficient was non-significant from 0, except for cocoon weight, indicating failure of some of the assumptions. Hayman (1954b) states that estimates of population parameters for a trait are feasible even when that trait has exhibited partial failure of assumptions. Krishnaswamy *et al.* (1964) also reported the presence of non-allelic interactions for the effective rate of rearing in diallel analysis involving multivoltine races. Our findings also corroborate the absence of epistasis for cocoon weight and shell weight, consistent with those of Krishnaswamy *et al.* (1964) and Sarkar *et al.* (1991).

Several workers (Kearsey and Jinks, 1968; Daly and Robson, 1969) have pointed out that in studies on quantitative inheritance, complete validity of all the assumptions is unlikely. When assumptions failed with regard to parents, Hayman (1954b) suggested that interacting array points lying well off the line of unit slope of the graph of V_r , W_r may be removed from the diallel table until the remaining crosses satisfy the test. This procedure was disputed by Kempthorne (1956) and others on the ground that this will result in loss of sample randomness. Moreover, removal of an array is

Fig. 1: W_r , V_r and standard deviation for cocoon yield/100 disease-free layings.

Fig. 1 : W_r , V_r et écart type pour le rendement en cocons pour 100 pontes saines.

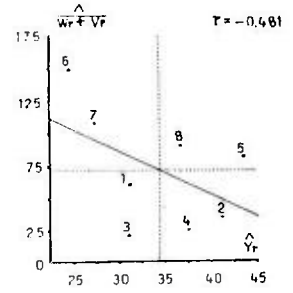
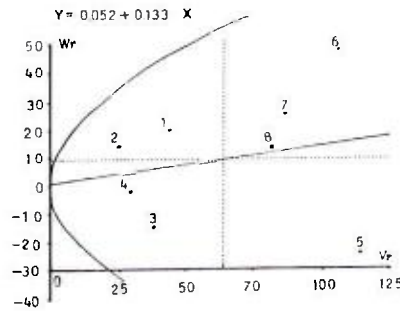


Fig. 2: W_r , V_r and standard deviation for cocoon weight.

Fig. 2 : W_r , V_r et écart type pour le poids du cocon.

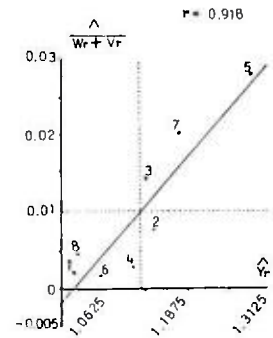
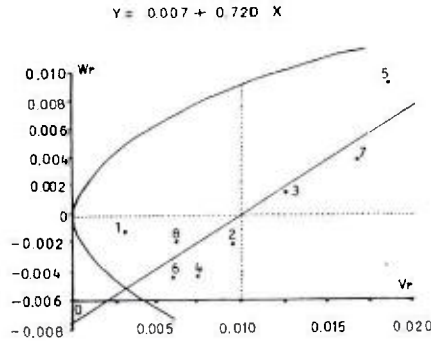


Fig. 3: W_r , V_r and standard deviation for shell weight.

Fig. 3 : W_r , V_r et écart type pour le poids de la coque.

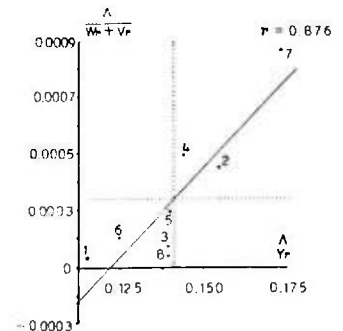
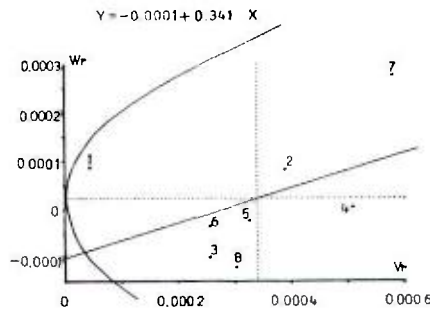
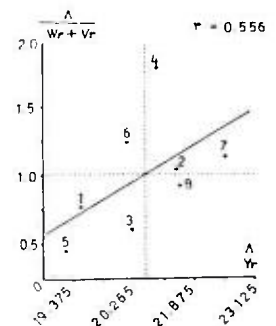
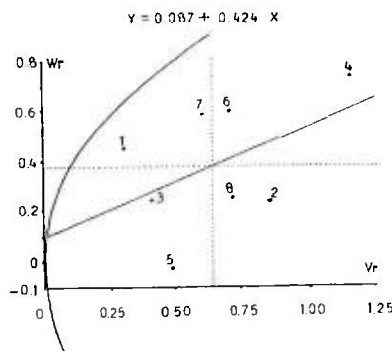


Fig. 4: W_r , V_r and standard deviation for shell ratio percentage.

Fig. 4 : W_r , V_r et écart type pour la richesse soyeuse.



undesirable when the breeder's interest is confined to a particular set of parents selected for their desirable traits. The analysis may therefore be carried out even though the hypothesis is partially fulfilled. The results obtained in such a situation are confined, however, to the material studied (Gilbert, 1969) and may not be generalised. Many workers who used Hayman's diallel analysis have met with a partial failure of the inherent assumptions for some of the traits (Johnson and Aksel, 1964; Dickson, 1967). As in the present case, particularly for cocoon yield, the failure of an assumption may be attributed primarily to epistasis. This suggests that the epistasis variance is a substantial component of the total genetic variance and must be recognised as such. The assumption of absence of epistasis is thus unrealistic.

Table III. Estimates of genetic components of variance and their proportions for four characters in multivoltine *Bombyx mori* L.

Tableau III. Estimations des composants génétiques de la variance et de leur proportion pour quatre caractères de *Bombyx mori* L. polyvoltin.

Components	Cocoon yield ⁽¹⁾	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio percentage
Composants	Rendement en cocons ⁽¹⁾	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
$\hat{D}$	28.66 ± 28.08	0.005* ± 0.002	0.00026 ± 0.000002	1.101** ± 0.205
$\hat{H}_1$	221.52** ± 66.86	0.041** ± 0.005	0.00156** ± 0.000004	1.945 ± 0.471
$\hat{H}_2$	200.32** ± 58.17	0.033** ± 0.004	0.00120** ± 0.000004	1.451** ± 0.409
$\hat{h}^2$	110.19* ± 39.01	0.058** ± 0.003	0.00136** ± 0.000004	-0.054 ± 0.275
$(\hat{H}_1/\hat{D})^{1/2}$	2.780	2.758	2.355	1.329
$\hat{H}_2/4\hat{H}_1$	0.226	0.201	0.186	0.187
$(4\hat{D}\hat{H}_1)^{1/2} + \hat{F}/(4\hat{D}\hat{H}_1)^{1/2} - \hat{F}$	1.493	2.379	2.320	1.792
$\hat{h}^2/\hat{H}_2$	0.550	1.767	0.898	-0.037

(1) for 100 disease-free layings / pour 100 portes saines.

± indicates standard error / correspond à l'écart type.

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

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

A review of the graphic analysis indicates that the point of intersection of the W_r -axis by the regression line is below the origin for cocoon weight and shell weight, revealing overdominance for these traits. The regression line almost intersected the point of origin in the case of cocoon yield, however, indicating complete dominance. Partial dominance was registered for shell ratio percentage. Further, the array points for the graph of W_r , V_r were widely scattered along the regression line for all of the characters, indicating that there existed substantial amount of genetic diversity among the parents. For cocoon weight, using graphic analysis, Krishnaswamy *et al.* (1964) and Sarkar *et al.* (1991) observed partial dominance, which was contrary to our findings. However, with respect to shell weight and shell ratio percentage the results here are similar to what was reported by Krishnaswamy *et al.* (1964).

Table IV. Estimates of degree of dominance through graphic, component and combining ability analyses.

Tableau IV. Estimations du degré de dominance par analyses de graphique, des composants et de la capacité combinatoire.

Character	Degree of dominance analysis		Combining ability analysis (σ^2g/σ^2s)
	Graphic	Component	
<i>Caractère</i>	<i>Analyse du degré de dominance</i>		<i>Analyse de la capacité combinatoire</i>
	<i>Graphique</i>	<i>Composant</i>	(σ^2g/σ^2s)
Cocoon yield / <i>Rendement en cocons</i> ⁽¹⁾	CD	OD	0.077
Cocoon weight / <i>Poids du cocon</i>	OD	OD	0.011
Shell weight / <i>Poids de la coque</i>	OD	OD	0.080
Shell ratio % / <i>Richesse soyeuse</i>	PD	OD	0.543

(1) for 100 disease-free layings / *pour 100 pontes saines.*

CD: Complete dominance / *Dominance totale.*

PD: Partial dominance / *Dominance partielle.*

OD: Overdominance / *Surdominance.*

The correlation coefficient was non-significant for cocoon yield and shell ratio percentage, suggesting an almost equal proportion of positive and negative dominant alleles; whereas, a symmetrical distribution, with 'r' being significant, was observed for cocoon weight and shell weight. A higher concentration of positive dominant genes was present in parent 'G' with respect to cocoon yield and cocoon weight. Parents 'M-2' and 'Sarupat' also had a greater number of dominant genes for cocoon yield and shell ratio percentage, respectively. 'Nistari' and 'O' also exhibited a higher accumulation of dominant genes (except 'O' for cocoon weight) but were in the negative direction for all the characters. On the other hand, 'Tamil Nadu White' consistently had a greater number of recessive genes, but mostly in the positive direction. Results were inconsistent for the remaining parents.

The estimates of the components of genetic variance, together with their standard errors as well as their relative proportions are listed for the four characters in Table III. The estimate of the additive

component ($\hat{D}$) was significant for cocoon weight, shell weight and shell ratio percentage, whereas the estimates of the dominance components, $\hat{H}_1$ and $\hat{H}_2$, were significant for all characters. The dominance components were always higher than the additive components. The $\hat{h}^2$ component was significantly positive for all of the characters except shell percentage, indicating a positive direction for dominance.

The average degree of dominance as measured by $(\hat{H}_1/\hat{D})^{1/2}$ was more than unity for all of the characters, suggesting a higher proportion for overdominance. The distribution of dominant and recessive alleles estimated by the ratio $H_2/4 H_1$ was close to 0.25 for cocoon yield, suggesting that there was symmetry in the allelic distribution. But there was a deviation from the expected value of 0.25 for cocoon weight, shell weight and shell percentage, indicating an asymmetrical distribution of positive and negative homozygotes among the parents. The ratio $(4DH_1)^{1/2} + \bar{F}/(4DH_1)^{1/2} - \bar{F}$ was more than unity for all of the characters, suggesting that the parents possessed excess dominant genes. The ratio $\hat{h}^2/\hat{H}_2$ provides an estimate of the number of groups of genes governing a particular character that simultaneously exhibit dominance. A scrutiny of Table III indicates that more than one allelic group was responsible for each of the traits. Mather and Jinks (1971) suggested that complementary gene action may depress the ratio $\hat{h}^2/\hat{H}_2$. Therefore, the number of genes reported here for different characters may not be the actual number. Low estimates for the number of gene groups governing a particular character were also reported in the silkworm by Sarkar *et al.* (1991).

A comparison of the degree of dominance as estimated through different analyses is presented in Table IV. It may be seen from the table that most of the characters are controlled by overdominance in the three analyses except cocoon yield and shell percentage, which indicate complete and partial dominance, respectively, in the graphic analysis. In the graphic analysis, the average degree of dominance depends on the position of the regression line in relation to the Wr-axis; the degree of dominance relates only to the genetic component of the Wri and Vri values. This means that the occurrence of any genotypic $\times$ environmental interaction might lead to deviations in the Wri and Vri values and thus cause a shift in the position of the regression line, thereby affecting the estimation of the level of dominance. Therefore, a correction has to be made for environmental components.

The discrepancy in the degree of dominance revealed between the different analyses may be associated with another reason, as stated by Mather and Jinks (1971), that unless $u = v = 0.5$ at each locus, i.e., there is symmetry between dominant and recessive alleles, the ratio $(\hat{H}_1/\hat{D})^{1/2}$ will not be a true measure of the degree of dominance. Further, Hayman (1954b) proposed a method of estimating whether $u = v = 0.5$. If $u = v = 0.5$, then the ratio $H_2/4 H_1$ is equal to 0.25. In the present study, this ratio was not 0.25 in most cases, indicating that $u \neq v$. The asymmetrical distribution of dominant and recessive genes in the population might be one of the reasons for the overestimation of the degree of dominance in the component analysis.

It may be concluded that the parents selected for the present study are under the influence of an overdominance effect for all of the traits studied. Thus, in general, these parents are expected to generate considerable hybrid vigour in combinations. In particular, 'G', 'M-2' and 'Sarupat' races, which have higher concentrations of positive dominant genes, could be good candidates for the projected multibi combinations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Shri Suresh Rai, Statistician, CSR & TI, Pampore, who helped in compilation and computation of the entire data set.

REFERENCES

- DALY K., ROBSON D.S. (1969) Estimates of genetic parameters from a hybrid derivative in *Nicotiana*. *Genetics*, 62, 201-223.
 DICKSON M.H. (1967) Diallel analysis of seven economic characters in snap beans. *Crop Sci.*, 7, 121-124.

- GILBERT N.E.G. (1958) Diallel cross in plant breeding. *Heredity*, 12, 477-492.
- GRIFFING B. (1956) Concepts of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9, 463-493.
- HAYMAN B.I. (1954a) The analysis of variance and diallel tables. *Biometrics*, 10, 235-224.
- HAYMAN B.I. (1954b) The theory and analysis of diallel crosses. *Genetics*, 39, 789-809.
- HAYMAN B.I. (1958) The theory and analysis of diallel crosses, II. *Genetics*, 43, 63-85.
- JINKS J.L. (1954) The analysis of continuous variation in a diallel cross of *Nicotiana rustica* varieties. *Genetics*, 39, 767-788.
- JOHNSON L.P.V., AKSEL R. (1959) Inheritance of yielding capacity in a fifteen-parent diallel cross of barley. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 1, 208-265.
- JOHNSON L.P.V., AKSEL R. (1964) The inheritance of malting quality and agronomic characters in a diallel cross of barley. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 6, 178-200.
- KEARSEY M.J., JINKS J.L. (1968) A general method of detecting additive, dominance and epistatic variation for matrical traits. I. Theory. *Heredity*, 23, 403-410.
- KEMPTHORNE D. (1956) The theory of diallel cross. *Genetics*, 41, 451-459.
- KRISHNASWAMY S., JOLLY M.S., SUBBA RAO S. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races of silkworm. *Indian J. Genet.*, 24, 213-222.
- MATHER K., JINKS J.L. (1971) *Biometrical genetics*. 2nd edition, Chapman and Hall Ltd., London.
- 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, 301-306.
- VERHALEN L.M., MURRAY J.C. (1969) A diallel analysis of several fibre property traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Sci.*, 9, 311-315.

ETUDES SUR L'ACTION DES GENES CHEZ LE VER A SOIE POLYVOLTIN *BOMBYX MORI* L.

P. MUKHERJEE*, S.K. RAINA, C.K. PUROHIT & S.N. SUMBLI

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

*Afin de comprendre l'action des gènes et d'identifier des parents appropriés pour des croisements polyvoltins, on a réalisé une analyse graphique diallélique, une analyse des composants et de la capacité combinatoire chez huit races de ver à soie (*Bombyx mori* L.) couramment utilisées, à savoir : Nistari, G, O, M-2 et OS-616, caractérisées par des cocons jaunes et Raj, Tamil Nadu White et Sarupat qui produisent des cocons blancs. L'analyse graphique révèle que les parents possèdent une proportion plus importante de gènes dominants pour le poids du cocon et le poids de la coque, tandis que le rendement en cocons/100 pontes saines (DFL) et la richesse soyeuse sont gouvernés par une dominance respectivement complète et partielle. Les analyses des composants et de la capacité combinatoire font apparaître une prépondérance des effets de dominance pour tous les caractères. Le graphique de l'écart type indique que les races G, M-2 et Sarupat présentent des concentrations plus élevées en gènes positifs dominants et qu'elles pourraient être utilisées dans des croisements polyvoltins $\times$ bivoltins.*

INTRODUCTION

Dans l'Etat de Jammu et Cachemire, il existe un seul élevage commercial d'hybrides de vers à soie bivoltins. Cependant, une tentative modeste a été faite pour introduire un élevage d'automne de vers à soie bivoltins. Après la démonopolisation de la sériciculture dans cet Etat, une vaste plantation de mûrier a été mise en place par un groupe privé, rendant possible l'établissement opérationnel de la sériciculture. Dans un premier temps, il apparaît qu'un système de culture multiple doit être mis en place : entre les élevages bivoltins de printemps et d'automne, au moins un élevage poly $\times$ bivoltin peut être réalisé durant les mois d'été. L'identification de combinaisons poly $\times$ bivoltin devient donc impérative. La connaissance de l'action des gènes permet de sélectionner les parents nécessaires pour la préparation des graines hybrides. On a donc retenu, pour cette étude, les huit races polyvoltines les plus couramment utilisées en Inde, maintenues par le Central Sericultural Research and Training Institute de Pampore au Research Extension Centre de Sujanpur afin de sélectionner le composant femelle des croisements poly $\times$ bivoltins sur la base de l'action des gènes chez les parents.

MATERIELS ET METHODES

Cinq races de vers à soie polyvoltins, caractérisées par des cocons jaunes, à savoir : Nistari, G, O, M-2 et OS-616, et trois races donnant des cocons blancs de formes différentes, Raj, Tamil Nadu White et Sarupat, constituent le matériel de base. Ces races sont utilisées de manière extensive en Inde et représentent un large spectre de caractères pour les cocons. L'origine et les caractéristiques de ces races sont les suivantes :

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

Race			Caractéristiques
Code	Nom	Origine	
1	Nistari	Bengale occidentale, Inde	La plus ancienne des races polyvoltines connues en Inde. Cocons allongés à bouts pointus.
2	G	CSR & TI, Berhampore, Inde	Lignée mutante à haut potentiel de rendement. Se combine bien dans différents croisements poly $\times$ bi. Larves pigmentées et cocons allongés à bouts arrondis.
3	O	CSR & TI Berhampore, Inde	Lignée mutante donnant des larves pigmentées. Cocons allongés ovales à bouts arrondis, de petite taille et à grain moyen.
4	M-2	CSR & TI Berhampore, Inde	Lignée sélectionnée par mutation. Cocons allongés à bouts pointus. Recommandés pour l'élevage sur le terrain.
5	OS-616	CSR & TI Berhampore, Inde	Lignée mutante performante. Actuellement utilisée sur le terrain. Larves pigmentées donnant des cocons allongés à bouts arrondis et à gros grain.
6	Raj	Bangladesh	Race du Bangladesh bien adaptée aux conditions indiennes. Larves unies, cocons à texture fine et bouts arrondis.
7	Tamil Nadu White	Tamil Nadu, Inde	Race utilisée dans le sud de l'Inde. Larves unies, cocons dont l'un des bouts est arrondi, l'autre pointu.
8	Sarupat	Assam, Inde	Lignée ancienne d'Assam. Larves unies, cocons fuselés, tirant sur le vert et dont l'un des bouts est pointu.

Des croisements non réciproques de toutes les combinaisons possibles (diallèles) ont été réalisés entre ces races. Les 28 F₁ et les huit parents ont été préparés suivant la méthode des blocs aléatoires avec trois réplicats au Research Extension Centre de Sujampur au cours du printemps (mars-avril) 1992. Une ponte saine a été utilisée pour chaque réplicat et chaque traitement. L'élevage a été réalisé suivant les méthodes standard. Les observations portent sur quatre caractères : rendement en cocons pour 100 pontes saines (que nous appellerons rendement en cocons par simplification), le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse. Les valeurs de la richesse soyeuses ont été transformées en valeurs angulaires avant l'analyse. L'analyse graphique et l'analyse des composants des croisements dialléliques ont été réalisées respectivement d'après la méthode de Jinks (1954) et celle de Hayman (1954a). L'analyse de la capacité combinatoire a été effectuée selon Griffing (1956).

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude a été mise en place afin de connaître l'architecture génétique des vers à soie polyvoltins pour ce qui concerne les composants de la variation génétique, la proportion de chacun des composants et la capacité combinatoire. Ce modèle présuppose une ségrégation diploïde, des parents homozygotes, l'absence de différences réciproques, l'absence d'allélisme multiple, une distribution non corrélée des gènes entre les parents et une absence d'épistasie. L'absence d'au moins

l'un de ces postulats infirme les conclusions de l'analyse. Les races classées dans cette étude n'ont pas été échantillonnées au hasard mais ont été sélectionnées sur la base des caractères de leurs cocons. Etant donné qu'un grand nombre de parents divers forment le matériel de base, on peut penser que les résultats obtenus et les conclusions tirées de cette étude permettraient une application d'ordre général.

L'analyse de variance des F_1 dialléliques et de leurs parents a été réalisée pour quatre caractères (Tableau I). La somme moyenne des carrés est significative pour tous les caractères, ce qui indique que la variabilité entre les parents et les croisements est très élevée ; ceci est également évident à la lecture des performances *per se* des parents pour différentes caractéristiques des cocons, comme le montre le tableau II. On observe également des variances fortement significatives pour les effets de la capacité combinatoire générale (GCA) et de la capacité combinatoire spécifique (SCA) pour tous les caractères, sauf les effets GCA pour le poids du cocon. Le ver à soie *Bombyx mori* L. est (essentiellement) un diploïde à méiose normale. Bien que les différences réciproques n'aient pas été étudiées ici, aucune différence réciproque n'a été observée pour les caractères étudiés. Pour ce qui concerne l'homozygotie des parents, les lignées sont (complètement) uniformes et ont été maintenues chaque année par fécondation directe, elles sont donc supposées homozygotes. Il n'existe pas d'informations sur la question de l'allélisme multiple mais Hayman (1954b) et Kempthorne (1956) ont indiqué que sa présence ne modifierait pas fortement la véracité des conclusions tirées pour ce genre d'analyse. Cependant, la condition selon laquelle les gènes des différents caractères doivent être répartis indépendamment chez les parents ne serait apparemment pas remplie, puisque les parents sélectionnés ne viennent pas d'un échantillonnage aléatoire des populations de vers à soie étudiées. Le choix des parents est donc approprié et correspond à un but précis.

Une analyse graphique des croisements dialléliques (Jinks, 1954) a été réalisée pour les quatre caractères. La régression linéaire de W_r sur V_r , la parabole de restriction et la distribution des points parentaux autour de la ligne de régression sont représentées dans les figures 1 à 4. Afin de déterminer si la dominance est due à des gènes positifs ou négatifs, un graphique de l'écart type pour les effets parentaux (Y_r) et l'ordre parental de dominance ($\overline{W_r + V_r}$) a été dessiné selon la méthode décrite par Hayman (1954b) et Johnson et Aksel (1959) et représenté avec les graphiques de W_r , V_r (Fig. 1 à Fig. 4).

La véracité des postulats de diallélisme a été vérifiée par le test " t^2 " (Hayman, 1954a) qui est non significatif pour tous les caractères étudiés (Tableau II). Ceci indique que la plupart des postulats sont vérifiés. Lorsque les hypothèses de base sont valables, la méthode de Hayman permet d'interpréter la régression de la rangée de covariance (W_r) sur la rangée de variance (V_r). Cependant, l'inclinaison de la ligne de régression "b" dévie fortement de l'unité dans le cas du rendement en cocons, ce qui suggère la présence d'une épistasie. Par ailleurs, le coefficient de régression est non significatif de 0, sauf pour le poids du cocon, ce qui indique l'absence de certains des postulats. Hayman (1954b) affirme que l'estimation des paramètres de populations pour un caractère donné est faisable même lorsque les postulats sont partiellement absents de ce caractère. Krishnaswamy et coll. (1964) ont également observé la présence d'interactions non alléliques pour le taux effectif d'élevage dans une analyse diallélique utilisant des races polyvoltines. Nos résultats corroborent l'absence d'épistasie pour le poids du cocon et le poids de la coque et concordent avec ceux de Krishnaswamy et coll. (1964) et Sarkar et coll. (1991).

Plusieurs chercheurs (Kearsey et Jinks, 1968 ; Daly et Robson) ont montré, au cours d'études sur la transmission quantitative, qu'il était peu probable que tous les postulats soient vérifiés. Lorsque les postulats sont absents au niveau des parents, Hayman (1954b) suggère d'ôter du tableau les points de la rangée parasite situés loin de la courbe correspondant à l'inclinaison d'unité du graphique V_r , W_r jusqu'à ce que les croisements restants répondent correctement au test. Cette méthode a été contestée par Kempthorne (1956) et d'autres chercheurs s'appuyant sur le fait qu'elle entraînerait une perte de la nature aléatoire de l'échantillonnage. De plus, le retrait d'une rangée n'est pas souhaitable lorsque le sélectionneur s'intéresse uniquement à un ensemble donné de parents sélectionnés pour leurs caractères recherchés. L'analyse peut donc être réalisée même si l'hypothèse n'est que partiellement vérifiée. Les résultats obtenus dans ces conditions se limitent toutefois au matériel étudié (Gilbert, 1969) et ne peuvent être généralisés. De nombreux chercheurs qui ont utilisé l'analyse diallélique de Hayman ont été confrontés à l'absence partielle des postulats inhérents pour certains

des caractères (Johnson et Aksel, 1964 ; Dickson, 1967). Comme dans le cas présent, particulièrement pour le rendement en cocons, l'absence d'un postulat peut être attribué en premier lieu à une épistasie. Ceci suggère que la variance épistatique est un composant important de la variance génétique totale et doit être reconnue en tant que tel. Il est donc irréaliste de supposer l'absence d'épistasie.

La lecture de l'analyse graphique indique que le point d'intersection de l'axe W_r par la ligne de régression se situe en dessous de l'origine pour le poids du cocon et le poids de coque, ce qui révèle une surdominance pour ces caractères. La droite de régression coupe pratiquement le point d'origine dans le cas du rendement en cocons, ce qui indique une dominance complète. Une dominance partielle a été relevée pour la richesse soyeuse. De plus, les points de la rangée pour le graphique W_r , V_r sont éparpillés tout le long de la ligne de régression pour tous les caractères, ce qui indique qu'il existe une forte diversité génétique entre les parents. Contrairement aux résultats que nous avons obtenus, Krishnaswamy et coll. (1964) et Sarkar et coll. (1991) ont observé, à partir d'une analyse graphique, une dominance partielle pour le poids du cocon. Cependant, pour ce qui concerne le poids de la coque et la richesse soyeuse, les résultats présentés ici concordent avec les observations de Krishnaswamy et coll. (1964).

Le coefficient de corrélation est non significatif pour le rendement en cocons et la richesse soyeuse, ce qui suggère la présence d'une proportion égale d'allèles dominantes positives et négatives; tandis qu'on observe une répartition symétrique, " r " étant significatif, pour le poids du cocon et le poids de la coque. Le parent "G" présente une concentration plus forte de gènes dominants positifs pour le rendement en cocons et le poids du cocon. Les parents "M-2" et "Sarupat" présentent également un nombre plus grand de gènes dominants respectivement pour le rendement en cocons et la richesse soyeuse. "Nistari" et "O" présentent une accumulation plus importante de gènes dominants (sauf "O" pour le poids du cocon) mais ont une direction négative pour tous les caractères. Par ailleurs, "Tamil Nadu White" présente logiquement un plus grand nombre de gènes récessifs, mais principalement dans une direction positive. Les résultats ne sont pas cohérents pour les autres parents.

Les estimations des composants de la variance génétique et les écarts types ainsi que leur proportion relative sont donnés pour les quatre caractères dans le tableau III. L'estimation du composant additif (D) est significative pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, tandis que les estimations des composants de dominance H_1 et H_2 sont significatifs pour tous les caractères. Les composants de dominance sont toujours plus élevés que les composants additifs. Le composant h^2 est significativement positif pour tous les caractères sauf la richesse soyeuse, ce qui indique une direction positive pour la dominance.

Le degré moyen de dominance, mesuré par $(H_1/D)^{1/2}$ est supérieur à l'unité pour tous les caractères, ce qui suggère la présence d'une proportion élevée pour la surdominance. La répartition des allèles dominants et récessifs estimée à partir du rapport $H_2 / 4 H_1$ est proche de 0,25 pour le rendement en cocons, ce qui suggère une symétrie de la répartition allélique. Cependant, on observe un écart par rapport à la valeur estimée de 0,25 pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, indiquant une répartition asymétrique des homozygotes positifs et négatifs chez les parents. Le rapport $(4DH_1)^{1/2} + F/4DH_1)^{1/2} - F$ est plus grand que l'unité pour tous les caractères, ce qui suggère que les parents possèdent un excédent de gènes dominants. Le rapport $h^2 / \hat{H}_2$ donne l'estimation du nombre de groupes de gènes gouvernant un caractère donné présentant parallèlement une dominance. La lecture du tableau III indique que plus d'un groupe allélique gouverne chacun des caractères. Mather et Jinks (1971) suggère que l'action de gènes complémentaires peut entraîner une réduction du rapport $h^2 / \hat{H}_2$. Le nombre de gènes observé ici pour les différents caractères pourrait donc ne pas être le nombre réel. De faibles estimations pour le nombre de groupes de gènes gouvernant un caractère donné ont également été obtenues chez le ver à soie (Sarkar et coll., 1991).

La comparaison du degré de dominance estimé par différentes analyses est présentée dans le tableau IV. Ce tableau montre que la plupart des caractères sont gouvernés par une surdominance dans les trois analyses, sauf le rendement en cocons et la richesse soyeuse, ce qui indique une dominance complète pour le premier caractère et une dominance partielle pour le deuxième dans l'analyse graphique. Dans l'analyse graphique, le degré moyen de dominance dépend de la position de la ligne de régression par rapport à l'axe W_r ; le degré de dominance est lié uniquement au composant génétique des valeurs W_{ri} et V_{ri} . Ceci signifie que la présence d'une interaction génotype

× environnement pourrait aboutir à des écarts dans les valeurs W_{ri} et V_{ri} et entraîner ainsi un déplacement de la position de la ligne de régression, affectant de ce fait l'estimation du niveau de dominance. Il est donc nécessaire de procéder à une correction pour les composants de l'environnement.

L'écart du degré de dominance révélé par les différentes analyses peut être attribué à une autre cause, comme l'ont expliqué Mather et Jinks (1971), qui est la suivante : à moins que $u = v = 0,5$ à chaque locus, c'est-à-dire qu'il y ait symétrie entre les allèles dominants et récessifs, le rapport $(H_1/D)^{1/2}$ ne constituera pas une mesure vraie du degré de dominance. De plus, Hayman (1954b) a proposé une méthode pour estimer si $u = v = 0,5$. Si $u = v = 0,5$, alors le rapport $H_2 / 4 H_1$ est égal 0,25. Dans cette étude, ce rapport n'est pas de 0,25 dans la plupart des cas, ce qui indique que $u \neq v$. La répartition asymétrique des gènes dominants et récessifs dans la population pourrait être l'une des raisons de la surestimation du degré de dominance dans l'analyse des composants.

On peut conclure que les parents sélectionnés pour cette étude sont sous l'influence d'un effet de surdominance pour tous les caractères considérés. Ainsi, en règle général, estime-t-on que ces parents sont capables de donner des hybrides vigoureux dans les combinaisons. En particulier, les races "G", "M-2" et "Sarupat", qui présentent des concentrations plus fortes en gènes dominants positifs, pourraient être de bons candidats dans les projets de combinaisons poly × bivoltins.

MAGNITUDE OF HETEROSIS AND HETEROBELTIOSIS FOR EIGHT QUANTITATIVE TRAITS IN MULBERRY

B.N. SUSHEELAMMA* & S.B. DANDIN

Mulberry Breeding and Genetics Laboratory, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Karnataka, India.

The magnitude of heterosis was measured for eight quantitative traits that contribute to leaf yield in mulberry: height of the plant, number of primary and secondary branches per plant, number of leaves per meter length of the shoot, internodal distance, cuticle thickness, total leaf thickness and ratio of palisade parenchyma to spongy parenchyma. A study was carried out on the performance of 60 hybrids in comparison with 12 parents for these eight quantitative traits in twelve different combinations. Significant variation was expressed for all of the characters studied among the hybrids for percentage of heterosis over mid and better parents. Analysis of variance indicated that there were significant differences between hybrids for all the characters studied; the analysis of variance between parents vs hybrids also indicated significant differences for all the characters except height of the plant and ratio of palisade parenchyma to spongy parenchyma. Hybrids of S28 × S13 and S28 × Ber-S799 gave appreciable heterosis and heterobeltiosis for all the characters. Studies also revealed S28 and Ber-S1 as best female parents and S13 as best male parent among the different cross combinations as they contributed more towards the improvement of quantitative traits in hybrids.

Keywords: Heterosis, better parent, heterobeltiosis, diverse lines.

INTRODUCTION

The primary aim of any plant breeding programme is essentially to improve the genetic potentiality of the crop, more particularly, the quantitative traits contributing to the leaf yield in the plant. This is achieved in several ways, the most attractive one being heterosis breeding. Hybrid vigour, which is the manifest effect of heterosis, connotes an increase in the characters observed in hybrids relative to their parents. Hybrid vigour over better parental value is called 'heterobeltiosis'. It has been a common observation that the expression of heterosis is greater in hybrids obtained from genetically diverse lines. Karper and Quinby (1937) first published the results of crosses of sorghum, showing that the varieties milo and hegari were most heterotic among the varieties studied.

The exploitation of hybrid vigour is extended to many crops such as maize, bajra, sorghum, rice and forage crops because of its success in crop improvement programmes. Hybrid vigour is most exploited in cross-pollinated crops compared to self-pollinated ones. Since mulberry is a cross-pollinated crop, it could be exploited in a better way for crop improvement, especially by using crosses showing significant heterosis for more than one yield component. Hybrids are usually preferred to varieties because of their increased yield, better vegetative growth and better quantitative traits contributing to the yield.

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

Table I. Characteristic features of parents involved in the breeding programme.

Tableau I. Principaux caractères des parents utilisés dans le programme de sélection.

Name of the variety	Ploidy	Sex	Moisture content (%)	Moisture retaining capacity after 12 hr (%)	Total chlorophyll content (g fresh wt)	Protein content (%)	Cuticle thickness (µm)	Total leaf thickness (µm)	PP to SP (ratio)	Height of the plant (cm)	Number of primary branches per plant	Number of secondary branches per plant	Number of leaves per meter length of the shoot	Internodal distance (cm)
Nom de la variété	Ploidie	Sexe	Teneur en humidité (%)	Capacité de rétention de l'humidité après 12 hr (%)	Teneur totale en chlorophylle (g (poids frais))	Teneur en protéines (%)	Épaisseur de la cuticule (µm)	Épaisseur totale de la feuille (µm)	PP/ SP (rapport)	Hauteur du plant (cm)	Nombre de branches primaires par plant	Nombre de branches secondaires par plant	Nombre de feuilles par mètre de pousse	Distance internodale (cm)
S28*	2n=28	F	79.61	71.73	3.98	24.00	4.64	154.34	1:0.50	124.00	13.00	2.00	26.33	3.47
S36*	2n=28	F	78.00	69.06	2.81	22.48	3.39	145.56	1:0.63	177.66	14.33	4.33	25.00	3.66
S54*	2n=28	F	70.06	62.00	2.40	20.18	2.20	127.60	1:0.49	149.66	16.33	4.00	27.00	3.50
Ber-S1**	2n=28	F	77.08	69.36	3.42	23.09	5.07	147.46	1:0.44	190.00	18.00	8.66	22.00	5.10
K2**	2n=30	F	74.06	66.80	3.16	21.30	2.90	130.81	1:0.44	163.33	16.33	7.00	24.00	4.00
Local*	2n=28	F	75.36	67.30	3.00	21.90	3.50	140.70	1:0.46	178.33	18.00	8.00	23.00	4.10
S13	2n=28	M	78.80	70.01	3.80	22.95	4.89	148.50	1:0.37	191.00	24.00	11.00	26.00	3.10
S29*	2n=28	M	79.00	70.65	2.57	22.35	5.00	140.36	1:0.28	186.33	16.00	10.00	25.00	3.66
S34*	2n=28	M	79.50	71.00	3.37	23.00	4.66	146.71	1:0.56	194.40	18.33	9.00	27.00	3.60
S3*	2n=28	M	80.00	72.35	1.91	22.60	5.07	152.04	1:0.53	134.66	23.33	11.00	25.00	3.62
Ber-S799	2n=28	FM	77.00	68.00	2.11	20.30	2.43	136.71	1:0.45	135.67	22.00	8.33	26.00	3.67
RFS-135*	2n=28	FM	78.36	69.40	1.81	22.75	3.60	142.30	1:0.35	170.33	18.00	4.00	25.00	3.90

* *Morus indica*.** *Morus alba*.

PP: Palisade parenchyma / Parenchyme spongieux.

SP: Spongy parenchyma / Parenchymespongieux.

F: Female / Femelle.

M: Male / Mâle.

Various aspects of expression of hybrid vigour have been studied for important vegetative characters in sorghum (Arnon and Blum, 1962; Kambal and Webster, 1965, 1966; Beh and Atkins, 1967). Das and Krishnaswami (1965) carried out crosses between different species of mulberry and observed hybrid vigour in F₁ progeny for leaf characters and Kuchkarov (1977) compared leaf yield and quality between hybrids and parents in mulberry. Hybrids gave higher leaf yield and better quality leaves than their parents. Hazama (1968) obtained hybrids which had thicker leaves and higher leaf yield than their parents (15% more than their parents).

Mulberry improvement through breeding methods, which are based on the inherent capacity of the plant itself to respond to suitable manipulation towards permanent improvement and exploitation of heterosis and heterobeltiosis, have not been fully utilized. Therefore, the present work was carried out to determine the magnitude of heterosis and heterobeltiosis for important quantitative traits using a diverse group of parental stocks.

The important agronomical characters of F₁ mulberry considered for selection were: height of the plant, number of primary branches per plant, number of secondary branches per plant, internodal distance, weight of young shoots and number of leaves per meter length of shoot (Tojyo and Watanabe, 1981; Susheelamma *et al.*, 1988).

MATERIALS AND METHODS

The materials selected for the present breeding programme included released varieties, indigenous land races, and breeders' stock material. For the present study, six male cultivars, i.e., S13, S3, S34, S135, Ber-S799 and S29, and six female cultivars, i.e., S36, S54, Ber-S1, S28, Local and Kanva 2 (K2), were selected as parents. These twelve parents are genetically divergent and belong to the species *Morus indica* L. or *Morus alba* L. These were selected on the basis of important quantitative traits contributing to leaf yield and qualitative traits contributing to leaf quality (Table I). Twelve one-way crosses were carried out among these parents and fruit was collected. Seeds were separated from fruits and seedlings were raised. The five most promising F₁ progeny from each cross were isolated by a visual scoring technique. The isolated F₁ progeny were planted in the field with the parents in a lattice design with four replications. Data on eight important quantitative traits were recorded from the hybrids and parents. The data were computed and statistically analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

The parents selected for the breeding programme exhibited a broad range for the characteristic features investigated (Table I). The seed germination and percentage of seedlings surviving after 60 days were maximum in the cross of S54 × S34 (85.25%) and minimum in S36 × S13 (48.69%) (Table II).

A comparison of 12 crosses with parental values for heterosis and heterobeltiosis revealed that hybrids of crosses of S28 × Ber-S799, Ber-S1 × S13, K2 × Ber-S799, K2 × S3, S36 × Ber-S799 and Local × S3 exceeded their parents in plant height with significant positive heterosis over mid and better parents (Table III). Similar results have been obtained by Kirby and Atkins (1968), Kambal and Abu-El-Gasim (1976) and Nayeem and Bapat (1984) in sorghum and Coffman and Davis (1976) in oat. Negative heterosis for plant height was expressed when both parents were taller (Table III). In the cross in which the female parent was taller and the male parent shorter, high levels of heterosis and heterobeltiosis were observed. This observation indicated a dominant role of the female parent for the height of the plant. Among 60 hybrids of 12 crosses evaluated, hybrids of Ber-S1 × S13 produced very tall plants. Heterosis percentage in the 60 hybrids ranged from 23.24 to 27.79 over mid parent value for plant height (Fig. 1) and 12.50 to 40.00 over better parent value (Fig. 2).

Evaluation of hybrids of 12 crosses with their parents for number of primary and secondary branches revealed that hybrids of the crosses Local × S3, Local × S135, S28 × S29, S54 × S34 and Ber-S1 × S13 produced a greater number of primary and secondary branches than either parent. This confirms the findings of Dixit (1976) in grain sorghum, Deokar and Patil (1979) in safflower and Susheelamma *et al.* (1988) in mulberry where in all cases they observed a greater number of primary

Table II. Fruit characters, seed setting, seed germination and seedling survival in 12 crosses of mulberry*.

Tableau II Caractères des fruits, établissement et germination des graines et survie des plantules chez 12 croisements de murier.*

Name of the cross	Length sorosis (cm)	Width per sorosis (cm)	Weight per sorosis (g)	Number of achenes per sorosis	Number of seeds per sorosis	Weight of 100 seeds (g)	Seed setting rate (%)	Germination rate after 20 days (%)	Survival rate after 60 days (%)
<i>Nom du croisement</i>	<i>Longueur par sorose (cm)</i>	<i>Largeur par sorose (cm)</i>	<i>Poids par sorose (g)</i>	<i>Nombre d'akènes par sorose</i>	<i>Nombre de graines par sorose</i>	<i>Poids de 100 graines (g)</i>	<i>Taux de prise des graines (%)</i>	<i>Taux de germination après 20 jours (%)</i>	<i>Taux de survie après 60 jours (%)</i>
S36 × S13	1.467 ± 0.209	3.693 ± 0.306	0.977 ± 0.273	21.200 ± 4.491	18.250 ± 4.266	0.183	86.264 ± 11.557	51.25	48.69
S28 × Ber-S799	1.953 ± 0.203	3.653 ± 0.226	1.340 ± 0.251	36.733 ± 6.053	27.933 ± 7.704	0.124	75.602 ± 16.515	77.50	70.00
Ber-S1 × S13	1.673 ± 0.289	3.860 ± 0.356	1.204 ± 0.437	26.800 ± 5.659	22.600 ± 5.435	0.177	83.830 ± 6.591	55.00	51.70
K2 × Ber-S799	1.213 ± 0.181	3.360 ± 0.401	0.890 ± 0.291	22.600 ± 4.687	16.667 ± 5.120	0.152	73.508 ± 20.256	59.37	55.52
S28 × S13	2.353 ± 0.261	3.567 ± 0.337	1.767 ± 0.599	49.933 ± 7.741	38.982 ± 11.171	0.127	69.609 ± 16.541	69.37	64.52
S54 × S13	1.387 ± 0.213	3.733 ± 0.366	0.983 ± 0.265	20.467 ± 6.093	15.733 ± 5.824	0.162	77.449 ± 17.364	73.85	67.85
K2 × S3	1.600 ± 0.655	3.693 ± 0.531	0.315 ± 0.610	33.067 ± 12.595	27.267 ± 11.750	0.159	80.504 ± 12.855	78.75	71.67
S36 × Ber-S799	1.153 ± 0.491	3.350 ± 0.634	0.720 ± 0.574	15.533 ± 10.204	12.867 ± 9.172	0.181	83.068 ± 16.290	63.12	58.71
S54 × S34	1.387 ± 0.250	3.587 ± 0.250	0.768 ± 0.249	20.400 ± 3.795	13.533 ± 5.729	0.171	67.086 ± 27.376	96.87	85.25
S28 × S29	1.946 ± 0.566	3.480 ± 0.477	1.379 ± 0.642	34.400 ± 11.691	24.400 ± 12.999	0.136	66.799 ± 15.743	90.00	81.00
Local × S3	1.380 ± 0.240	3.147 ± 0.253	0.784 ± 0.229	29.333 ± 6.873	24.667 ± 7.374	0.121	83.316 ± 11.499	83.12	76.47
Local ± RFS 135	1.420 ± 0.260	3.320 ± 0.393	0.815 ± 0.242	26.733 ± 7.824	21.667 ± 7.853	0.119	18.464 ± 13.982	63.12	58.41

* Average of 15 fruits / *Moyenne de 15 fruits.*

Table III. Estimation of heterosis percentage over mid-parent and better parent for 8 quantitative traits.

Tableau III. Estimation du pourcentage d'hétérosis par rapport au parent moyen et au parent meilleur pour 8 caractères quantitatifs.

Character	Height of the plant (cm)		No. of primary branches		No. of secondary branches		No. of leaves /meter length		Internodal distance (cm)		Cuticle thickness (µm)		Total leaf thickness (µm)		PP to SP	
Caractère	Hauteur du plant (cm)		Nombre de branches primaires		Nombre de branches secondaires		Nombre de feuilles par mètre		Distance internodale (cm)		Epaisseur de la cuticule (µm)		Epaisseur totale de la feuille (µm)		PP sur SP	
C	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP
S36 × S13	1.63	-1.92	7.56	-9.52	-2.68	-25	7.77	6.38*	1.95	-7.1**	-3.38	-18.2**	-0.82	-1.06	-86**	-88.89**
	5.79**	2.09	7.56	-9.52	8.03	-16.75	1.31	0	2.85	-6.28**	15.22**	-2.45	0.39	0.14	-64**	-71.43**
	2.71	-0.87	18.88**	0	-8.19	-29.25	5.2	3.85	7.95**	-1.64	1.93	-13.7**	0.71	0.46	-56**	-65.08**
	2.53	-1.05	-9.43	-23.81**	8.03	-16.75	2.59	1.27	-1.05	-9.84**	16.67**	-1.23	-0.61	-0.86	-60**	-68.25**
	-1.09	-4.54**	28.28**	7.9	-13.54	-33.38**	6.49*	5.12	-3.15	-11.75**	7.49	-9**	-0.75	-1	-64**	-71.43**
S28 × Ber-S799	13.73**	8.85**	-5.09	-21.7**	-18.76	-48.01**	-1.25	-1.25	-4.95*	-6.67	35.79**	3.45	7.63**	1.48	-34.74**	-38**
	16.31	11.31**	-7.09	-23.35**	-24.95	-51.98**	0	0	-0.99	-2.78	42.01**	8.19	6.19	0.12	-41.05**	-44**
	23.24**	17.94**	-13.15*	-28.35**	-18.79	-48.01**	0	0	-8.63	-10.28**	28.71**	-1.94	8.23**	2.05	-36.84**	-40**
	17.85**	12.78**	-9.09	-25**	-50.09**	-68.07**	2.54	2.54	-9.48**	-11.11**	42.01**	8.19*	8.54**	2.34	-26.32	-30**
	14.5	9.58**	-5.09	-21.7**	0	-36.01**	-5.05	-5.05	-3.54	-5.28	45.69	10.99**	7.62**	1.47	-36.84	-40**
Ber-S1 × S13	12.57**	12.57**	-4.31	-11.14*	-56.06**	-57.74**	9.71**	1.27	-4.32*	-23.92**	-4.22	-5.92	1.37	-0.81	20.99	11.36
	1.92**	1.92	0.82	-38	-32.05**	-34.64**	9.71**	1.27	-0.12	-20.59**	-5.02	-6.71*	0.38	1.73	18.52	9.09
	6.81**	6.81**	-6	-12.71*	-8.04	-11.55	4.17	-3.85	3.82*	-17.45**	1.81	0	0.45	-1.66	20.99	11.36
	7.68**	7.68**	0.82	-6.38	-3.96	-7.62	2.75	-5.15	1.36	-19.41**	7.83*	5.92	0.37	-1.74	-1.23	-9.09
	8.55**	8.55**	-0.87	-7.95	0	-3.81	1.37	-6.42	9.99**	-12.55**	4.82	2.96	1.34	-0.79	-16.05	-22.73

Continued / Suite page suivante

Table III. Continued / *Tableau III. Suite.*

Character	Height of the plant (cm)		No. of primary branches		No. of secondary branches		No. of leaves /meter length		Internodal distance (cm)		Cuticle thickness (µm)		Total leaf thickness (µm)		PP to SP	
Caractère	Hauteur du plant (cm)		Nombre de branches primaires		Nombre de branches secondaires		Nombre de feuilles par mètre		Distance internodale (cm)		Epaisseur de la cuticule (µm)		Epaisseur totale de la feuille (µm)		PP sur SP	
C	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP
K2 × Ber-S799	10.37**	1.02	-32.12**	-38.35**	-56.56**	-60.02**	-3.21	-5.05	2.51	-2.27	-3.19	-11.03*	-3.89	-5.96	77.53**	75.56**
	8.36**	-0.81	-32.12**	-38.35**	-43.51**	-48.02**	-1.94	-3.8	2.77	-2.02	-10.69*	-17.93**	-2.99	-5.08	82.02**	80**
	11.71**	2.25	-28.43**	-35**	-39.2**	-44.06**	-0.66	-2.54	4.89**	0	-6.94	-14.48**	-2.4	-4.51	68.54**	66.67**
	14.39**	4.7*	-24.8**	-31.7**	-43.51**	-48.02**	-3.21	-5.05	8.59**	3.53	5.82	-2.76	-2.1	-4.21	55.06**	53.33**
	16.39**	6.53**	-30.31**	-36.7**	-65.3**	-68.07**	-1.94	-3.8	12.55**	7.3**	-12.57*	-19.66**	-1.11	-3.24	48.31**	46.67**
S28 × S13	-7.94**	-24.08**	-11.76*	-28.57**	-9.78	-41.75**	5.71*	5.05	-21.78	-9.22**	7.03*	4.29	8.59**	3.99	3.45	-10
	-10.48**	-26.28**	-5.88	-23.81**	-29.14	-54.25**	1.89	1.25	-1.85	-8.36**	-2.62	-5.11	-7.75**	3.18	-21.84	-32
	-4.98**	-21.64**	7.82	-12.71**	-9.78	-41.75**	0.63	0	-1.23	-7.78**	-2.83	-5.32**	5.04*	0.59	1.15	-12
	-21.06**	-34.91**	-15.71//	-31.76//	9.58	-29.25**	5.71	50.05	-7.41**	-13.54**	9.13**	6.34	4.88*	0.43	-8.05	-20
S54 × S13	-27.79**	-35.6**	-1.79	-12.71*	-11.17	-33.38**	-3.17	-4.96	-2.69	-11.65**	-7.48	-32.92**	-2.92	-7.62*	41.86**	24.49
	-23.88**	-32.12**	-0.03	-11.14*	5.5	-20.88	-1.89	-3.7	2.99	-6.5**	-20.45**	-42.33**	-2.05	-6.78*	48.84**	30.61*
	-26.81	-34.73**	-1.79	12.71*	22.17	-8.38	1.89	0	-5.97**	-14.63	-29.76**	-49.08*	-1.86	-6.6*	55.81**	36.73*
	-22.31**	-30.72**	-8.92*	-19.05**	-11.17	-33.38**	0.6	-1.26	2.99	-6.5	-34.27**	-52.35**	1.66	-3.26	48.84**	30.61*
	-25.05	-33.16**	-5.38	-15.9**	5.5	-20.88	-3.17	-4.96	5.97**	-3.79	-17.35**	-40.08**	1.86	-3.07	48.84**	30.61*

Continued / *Suite page suivante*

Table III. Continued / *Tableau III. Suite.*

Character	Height of the plant (cm)		No. of primary branches		No. of secondary branches		No. of leaves /meter length		Internodal distance (cm)		Cuticle thickness (µm)		Total leaf thickness (µm)		PP to SP	
Caractère	Hauteur du plant (cm)		Nombre de branches primaires		Nombre de branches secondaires		Nombre de feuilles par mètre		Distance internodale (cm)		Épaisseur de la cuticule (µm)		Épaisseur totale de la feuille (µm)		PP sur SP	
C	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP
K2 × S3	10.96**	1.22	-29.4**	-39.99**	-29.67**	-42.45**	-0.65	-1.29	4.08*	-0.5	-29.74**	-44.77**	-0.7	-7.64**	-11.34	-18.87
	5.82**	-3.47	-19.31**	-31.42**	-29.67**	-42.45**	3.28	2.61	2.77	-1.76	-5.14	-25.44**	0.11	-6.88*	13.4	3.77
	10.07**	0.41	-19.31**	-31.42**	-18.56	-33.36**	-3.28	-3.9	4.08*	-0.5	-19.7**	-36.88**	0.41	-6.6*	15.46	5.66
	10.96**	1.22	-29.4**	-39.99**	-37.11**	-48.55**	-1.94	-2.57	8.3**	3.53	-9.16**	-28.6**	0.87	-6.18*	-1.03	-9.43
	11.63**	1.84	-29.4**	-39.99**	-40.78**	-51.55**	-0.65	-1.29	5.4**	0.76	-29.23**	-44.38**	0.97	-6.08*	-7.22	-15.09
S36 × Ber-S799	16.39**	2.63	-14.59**	-26.7**	-5.21	-27.97*	-0.66	-2.54	7.44**	6.56**	27.49**	9.44*	0.1	-1.27	5.56	-9.52
	12.98**	-0.37	-26.25**	-36.7**	-10.58	-32.05**	-1.94	-3.8	-4.68*	-5.46**	15.12**	-1.18	0.99	-0.39	18.52	1.59**
	12.13**	-1.13	-26.25**	-36.7**	-10.58	-32.05**	-3.21	-5.05	-1.93	-2.73	38.14**	18.58**	-1.39	-2.74	22.22	4.76**
	14.9**	1.32	-18.44**	-30**	21.01	-8.04	-0.66	-2.54	0.55	-0.27	28.18**	10.03**	2.29	0.89	5.56	-9.52
	17.45	3.57*	-30.09**	-40**	-15.8	-36.01**	-5.81*	-7.6	-4.68*	-5.46**	0.34	-13.86**	0.47	-0.91	22.22	4.76**
S54 × S34	-2.52	-13.72**	5.77	0	-7.69	-33.33**	0	0	-3.98*	-5.15**	-11.66**	-34.98**	-1.27	-7.7**	2.86	-3.57
	-11.24**	-21.44**	-1.9	-7.26	-7.69	-33.33**	0	0	-17.7**	-18.7**	-30.03**	-48.5**	-0.36	-6.85*	-16.19	-21.43
	-7.17**	17.84**	1.9	-3.66	-38.46**	-55.56**	-4.96	-4.96	-12.21**	-13.28**	-37.9**	-54.29**	-5.03	-11.22**	4.76	-1.79
	-5.81**	-16.64**	-3.87	-9.11	-23.08	-44.44**	-3.7	-3.7	-8.09**	-9.21**	-33.53**	-51.07**	-5.54*	-11.7**	-6.67	-12.5
	-6.39**	-17.15**	1.9	-3.66	7.69	-22.22	-7.41**	-7.41	-9.47**	-10.57**	-40.52**	-56.22**	-6.93**	-12.99**	-14.29	-7.14

Continued / Suite page suivante

Table III. Continued / *Tableau III. Suite.*

Character	Height of the plant (cm)		No. of primary branches		No. of secondary branches		No. of leaves /meter length		Internodal distance (cm)		Cuticle thickness (μm)		Total leaf thickness (μm)		PP to SP	
Caractère	Hauteur du plant (cm)		Nombre de branches primaires		Nombre de branches secondaires		Nombre de feuilles par mètre		Distance internodale (cm)		Epaisseur de la cuticule (μm)		Epaisseur totale de la feuille (μm)		PP sur SP	
C	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP
S28 $\times$ S29	-19.23**	-32.74**	1.1	-8.38	-29.76	-56.7**	-2.59	-5.05	-15.85**	-18.03**	2.7	-1	-0.34	-1.95	43.59**	12
	-12.57**	-27.19**	24.14**	12.5	-18.9	-50**	1.31	-1.25	-13.04**	-15.3**	8.71**	4.8	-0.69	-2.29	5.13	-18
	-10.21**	-25.22**	17.24**	6.25	-35/12*	-60**	-2.59	-5.05	-15.57**	-17.76**	9.54**	5.6	0.11	-1.51	53.85**	20
	5.91**	-11.81**	21.79**	10.37	-18.9	-50**	-2.59	-5.05	-10.8**	-13.11**	0.41	-3.2	3.08	1.41	0	-22
	-11.06**	-25.94**	10.34	0	-24.41	-53.4**	-0.02	-2.54	-9.96**	-12.3**	6.64*	2.8	3.59	1.92	17.95	-8
Local $\times$ S3	23.98**	7.44**	9.1**	-5.7	-36.84	-45.45**	-2.65	-3.9	6.47**	3.95**	-7.41*	-21.1**	-1.96	-7.66**	-4.11	-33.96
	18.33**	2.54	-0.82	-14.27**	-22.84	-33.36**	-1.3	-2.57	7.82**	5.26**	-13.19**	-26.04**	-1.55	-7.27**	34.25**	-7.55
	17.91**	2.18	23.98**	7.16	-5.26	-18.18**	-2.65	-3.9	2.43	0	-18.75**	-30.77**	-2.61	-8.27**	-17.81	-43.4**
	16.44**	0.91	-0.82	-14.27**	-15.79	-27.27**	-1.3	-2.57	5.12**	2.63	-27.78**	-38.46**	-2.44	-8.12**	-17.81	-43.4**
	10.58**	-4.17	-10.74*	-22.85**	-15.79	-27.27**	-2.65	-3.93	5.93**	3.42	-14.81**	-27.42**	-1.78	-7.49**	-9.59	-37.74**
Local $\times$ RFS135	5.87**	4.72**	2.86	0	0	0	-3.29	-5.15	-6.95**	-8.42	-17.31**	-21.75**	1.03	-1.34	44.74**	-1.79
	3.49*	2.36**	8.57	5.56	-12.5	-12.5	-1.96	-3.85	-4.28*	-5.79**	-30.78**	-34.5**	2.69	0.28	50**	1.79
	7.71**	6.53**	14.29**	11.11	12.5	12.5	-3.29	-5.15	-0.8	-2.37**	0.92	-4.5	3.32	0.89	76.32**	19.64
	10.65**	9.44**	2.86	0	4.125	4.125	-1.96	-3.85	4.28*	2.63	-4.36	-9.5*	-0.42	-2.75	42.11	-3.57
	6/24**	5.09**	0.91	-1.89	-8.375	-8.375	3.25	1.27	6.95**	5.26	-2.25	-7.5	0.54	-1.82	44.74**	-1.79

C: Crosses / *Croisements.*PP: Palisade parenchyma / *Parenchymepalissadique.*SP: Spongy parenchyma / *Parenchyme spongieux.*MP: Mid parent / *Parent moyen.*BP: Better parent / *Meilleur parent.*

and secondary branches in hybrids than in parents. The heterosis percentage over mid and better parent is graphically represented in Figures 1 and 2. In the cross Ber-S1 $\times$ S13, S13 was used as the male parent to increase the number of leaves per meter length of the shoot, and, as expected, the hybrids expressed positive heterosis over mid and better parent values. Similar observations have been made by Joglekar *et al.* (1960), Liang (1967), Kirby and Atkins (1968) and Vasudev Rao and Goud (1975) in sorghum, where they observed significantly superior heterobeltiosis for the leaf number in hybrids.

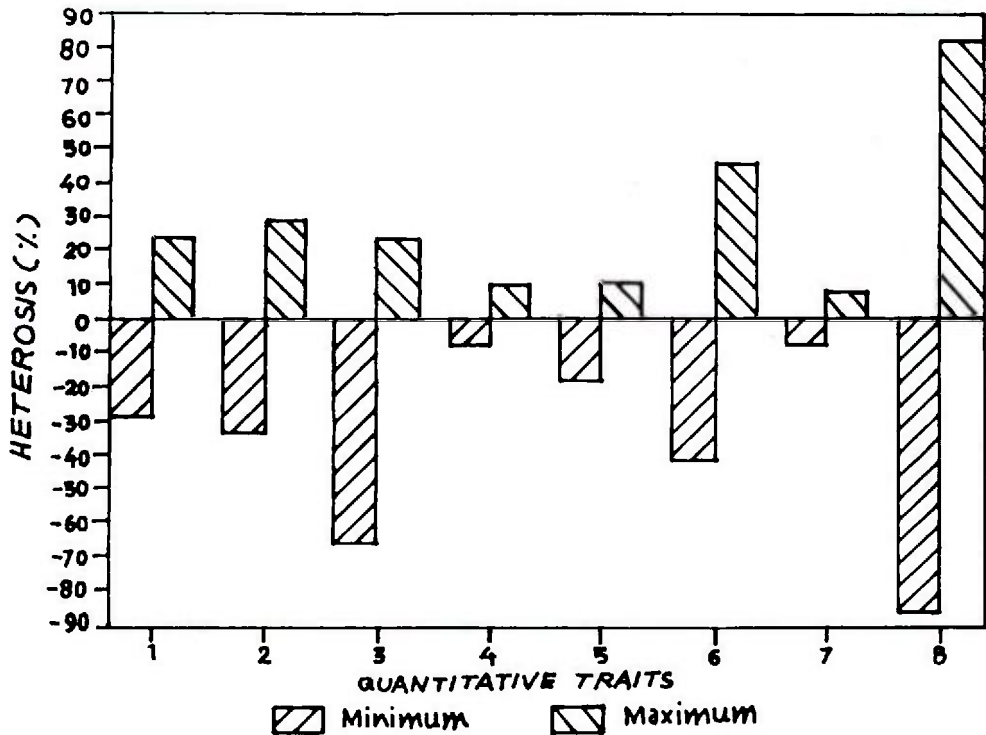


Fig. 1: Heterosis percentage over mid parent.

1: Height of the plant. 2: Number of primary branches per plant. 3: Number of secondary branches per plant. 4: Number of leaves per meter length. 5: Internodal distance. 6: Cuticle thickness. 7: Total leaf thickness. 8: Ratio of palisade parenchyma to spongy parenchyma.

Fig. 1 : Pourcentage d'hétérosis sur le parent moyen.

1 : Hauteur du plant. 2 : Nombre de branches primaires par plant. 3 : Nombre de branches secondaires par plant. 4 : Nombre de feuilles par mètre. 5 : Distance interdonale. 6 : Epaisseur de la cuticule. 7 : Epaisseur totale de la feuille. 8 : Rapport parenchyme palissadique sur parenchyme spongieux.

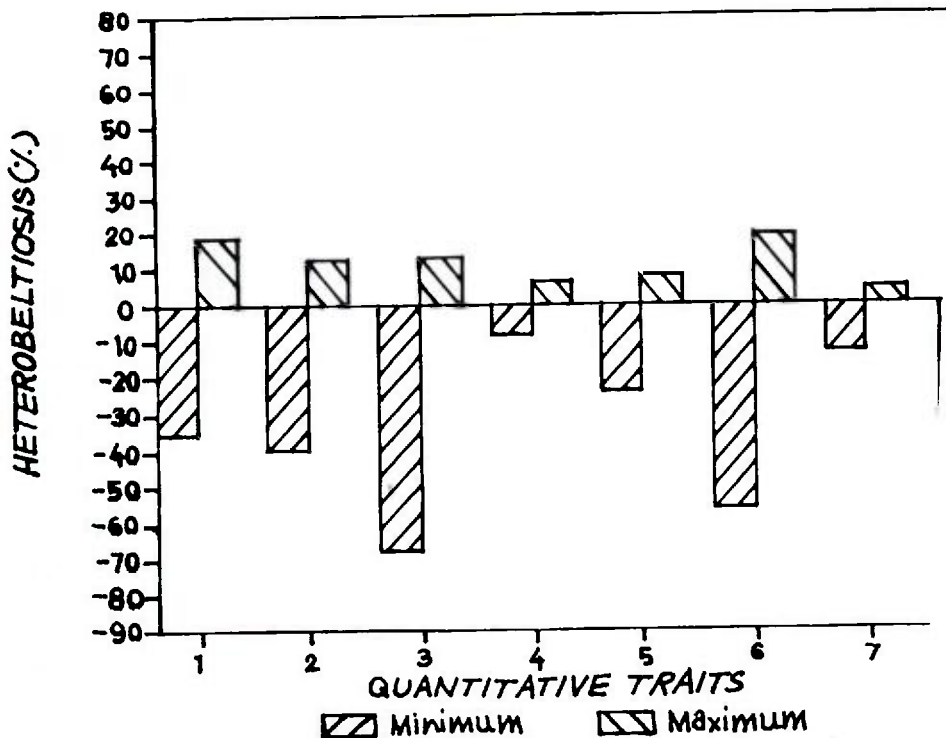


Fig. 2: Heterosis percentage over better parent.

1: Height of the plant. 2: Number of primary branches per plant. 3: Number of secondary branches per plant. 4: Number of leaves per meter length. 5: Internodal distance. 6: Cuticle thickness. 7: Total leaf thickness. 8: Ratio of palisade parenchyma to spongy parenchyma.

Fig. 2 : Pourcentage d'hétérosis sur le meilleur parent.

1 : Hauteur du plant. 2 : Nombre de branches primaires par plant. 3 : Nombre de branches secondaires par plant. 4 : Nombre de feuilles par mètre. 5 : Distance interdonale. 6 : Epaisseur de la cuticule. 7 : Epaisseur totale de la feuille. 8 : Rapport parenchyme palissadique sur parenchyme spongieux.

Evaluation of hybrids of 12 crosses with their parents revealed that hybrids of S36 × S13, S28 × Ber-S799, Ber-S1 × S13 and S28 × S13 produced more leaves per meter length of shoot than their parents (Table III). This observation is in confirmation with the findings of Kirby and Atkins (1968) in grain sorghum. Moreover, the differences observed were significant (Table IV), which indicated improvement of hybrids over parent. Hybrids of S28 × Ber-S799, Ber-S1 × S13, S28 × S29 and S29 × Ber-S799 exceeded their mid and better parents for cuticle thickness. This observation confirms the earlier findings of Susheelamma *et al.* (1988) in mulberry. Analysis of variance indicated significant differences between parents and hybrids for this feature (Table IV). In the hybrids of Ber-S1 × S13, significant positive heterosis and heterobeltiosis were observed. Therefore, the female parent made a significant contribution towards the improvement of cuticle thickness in the hybrids.

Table IV. Analysis of variance and indicated levels of significance for 8 quantitative traits measured on 60 hybrids and their parents.

Tableau IV. Analyse de variance et seuils de signification pour 8 caractères quantitatifs mesurés chez 60 hybrides et chez leurs parents.

Source	Degree of freedom	Height of the plant (cm)	Number of primary branches	Number of secondary branches	Number of leaves per meter length	Internodal distance (cm)	Total leaf thickness (μm)	Cuticle thickness (μm)	Palisade parenchyma to spongy parenchyma
Source	Degré de liberté	Hauteur du plant (cm)	Nombre de branches primaires	Nombre de branches secondaires	Nombre de feuilles par mètre	Distance internodale (cm)	Epaisseur totale de la feuille (μm)	Epaisseur de la cuticule (μm)	Parenchyme palissadique/ parenchyme spongieux
Replication <i>Réplicat</i>	2	22.005	0.227	1.463	6.616	0.007	0.024	17.127	0.009
Treatment <i>Traïement</i>	71	1781.041**	23.640**	8.660**	2.963**	0.479**	3.170**	223.443**	0.063**
Parent	11	1912.068**	25.293**	19.808**	7.808**	0.717**	3.437**	268.613**	0.046**
Hybrid <i>Hybride</i>	59	1786.705**	23.230**	5.269**	2.019**	0.431**	3.161**	217.709**	0.067**
Parent × hybrid <i>Parent × hybride</i>	1	5.533 ^{NS}	29.668**	86.134**	5.348*	0.675**	0.798**	64.921 ^{NS}	0.024 ^{NS}
Error / <i>Ecart</i>	142	15.183	1.701	1.599	1.034	0.009	0.038	26.527	0.008

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

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

Hybrids of S28 × S13, S28 × S29, S28 × Ber-S799, S36 × Ber-S799 expressed significant positive heterosis over mid and better parents for total thickness of leaf (Table III). In all of the crosses where S28 was used as the female parent (Table I), the improvement of leaf thickness was maximum. This clearly indicated a dominant role for the female parent. Among different crosses evaluated for ratio of palisade to spongy parenchyma, hybrids of S28 × Ber-S799, S28 × S29, S54 × S34 expressed maximum heterosis over mid and better parents (Table III).

SUMMARY

From the analysis of variance for several characters investigated here, there is substantial evidence that hybrids are more productive than their parents. The combination of S28 × S13 and S28 × Ber-S799 gave appreciable heterosis for all of the characters studied. This suggests that heterotic breeding involving these combinations could be extensively exploited.

REFERENCES

- ARNON I, BLUM A. (1962) Factors responsible for yield superiority of hybrid sorghum. *Israel J. Agric. Res.*, 12, 95-105.
- BEH C.M., ATKINS R.F. (1967) Estimates of general and specific combining ability in F₁ hybrids for yield and its components in grain, *Sorghum vulgare* Pers. *Crop Sci.*, 7, 225-228.
- COFFMANN F.A., DAVIS L.L. (1934) Heterosis of hybrid vigour in oat. *J. Am. Soc. Agron.*, 26, 318-327.
- DAS B.C., KRISHNASWAMI S. (1965) Some observations on interspecific hybridization in mulberry. *Indian J. Seric.*, 4, 11-18.
- DEOKAR A.B., PATIL F.B. (1979) Heterosis safflower. *Indian J. Agric. Sci.*, 49, 514-517.
- HAZAMA K. (1968) Breeding of mulberry tree. *JARQ*, 15-19.
- JOGLEKAR R.G., KULKARNI S.A., BHALE N.L. (1960) A study of heterosis in Jowar. *Parbhani Agric. Coll. Mag.*, 2, 45-49.
- KAMBAL A.E., WEBSTER O.J. (1965) Estimation of general and specific combining ability in grain sorghum. *Crop Sci.*, 5, 521-523.
- KAMBAL A.E., WEBSTER O.J. (1966) Manifestations of hybrid vigour in grain sorghum and the relations among the components of yield weight per bushel and height. *Crop Sci.*, 6, 513-515.
- KAMBAL A.E., ABU-EL-GASIM E.H. (1976) Manifestations of heterosis in grain sorghum. *Exp. Agric.*, 12, 33-42.
- KARPER R.E., QUINBY J.R. (1937) Hybrid vigour in sorghum. *J. Hered.*, 28, 83-91.
- KIRBY A.E., ATKINS R.E. (1968) Heterotic response for vegetative and mature plant characters in grain sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Crop Sci.*, 8, 335-339.
- KUCHKAROV V. (1977) Economically useful top crosses of mulberry. *Tr. Sredineaz N.I. Shelkovod*, 11, 156-164.
- LIANG G.H. (1967) Diallele analysis of agronomic characters in grain sorghum, *Sorghum vulgare*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 9, 269-276.
- NAYEEM K.A., BAPAT D.R. (1984) Heterosis and heterobeltiosis for developmental and panicle characters in grain sorghum. *Indian J. Agric. Sci.*, 54, 169-174.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., SENGUPTA K. (1988) Genetic improvement of mulberry (*Morus alba* L.) for drought resistance. *Genome*, 30, 354-360.
- TOJOYO I., WATANABE (1981) The agronomic characters of F₁ mulberry plants and their correlations in the process of individual selection. *Tech. Bull. Sericult. Exp. Sta.*, Tsukuba, 56, 1-45.
- VASUDEV RAO M.J., GOUD J.V. (1975) Heterosis in relation to heterozygosity in sorghum. *Mysore J. Agric. Sci.*, 9, 67-71.

AMPLITUDE DE L'HÉTÉROSIS ET DE L'HÉTÉROBELTIOSIS POUR HUIT CARACTÈRES QUANTITATIFS CHEZ LE MURIER

B.N. SUSHEELAMMA* & S.B. DANDIN

Mulberry Breeding and Genetics Laboratory, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Karnataka, Inde.

L'amplitude de l'hétérosis a été mesurée pour huit caractères quantitatifs qui contribuent au rendement en feuilles chez le mûrier : hauteur du plant, nombre de ramifications primaires et secondaires par plant, nombre de feuilles par mètre de pousse, distance internodale, épaisseur de la cuticule, épaisseur totale de la feuille et rapport parenchyme palissadique sur parenchyme spongieux. Une étude a été réalisée sur la performance comparée de 60 hybrides et de 12 parents pour ces huit caractères quantitatifs et douze combinaisons différentes. On observe des variations significatives pour tous les caractères étudiés entre les hybrides pour le pourcentage d'hétérosis par rapport au parent moyen et au meilleur parent. L'analyse de variance fait apparaître des différences significatives entre les hybrides pour tous les caractères étudiés ; l'analyse de variance entre parents et hybrides révèle également des différences significatives pour tous les caractères, sauf la hauteur du plant et le rapport parenchyme palissadique sur parenchyme spongieux. Les hybrides de S28 × S13 et de S28 × Ber-S799 donnent une hétérosis et une hétérobeliosis importantes pour tous les caractères. Parmi toutes les combinaisons étudiées, S28 et Ber-S1 sont les meilleurs parents femelles et S13 le meilleur parent mâle, leur contribution pour l'amélioration des caractères quantitatifs chez les hybrides étant plus élevée.

INTRODUCTION

Le but principal de tout programme d'amélioration d'une culture est d'améliorer le potentiel génétique de cette culture et, plus particulièrement, les caractères quantitatifs qui contribuent au rendement en feuilles chez la plante. Il existe plusieurs façons d'atteindre ce but, la plus courante étant la sélection par hétérosis. La vigueur hybride, qui forme l'expression de l'hétérosis, traduit une augmentation des caractères observés chez les hybrides par rapport à leurs parents. La vigueur hybride calculée par rapport à la valeur du parent moyen est appelée "hétérobeliosis". Il est généralement admis que l'expression de l'hétérosis est plus forte chez les hybrides issus de lignées génétiquement diverses. Karper et Quinby (1937) ont les premiers publié des résultats sur le croisement du sorgho qui ont montré que les variétés milo et hegari étaient les plus hétérotiques parmi les variétés étudiées.

L'exploitation de la vigueur hybride a été appliquée sur de nombreuses autres cultures comme le maïs, le bajra, le sorgho, le riz et les cultures fourragères en raison des résultats excellents qu'elle permet d'obtenir dans les programmes d'amélioration. La vigueur hybride est exploitée davantage chez les cultures à pollinisation croisée que chez les cultures à pollinisation directe. Le mûrier étant une culture à pollinisation croisée, il serait possible d'en améliorer la culture en utilisant des croisements présentant une hétérosis significative pour plus d'un composant du rendement. On préfère

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

souvent les hybrides aux variétés car ils sont supérieurs pour ce qui concerne le rendement, la croissance végétative et les caractères contribuant au rendement.

Divers aspects de l'expression de la vigueur hybride ont été étudiés pour ce qui concerne les caractères végétatifs importants chez le sorgho (Arnon et Blum, 1962 ; Kambal et Webster, 1965, 1966 ; Beh et Atkins, 1967). Das et Krishnaswami (1965) ont réalisé des croisements entre différentes espèces de mûrier et ont observé une vigueur hybride chez les descendants F_1 pour les caractères foliaires. Kuchkarov (1977) a comparé le rendement et la qualité des feuilles entre les hybrides et les parents chez le mûrier. Les hybrides donnent un meilleur rendement et des feuilles de qualité supérieure à ceux de leur parents. Hazama (1968) a obtenu des hybrides présentant des feuilles plus épaisses et un rendement plus élevé que leurs parents (15 % d'augmentation par rapport aux parents).

L'amélioration du mûrier par différentes méthodes de sélection, basées sur la capacité intrinsèque de la plante à répondre à une manipulation appropriée visant à améliorer de manière permanente et à exploiter l'hétérosis et l'hétérobeliosis, n'a pas été exploitée de manière optimale. Cette étude a donc été réalisée afin de déterminer l'amplitude de l'hétérosis et de l'hétérobeliosis pour certains caractères quantitatifs importants en utilisant un groupe génétiquement divers de souches parentales.

Les caractères agronomiques importants des plants de mûrier F_1 pris en compte pour la sélection sont : la hauteur du plant, le nombre de ramifications primaires par plant, le nombre de ramifications secondaires par plant, la distance internodale, le poids des jeunes pousses et le nombre de feuilles par mètre de pousse (Tojyo et Watanabe, 1981 ; Susheelamma et coll., 1988).

MATERIELS ET METHODES

Les matériels choisis pour ce programme de sélection comprennent des variétés introduites, des races indigènes et des souches sélectionnées. Pour cette étude, six cultivars mâles (S13, S3, S34, S135, Ber-S799 et S29) et six cultivars femelles (S36, S56, Ber-S1, S28, Local et Kanva 2 ou "K2"), ont été retenus comme parents. Ces douze parents sont génétiquement divergents et appartiennent aux espèces *Morus indica* L. ou *Morus alba* L. Ils ont été sélectionnés sur la base des principaux caractères quantitatifs contribuant au rendement en feuilles et des caractères qualitatifs contribuant à la qualité des feuilles (Tableau I). Douze croisements unidimensionnels ont été réalisés entre ces parents et les fruits ont été récoltés. Les graines ont été séparées des fruits et les plantules ont été mises en culture. Les cinq descendants F_1 les plus prometteurs de chacun des croisements ont été isolés visuellement. Les descendants F_1 isolés et leurs parents ont été plantés selon une configuration de réseau avec quatre réplicats. Les données sur huit caractères quantitatifs importants ont été relevées chez les hybrides et chez les parents. Elles ont été enregistrées et analysées statistiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les parents utilisés dans ce programme d'amélioration présentent une forte variabilité pour les principaux caractères considérés. La germination des graines et le pourcentage de plantules ayant survécu après 60 jours sont maximaux chez le croisement $S54 \times S34$ (85,25 %) et minimaux chez $S36 \times S13$ (48,69 %) (Tableau II).

La comparaison des douze croisements avec les valeurs parentales pour l'hétérosis et l'hétérobeliosis révèle que les hybrides des croisements $S28 \times \text{Ber-S799}$, $\text{Ber-S1} \times S13$, $K2 \times \text{Ber-S799}$, $K2 \times S3$, $S36 \times \text{Ber-S799}$ et variété locale $\times S3$ surpassent leurs parents pour ce qui concerne la hauteur du plant avec une hétérosis positive et significative par rapport au parent moyen et au meilleur parent (Tableau III). Des résultats similaires ont été obtenus par Kirby et Atkins (1968), Kambal et Abu-El-Gasim (1976) et Nayeem et Bapat (1984) chez le sorgho et par Coffman et Davis (1976) chez l'avoine. Une hétérosis négative pour la hauteur du plant s'exprime lorsque les deux parents sont plus grands (Tableau III). Chez le croisement dans lequel le parent femelle est plus grand que le parent mâle, on observe des niveaux élevés d'hétérosis et d'hétérobeliosis. Cette observation indique que le parent femelle joue un rôle important dans la hauteur du plant. Sur les 60 hybrides des douze croisements évalués, les hybrides de $\text{Ber-S1} \times S13$ produisent des plants très grands. Le pourcentage d'hétérosis chez les 60 hybrides varie de 23,24 à 27,79 par rapport à la valeur du parent

moyen pour la hauteur du plant (Fig. 1) et de 12,50 à 40,00 par rapport à la valeur du meilleur parent (Fig. 2).

L'évaluation des hybrides des 12 croisements par rapport à leurs parents pour ce qui concerne le nombre de ramifications primaires et secondaires révèle que les hybrides des croisements variété locale $\times$ S3, variété locale $\times$ S135, S28 $\times$ S29, S54 $\times$ S34 et Ber-S1 $\times$ S13 produisent un plus grand nombre de ramifications primaires et secondaires que les deux parents. Ceci confirme les résultats de Dixit (1976) chez le sorgho grenu, Deokar et Patil (1979) chez le carthame et Susheelamma et coll. (1988) chez le mûrier qui ont tous observé que le nombre de ramifications primaires et secondaires était plus élevé chez les hybrides que chez les parents. Le pourcentage d'hétérosis par rapport au parent moyen et au meilleur parent est représenté dans les figures 1 et 2. Chez le croisement Ber-S1 $\times$ S13, S13 a été utilisé comme parent mâle afin d'augmenter le nombre de feuilles par mètre de pousse et, conformément aux estimations, les hybrides ont donné une hétérosis positive par rapport aux valeurs du parent moyen et du parent meilleur. Des observations similaires ont été faites par Joglekar et coll. (1960), Liang (1967), Kirby et Atkins (1968) et Vasudev Rao et Goud (1976) chez le sorgho, pour lequel ils ont constaté une hétérobeltiosis significativement supérieure pour le nombre de feuilles chez les hybrides.

L'évaluation des hybrides des 12 croisements par rapport à leurs parents révèle que les hybrides de S36 $\times$ S13, S28 $\times$ Ber-S799, Ber-S1 $\times$ S13 et S28 $\times$ S13 produisent davantage de feuilles par mètre de pousse que leurs parents (Tableau III). Cette observation concorde avec les résultats de Kirby et Atkins (1968) chez le sorgho grenu. De plus, les différences observées sont significatives (Tableau IV), ce qui indique une amélioration chez les hybrides par rapport aux parents. Les hybrides de S28 $\times$ Ber-S799, Ber-S1 $\times$ S13, S28 $\times$ S29 et S29 $\times$ Ber-S799 surpassent leurs parents moyens et leurs parents meilleurs pour l'épaisseur de la cuticule. Cette observation confirme les résultats précédents de Susheelamma et coll. (1988) chez le mûrier. L'analyse de variance fait apparaître des différences significatives entre les parents et les hybrides pour ce caractère (Tableau IV). Les hybrides de Ber-S1 $\times$ S13 donnent une hétérosis et une hétérobeltiosis significatives et positives. Le parent femelle contribue donc de manière significative à l'amélioration de l'épaisseur de la cuticule chez les hybrides.

Les hybrides de S28 $\times$ S13, S28 $\times$ S29, S28 $\times$ Ber-S799, S36 $\times$ Ber-S799 expriment une hétérosis positive et significative par rapport à leurs parents moyens et à leurs parents meilleurs pour l'épaisseur totale de la feuille (Tableau III). Chez tous les croisements utilisant S28 comme parent femelle (Tableau I), l'amélioration de l'épaisseur de la feuille est maximale. Ceci indique clairement que le parent femelle joue un rôle dominant. Parmi les différents croisements évalués pour le rapport parenchyme palissadique sur parenchyme spongieux, les hybrides de S28 $\times$ Ber-S799, S28 $\times$ S29, S54 $\times$ S34 expriment une hétérosis maximale par rapport à leurs parents moyens et à leurs meilleurs parents (Tableau III).

CONCLUSION

L'analyse de variance pour les caractères considérés ici prouve clairement que les hybrides sont plus productifs que leurs parents. Les combinaisons S28 $\times$ S13 et S28 $\times$ Ber-S799 donnent une hétérosis sensible pour tous les caractères étudiés. Ceci suggère que la sélection hétérotypique utilisant ces combinaisons pourrait être appliquée à grande échelle.

MULBERRY MYCORRHIZA ASSOCIATION — AN EFFECTIVE TOOL TO IMPROVE LEAF NUTRITION

M. THIRIPURASUNDARI & M. VIVEKANANDAN

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

Mycorrhizal infection in different mulberry varieties grown in alkaline soil (pH 8.0) was quantified. The highest percentage of infection occurred in MR-2, Gosoerami, and Tr-4, whereas infection was lowest in Ichinose, Roso and Local. The levels of phosphate were found to be highest in MR-2 and Tr-4, and least in Tr-10 and Local. It is suggested that mulberry mycorrhizal association may result in mobilisation, translocation and supply of phosphorus. Therefore, to improve the quality of mulberry leaves, a good understanding of the symbiotic association between mulberry and mycorrhiza is essential. Further, exploitation of this symbiotic association depends on the use of efficient strains of mycorrhiza to improve the quality of mulberry leaves with little input of fertilizer.

Keywords: Mulberry, mobilisation of phosphorus, mycorrhizal infection.

INTRODUCTION

Mulberry has become an important cash crop for sericultural farmers. Since the silkworm, *Bombyx mori*, is a monophagous insect, it selectively feeds on mulberry leaves, which contain all of the following three factors, viz., olfactory attractants, biting and swallowing factors. Therefore, the production of good quality leaves with superior nutrition is of utmost concern for the generation of healthy cocoons. Like many other crop plants, mulberry also requires the application of a good set of fertilization practices. However, in recent times, particularly in developing countries like India, the cost of fertilizers has already soared far beyond the reach of poor farmers. Therefore, to mitigate the cost of fertilizer input, the application of biofertilizers is resorted to as for rice and other cereal crops. This involves the use of *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, phosphobacteria, and mycorrhiza.

Indian soil, in particular, is mostly deficient in nitrogen and phosphorus (P). Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (VAMF) are ubiquitous and form obligate symbiotic associations with most families of plants. VAMF have been shown to be beneficial to plants in better utilization of soil phosphorus (Baylis, 1967; Gerdeman, 1968; Mosse, 1977), biological control of root pathogens (Schoenbeck and Dehne, 1979), drought resistance (Powell and Bagyaraj, 1984) and uptake of mineral elements (Gerdeman, 1975; Sukhada, 1988). Although plant mycorrhizal association is considered to be the current field of interest in bio-fertilizer technology, little or no information is available on VAMF-mulberry association and its impact on nutrient mobilization and uptake by plants (Katiyar *et al.*, 1989). In the present study mulberry varieties growing in alkaline soil were examined to find out which variety successfully harbours mycorrhiza, an effective mobilizer and supplier of P to the plant kingdom. Fourteen varieties of mulberry were screened for the presence of VAMF in the root, the percentage of cells infected, and the determination of phosphorus levels.

Although mulberry is quite successfully and luxuriantly grown in soils of around pH 6.5, the present study clearly proves that mulberry can be grown successfully in alkaline soil with effective colonization of mycorrhiza.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry varieties were grown during April-June, 1992, in garden soil having the following NPK values and physical properties: N₁₀₅, P₂₀, and K₅₀₀ kg/acre, pH 8.0, EC 0.12 mS cm⁻¹. For screening of mycorrhizal infection in mulberry, up to 14 varieties (MR-2, Gosoerami, Tr-4, Tr-10, Tr-8, Roso, Local, BC2-59, S-54, C-1, C-20, M-5, Ichinose, Kosen) were used. For assessment of mycorrhizal colonization, fine roots were collected, washed, cleared and differentially stained with 0.05% trypan blue in lactophenol following the method of Phillips and Hayman (1970). Root segments mounted on microscope slides in clear lactophenol were examined under a Nikon microscope (40×) for endomycorrhizal root structures, vesicles, arbuscules and hyphae. The percentage of infection per root segment (about 5 mm) was computed by a slide technique using the following formulae of Daft and Nicolson (1966) and Read *et al.* (1976), respectively:

$$\% \text{ of infection} = \frac{\text{Number of cells infected}}{\text{Total number of cells observed}} \times 100$$

$$\% \text{ of infection} = \frac{\text{Number of infected segments}}{\text{Total number of segments examined}} \times 100$$

Determination of phosphate:

A known quantity of root/leaf samples was digested with 0.8 ml 60% perchloric acid. After digestion, a known aliquot of sample was taken to which 2.4 ml ammonium molybdate reagent along with 2.4 ml reducing agent diluted 1:12 were added. The tubes were heated in a boiling water bath for 10 minutes, cooled and the absorbance was read at 830 nm using KH₂PO₄ as the standard.

RESULTS AND DISCUSSION

The present work examines the possibility of mulberry mycorrhizal association as an effective tool to improve the quality of mulberry leaves using 14 mulberry varieties which were grown in alkaline soil (pH 8.0). Upon examination of root segments using the slide technique of Daft and Nicolson (1966) and Read *et al.* (1976), we found all of the mulberry varieties to be infected. It is evident from this study that, even in alkaline soil, mulberry varieties could be infected with mycorrhiza. We also observed mycorrhizal spores in the rhizosphere regions of several mulberry varieties (Das *et al.*, 1990; Thiripurasundari and Vivekanandan, 1991). Having ascertained mycorrhizal infection, the percentage of infection was calculated, based on the number of root segments/cells infected in each mulberry variety; the data are presented in Table I. The percentage of infection calculated on the basis of root segment was always higher than the one based on cellular infection in a given segment. Mulberry varieties like MR-2, Gosoerami, Tr-4, S-54 and M-5 were found to be heavily infected, whereas, the least infection was observed in the Local mulberry variety.

The percentage of infection as indicated in Table I was highest in MR-2, which was recommended for wider cultivation in Tamil Nadu, India, under irrigated conditions (Thangamani and Vivekanandan, 1984). It is not clear from the present study why in certain varieties the percentage of infection was so low, while in certain others the infection was higher. It is not known either what causes the specificity by which a few mulberry varieties are preferentially colonized by mycorrhiza. It is well known that the root exudates of millets contain high levels of organic compounds, reducing sugars and amino-nitrogen which may serve as chemoattractants for microbes such as *Azospirillum* and *Azotobacter* (Venkateswarlu and Rao, 1985) but whether these are involved in mulberry is unknown. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (VAMF) are ubiquitous and form obligate symbiotic associations with most families of plants. Generally, VAMF are not host-specific, although they exhibit some host preferences (Hetrick, 1984; Hetrick *et al.*, 1985). In recent times, substantial interest has been generated in VAMF because of its vast potential to mobilize P from impoverished soils and supply it to the host. The importance of VAMF for absorption of this element was initially indicated by the work of Baylis (1967) and Gerdemann (1968). The value of these mycorrhizae for

phosphate nutrition of plants in deficient environments may rival that of *Rhizobium* (Sanders and Tinker, 1973). Sanders and Tinker (1971) and Hayman and Mosse (1972) have shown that the external mycelium of the endophyte acts as an absorbing network exploring the soil beyond the roots. The experiments of Labanow (1960) clearly demonstrated the greater powers of accumulation of phosphate by mycorrhizal roots than by non-mycorrhizal roots. This seems to suggest that the former are more adapted to compete with the other organisms of the silk for this nutrient.

Table I. Mycorrhizal infection in different mulberry varieties.

Tableau I. Infection mycorrhizienne chez différentes variétés de mûrier.

Sl no.	Mulberry varieties	% of infection / % d'infestation	
		No. of segments infected	No. of cells infected
N° de série	Variétés de mûrier	Nombre de segments infestés	Nombre de cellules infestées
1	MR-2	100	16.22
2	Gosocrami	100	15.85
3	Tr-4	100	15.56
4	S-54	91	15.05
5	M-5	91	14.47
6	C-20	91	12.20
7	Tr-10	81	9.94
8	Kosen	81	9.28
9	BC2-59	81	8.69
10	C-1	80	8.38
11	Tr-8	80	7.98
12	Ichinose	71	7.13
13	Roso	70	7.11
14	Local	70	5.81

Means of 5 different experiments / Moyennes de 5 expériences.

Since mycorrhizal association is known to improve the P nutrition of plants, interest was evinced to determine the levels of P in both the root and leaf of different mulberry varieties. A few mulberry varieties with higher and lower levels of VAMF infection were used for this study, as indicated in Table II. The percentage of phosphate was higher in MR-2 and Tr-4 (3.3%), whereas in varieties like BC2-59, M-5 and Tr-10 the percentage of phosphate was about 1.5. The local mulberry variety showed the lowest percentage of phosphate (1.16%).

It may be of interest to note here that mycorrhizal fungi may be a significant factor in soils of low fertility (Nicolson, 1967). It was once thought that VAMF supplied phosphorus to the host plant; however, uptake of other nutrients such as Zn, Ca, Mg, Fe, S, Co and Cu was also shown to be enhanced by VAMF infection (Cooper and Tinker, 1981; Mosse *et al.*, 1976). Nitrogen, no doubt, is important and the vital element for increased production of good quality leaves. From that time onwards the nitrogen theory of mycorrhizae in legumes has been shown to aid in phosphorus nutrition (Munns and

Mosse, 1980) and to increase nodulation and nitrogen fixation of host species. Asai (1944) suggested that mycorrhizae were a necessary condition for effective nodulation in many species. Crush (1974) and Daft and Elgiahmi (1974) found that nitrogen, phosphorus and the concentration of leghaemoglobin had higher increases in mycorrhizal nodulated plants than in the non-mycorrhizal ones. These findings are further supported by the observation that only mycorrhizal plants of *Trifolium*, *Stylosanthes* and *Centrosema* spp. were able to nodulate in severely phosphorus-deficient soils. Whether mycorrhizae fix nitrogen or not, despite a few early reports that they do, they are excellent scavengers for soil nitrogen (Schramm, 1966).

Table II. Phosphate levels in roots and leaves of selected mulberry varieties.

Tableau II. Teneurs en phosphate dans les racines et les feuilles des variétés de mûrier sélectionnées.

Mulberry varieties	Root (% dry weight)	Leaf (% dry weight)
Variétés de mûrier	Racine (% de poids sec)	Feuille (% de poids sec)
MR-2	1.8	3.28
Tr-4	1.6	3.20
BC2-59	1.2	1.56
M-5	1.2	1.56
Tr-10	0.9	1.28
Local	0.7	1.16

Means of 3 different experiments / Moyennes de 3 expériences.

Exploitation or management of mulberry mycorrhizal symbiosis should be considered extremely important because it is this interaction that determines the final outcome in terms of quality leaf production in mulberry with reduced fertilizer input at a low cost.

REFERENCES

- ASAI T. (1944) Über die Mycorrhizenbildung der Leguminosen Planzen. Japan J. Bot., 13, 463-485.
 BAYLIS G.T.S. (1967) Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizae. New Phytol., 106, 717-725.
 COOPER K.M., TINKER P.B. (1981) Translocation and transfer of nutrients in VAM. IV Effect of environmental variables on movement of phosphorus. New Phytol., 88, 327-339.
 CRUSH J.R. (1974) Plant growth responses to VAMF growth and nodulation of herbage legumes. New Phytol., 73, 745-746.
 DAFT M.J., NICOLSON T.H. (1966) Effect of *Endogone* mycorrhizae on plant growth. New Phytol., 65, 343-350.
 DAFT M.J., ELGIAHMI A.A. (1974) Effect of *Endogone* mycorrhizae on plant growth. VII. Influences of infection on the growth and nodulation in French bean (*Phaseolus vulgaris*). New Phytol., 73, 1139-1147.

- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GHOSH A., KATIYAR R.S., SURYANARAYANA N., SENGUPTA K. (1990) Search of nitrogen fixing bacteria as biofertilizer for mulberry. CSR&TI News Letter, 5-5.
- GERDEMAN J.W. (1968) Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. Ann. Rev. Phytopathol., 6, 397-418.
- GERDEMAN J.W. (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In The development and function in roots. pp. 575-591. J.G. Torrey and D.T. Clarkson (eds.), Academic Press, New York.
- HAYMAN D.S., MOSSE B. (1971) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Growth of *Endogone* inoculated plants in phosphate deficient soils. New Phytol., 70, 19-27.
- HAYMAN D.S., MOSSE B. (1972) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile P from soil. New Phytol., 71, 41-47.
- HETRICK B.A.D. (1984) Ecology of VAMF. In Vesicular arbuscular mycorrhiza. C.L. Powell and D.J. Bagyaraj (eds.), pp. 35-55.
- HETRICK B.A.D., BLOOMS J., FEYERHEIM S.M. (1985) Root colonization pattern of *Glomus epigaeum* in nine host species. Mycologia, 77, 825-828.
- KATIYAR R.S., DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GHOSH A., SENGUPTA K. (1989) Vesicular-arbuscular mycorrhizal association in mulberry. Current Sci., 58, 461-464.
- LABANOW N.W. (1960) Mykorrhizien der Holzpflanzen. VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, p. 350.
- MOSSE B. (1977) In Exploiting the legume *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. pp. 175-292, J.M. Vincent, A.S. Whitney and E. Boose (eds.), University of Hawaii, Honolulu.
- MOSSE B., POWELL C.L., HAYMAN D.S. (1976) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. IX. Interactions between VAMF, rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. New Phytol., 76, 331-342.
- MUNNS D.N., MOSSE B. (1980) Mineral nutrition of legume crops. In Advance in legume science. R.J. Summerfield, A.H. Bunting (eds.), Kew, Royal Botanic Gardens.
- NICOLSON (1967) Vesicular-arbuscular mycorrhiza, a universal plant symbiosis. Sci. Prog. Oxford, 55, 561-581.
- PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc., 55, 158-161.
- POWELL C.L., BAGYARAJ D.J. (1984) Why all interest? In Va-mycorrhiza. C.L. Powell and D.J. Bagyaraj (Eds.), Florida, CRC Press.
- READ D.J., KOU CHEKI H.K., HODGSON J. (1976) Vesicular-arbuscular mycorrhizae in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. New Phytol., 77, 641-653.
- SANDERS F.E., TINKER P.B.H. (1971) Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizae. Nature, 233, 278-279.
- SANDERS F.E., TINKER P.B.H. (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pestic. Sci., 4, 385-395.
- SCHRAMM J.R. (1966) Plant colonization studies on the wastes from anthracite minings in Pennsylvania. Trans. Philos. Soc., 56(1), 1194.
- SCHOENBECK F., DEHNE H.W. (1979) The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. IV. Fungal parasitism on aerial plant parts. Z. Pflkrankh. Pflpath. Pflschutz., 86, 103-112.
- SUKHADA K. (1988) First Asian Conference on Mycorrhizae. Madras, p. 34 (abstr.).
- THANGAMANI R., VIVEKANANDAN M. (1984) Physiological studies and leaf nutrient analysis in the evaluation of best mulberry variety. Sericologia, 24(3), 317-324.
- THIRIPURASUNDARI M., VIVEKANANDAN M. (1991) Exploitation of polluted soils for stress tolerant microbes as efficient strains of biofertilizers. IXth Symposium of FAOB, Hong Kong, Dec., p. 15-18.
- VENKATESWARLU B., RAO A.V. (1985) Interactions between the root exudates of pearl millet and *Azospirillum brasilense*. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.), 95, 237-245.

ASSOCIATION DES MYCORRHIZES ET DU MURIER, UN OUTIL EFFICACE POUR L'AMELIORATION DE LA NUTRITION FOLIAIRE

M. THIRIPURASUNDARI & M. VIVEKANANDAN

School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli - 620 024, Tamil Nadu, Inde.

Nous avons mesuré l'infestation par les mycorrhizes de différentes variétés de mûrier cultivées en sol alcalin (pH 8,0). Le pourcentage maximal d'infestation a été relevé chez MR-2, Gosoerami et Tr-4 ; tandis que l'infestation est minimale chez Ichinose, Roso et la variété locale. Les teneurs en phosphate sont maximales chez MR-2 et Tr-4 et minimales chez Tr-10 et la variété locale. Nous suggérons que l'association des mycorrhizes avec le mûrier peut permettre la mobilisation, la translocation et l'apport de phosphate. Aussi, pour améliorer la qualité des feuilles de mûrier, est-il essentiel de comprendre l'association symbiotique entre le mûrier et les mycorrhizes. De plus, l'exploitation de cette association symbiotique dans l'amélioration de la qualité des feuilles de mûrier et avec un apport minimal d'engrais dépend de l'utilisation de souches efficaces de mycorrhizes.

INTRODUCTION

Le mûrier est devenu une culture de rapport importante pour les sériciculteurs. Le ver à soie *Bombyx mori* est un insecte monophage ; il se nourrit essentiellement de feuilles de mûrier qui contiennent les trois facteurs suivants : attractants olfactifs, attractants de mastication et de déglutition. La production de feuilles de qualité nutritive supérieure est donc indispensable pour obtenir des cocons sains. Comme de nombreuses autres plantes cultivées, le mûrier nécessite l'application d'un ensemble de méthodes d'amendement appropriées. Cependant, depuis quelques années, le coût des engrais, particulièrement dans les pays en voie de développement comme l'Inde, est devenu trop élevé pour les paysans défavorisés. Aussi fait-on appel à l'utilisation d'engrais biologiques afin de réduire le coût de l'amendement dans la culture du riz et d'autres céréales. Ceci implique l'utilisation d'*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, des phosphobactéries et des mycorrhizes.

Le sol indien est déficitaire en azote et en phosphore (P). Les champignons mycorrhizes vésiculaires-arbusculaires (VAMF) sont ubiquistes et forment des associations symbiotiques avec la plupart des familles de végétaux. Les VAMF ont une action positive sur les plantes ; ils permettent une meilleure utilisation du phosphore contenu dans le sol (Baylis, 1967 ; Gerdeman, 1968 ; Mosse, 1977), facilitent la lutte biologique contre les agents pathogènes des racines (Shoenbeck et Dehne, 1979), favorisent la résistance à la sécheresse (Powell et Bagyaraj, 1984) et l'ingestion des éléments minéraux (Gerdeman, 1975 ; Sukhada, 1988). Bien que la technologie des engrais biologiques s'intéresse particulièrement à l'association des mycorrhizes avec les végétaux, on dispose de très peu d'informations sur l'association VAMF-mûrier et sur son impact sur la mobilisation des éléments nutritifs et sur leur ingestion par les végétaux (Katiyar et coll., 1989). Dans cette étude, des variétés de mûrier cultivées en sol alcalin ont été examinées afin de déterminer lesquelles tiraient profit des mycorrhizes qui constituent un moyen efficace pour mobiliser et fournir du P dans le monde végétal. Quatorze variétés de mûrier ont été sélectionnées afin de déterminer la présence des VAMF dans la racine, le pourcentage d'infestation et la teneur en phosphore.

Bien que le mûrier donne d'assez bons résultats lorsqu'il est cultivé dans des sols de pH 6,5, cette étude montre clairement que le mûrier peut également être cultivé en sol alcalin lorsqu'il y a colonisation efficace par les mycorrhizes.

MATERIELS ET METHODES

Les variétés de mûrier ont été cultivées d'avril à juin 1992 dans des plantations dont le sol présentait les valeurs NPK et les propriétés physiques suivantes : N₁₀₅, P₂₀ et K₅₀₀ kg/acre, pH 8,0, EC 0,12 mS/cm. Pour l'étude de l'infestation des mûriers par les mycorrhizes, on a utilisé un total de 14 variétés (MR-2, Gosoerami, Tr-4, Tr-10, Tr-8, Roso, locale, BC2-59, S-54, C-1, C-20, M-5, Ichinose, Kosen). Pour l'évaluation de la colonisation par les mycorrhizes, des racines fines ont été prélevées, lavées et rincées puis colorées avec du bleu de trypan à 0,05 % dans du lactophénol, suivant la méthode de Phillips et Hayman (1970). Des coupes de racines ont été montées sur des lames dans du lactophénol clair et les structures radiculaires, les vésicules, les arborescences et les hyphes des endomycorrhizes ont été examinées à l'aide d'un microscope Nikon (40 ×). Le pourcentage d'infestation par segment radiculaire (environ 5 mm) a été calculé par photographie selon les formules de Daft et Nicolson (1966) et Read et coll. (1976) données ci-dessous :

$$\% \text{ d'infestation} = \frac{\text{Nombre de cellules infestées}}{\text{Nombre total de cellules observées}} \times 100$$

$$\% \text{ d'infestation} = \frac{\text{Nombre de segments infestés}}{\text{Nombre total de segments observés}} \times 100$$

Détermination du phosphate :

Une quantité connue d'échantillons de feuilles et/ou racines a été digérée avec 0,8 ml d'acide perchlorique à 60 %. Après digestion, une aliquote d'échantillon déterminée a été prélevée et additionnée de 2,4 ml de réactif molybdate d'ammonium et de 2,4 ml d'agent réducteur dilué à 1:12. Les éprouvettes ont été chauffées dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes, puis réfrigérées et la densité optique a été mesurée à 830 nm, avec KH₂PO₄ comme standard.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude vise à déterminer si l'association des mycorrhizes avec le mûrier peut constituer un outil efficace pour améliorer la qualité des feuilles de mûrier en utilisant 14 variétés de mûrier cultivées en sol alcalin (pH 8,0). L'examen des segments radiculaires selon la technique de Daft et Nicolson (1966) et de Read et coll. (1976) révèle que toutes les variétés de mûrier sont infestées. Cette étude montre clairement que, même en sol alcalin, les variétés de mûrier peuvent être infestées par les mycorrhizes. Nous avons également observé des spores de mycorrhize dans la rhizosphère de plusieurs variétés de mûrier (Das et coll., 1990 ; Thiripurasundari et Vivekanandan, 1991). Après confirmation de l'infestation par les mycorrhizes, le pourcentage d'infestation a été calculé sur la base du nombre de segments/cellules radiculaires infesté(e)s chez chaque variété de mûrier ; les données sont présentées dans le tableau I. Le pourcentage d'infestation calculé d'après le segment radiculaire est toujours plus élevé que celui calculé d'après l'infestation cellulaire dans un segment donné. Les variétés de mûrier MR-2, Gosoerami, Tr-4, S-54 et M-5 sont fortement infestées, tandis que le pourcentage d'infestation minimale a été observé chez la variété de mûrier locale.

Le pourcentage d'infestation, donné dans le tableau I, est maximal chez MR-2, variété qu'il est recommandé de cultiver de manière extensive dans le Tamil Nadu (Inde) en terrain irrigué (Thangamani et Vivekanandan, 1984). Cette étude ne permet pas de déterminer clairement la raison pour laquelle, chez certaines variétés, le pourcentage d'infestation est faible tandis que, chez certaines autres, l'infestation est plus élevée. On ne sait pas non plus ce qui est à l'origine de la spécificité qui entraîne la colonisation préférentielle par les mycorrhizes de certaines variétés de mûrier. On sait que les exsudats radiculaires de millet ont des teneurs élevées en composés organiques, en sucres

réducteurs et en azote aminé qui pourraient servir d'attractants chimiques pour des microbes comme *Azospirillum* et *Azotobacter* (Venkateswarlu et Rao, 1985) mais on ne sait pas si ceux-ci sont impliqués chez le mûrier. Les champignons à mycorrhizes vésiculaires-arbusculaires (VAMF) sont ubiquistes et forment des associations symbiotiques essentielles avec la plupart des familles de végétaux. En règle générale, les VAMF ne sont pas spécifiques de leur hôte bien qu'ils présentent des préférences (Hetrick, 1984 ; Hetrick et coll., 1985). On s'est récemment intéressé aux VAMF en raison de leur capacité élevée à mobiliser le P dans les sols appauvris et à le fournir à leur hôte. L'importance des VAMF dans l'absorption de cet élément a été mise en évidence pour la première fois par les travaux de Baylis (1967) et Gerdemann (1968). La valeur de ces mycorrhizes dans l'alimentation en phosphate des végétaux en milieu défavorable est comparable à celle de *Rhizobium* (Sanders et Tinker, 1973). Sanders et Tinker (1971) et Hayman et Mosse (1972) ont montré que le mycélium externe de l'endophyte agit comme un réseau d'absorption en explorant le sol au-delà des racines. Les expériences de Labanow (1960) montrent clairement que les racines infestées de mycorrhizes ont une capacité d'absorption du phosphate supérieure à celle des racines non infestées. Ceci suggère que les racines infestées sont mieux adaptées à la lutte contre les autres organismes pour l'absorption de cet élément nutritif.

On sait que l'association avec les mycorrhizes permet d'améliorer la nutrition en P des végétaux, nous avons cherché à déterminer les teneurs en P dans la racine et la feuille de différentes variétés de mûrier. Quelques variétés de mûrier présentant des niveaux faibles et élevés d'infestation par les VAMF ont été utilisées pour cette étude, comme le montre le tableau II. Le pourcentage de phosphate est plus élevé chez MR-2 et Tr-4 (3,3 %) que chez les variétés BC2-59, MR-5 et Tr-10 (1,5 %). La variété de mûrier locale présente le pourcentage de phosphate le plus faible (1,16 %).

Il est intéressant de noter que les champignons à mycorrhizes peuvent constituer un facteur significatif dans les sols à faible fertilité (Nicolson, 1967). On a longtemps pensé que les VAMF alimentaient la plante hôte en phosphore ; cependant, il a été démontré que l'infestation par les VAMF améliorerait également l'absorption d'autres éléments nutritifs comme Zn, Ca, Mg, Fe, S, Co et Cu (Cooper et Tinker, 1981 ; Mosse et coll., 1976). L'azote joue sans aucun doute un rôle important et essentiel dans l'amélioration de la production de feuilles de bonne qualité. Depuis cette époque, il a été prouvé que la présence d'azote de mycorrhizes dans les légumes aidait à l'absorption de phosphore (Munns et Mosse, 1980) et permettait d'augmenter la nodulation et la fixation d'azote chez les espèces hôtes. Asai (1944) a suggéré que les mycorrhizes sont une condition essentielle à la nodulation chez de nombreuses espèces. Crush (1974) et Daft et Elgiahi (1974) ont observé que l'azote, le phosphore et la concentration de leghémoglobine augmentaient davantage chez les plantes à nodules infestés de mycorrhizes que chez les plantes non infestées. Ces résultats sont également confirmés par le fait que seuls les plants infestés de mycorrhizes de *Trifolium*, de *Stylosanthes* et de *Centrosema* spp. sont capables de noduler dans les sols fortement déficitaires en phosphore. Que les mycorrhizes fixent l'azote ou non et malgré quelques études tendant à démontrer qu'ils ont cette capacité, ils constituent un excellent moyen de recherche d'azote dans le sol (Schramm, 1966).

La symbiose mûrier-mycorhize est un facteur qu'il est très important d'exploiter et de gérer car c'est cette interaction qui détermine le résultat final en termes de production de feuilles de qualité chez le mûrier cultivé avec peu d'engrais et à faible coût.

RELATIVE TOLERANCE OF CERTAIN MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) VARIETIES TO NaCl SALINITY

S. RAMANJULU, K. VEERANJANEYULU* & C. SUDHAKAR

Department of Botany, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, India.

*Four varieties of mulberry (*Morus alba* L.), K2, S30, S41 and S54, differed in their salt tolerance when grown under a range of NaCl concentrations. Three-month-old plants were treated with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0% NaCl. Total chlorophyll, chlorophyll a and chlorophyll b, decreased, while carotenoids and anthocyanins were enhanced in the leaves of salt-stressed varieties. The starch and total protein contents were significantly decreased in leaves and roots of all varieties under NaCl salinity. The levels of reducing and non-reducing sugars, total amino acids and proline were significantly increased. The relative reduction or accumulation of these metabolites was found to be salt-concentration dependent. However, the correlation for the per cent change for each parameter was found significant only for the relative tolerance of variety S30. Ranking of these varieties for salt tolerance based on these physiological parameters was in the order, S30 > S41 > S54 > K2. The greater salt tolerance of S30 was associated with accumulation of relatively higher levels of organic osmolytic solutes.*

Keywords: Mulberry, salt tolerance, sugars, amino acids, proline.

INTRODUCTION

Salinity is a common problem for agricultural productivity in many parts of the world and in land areas that have become arid. Differences between cultivars for salt tolerance have been documented (Rush and Epstein, 1976; Kumar, 1984; Ashraf and McNeilly, 1988; Sharma *et al.*, 1990) and offer a potential exploitation of saline soils and water with tolerant varieties. A major determining factor of productivity and profitability in sericulture is the yield of mulberry foliage of different quality which greatly varies under different agroclimatic conditions. Saline problems are generally more pronounced in mulberry gardens of tropical and subtropical regions having black soils (Bose and Sengupta, 1990). A biotic approach to overcome the salinity problem has recently received considerable attention from many workers throughout the world. However, the identification of existing crop varieties that have in-built salt tolerance mechanisms is clearly of considerable value for exploitation of saline soils for agriculture. Although extensive physiological investigations have been conducted in mulberry (Rangaswami *et al.*, 1976; Sikdar *et al.*, 1983; Veeranjaneeyulu and Ranjithakumari, 1989; Ratna Sen *et al.*, 1991), including screening of varieties for rainfed conditions (Dorcus and Vivekanandan, 1991), information regarding the relative levels of salt tolerance among mulberry varieties is lacking. The present investigation has therefore been undertaken to study the physiological responses of certain promising mulberry varieties in order to evaluate which ones have a more salt-tolerant nature.

* Present address: C.R. Photobiophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Quebec, G9A 5H7, Canada.

Table I. Levels of total chlorophyll, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids and anthocyanin pigments in 7-day-NaCl stressed mulberry (*Morus alba* L.) varieties.

Tableau I. Teneurs en chlorophylle totale, en chlorophylle *a*, en chlorophylle *b*, en caroténoïdes et en pigments d'anthocyanine chez des variétés de mûrier (*Morus alba* L.) soumises au stress du NaCl pendant 7 jours.

Parameter Paramètre	Treatment Traîtement	K2	S30	S41	S54
Total chlorophyll (mg g ⁻¹ fresh wt)	Control / Témoin	1.223 ^d	1.068 ^c	1.171 ^c	1.448 ^d
Chlorophylle totale (mg/g poids humide)	0.5%	1.025 ^c	1.015 ^c	1.093 ^c	1.266 ^c
	1.0%	(-16.18)	(-4.96)	(-6.66)	(-12.56)
	2.0%	0.918 ^b	0.922 ^b	0.963 ^b	1.142 ^b
		(-24.93)	(-13.67)	(-17.76)	(-21.13)
		0.698 ^a	0.725 ^a	0.770 ^a	0.874 ^a
		(-42.92)	(-32.11)	(-34.24)	(-39.64)
Chlorophyll <i>a</i> (mg g ⁻¹ fresh wt)	Control / Témoin	0.786 ^d	0.703 ^c	0.689 ^d	0.907 ^d
Chlorophylle <i>a</i> (mg/g poids humide)	0.5%	0.632 ^c	0.663 ^c	0.641 ^c	0.788 ^c
	1.0%	(-19.59)	(-5.68)	(-6.96)	(-14.06)
	2.0%	0.539 ^b	0.549 ^b	0.551 ^b	0.688 ^b
		(-31.42)	(-21.90)	(-20.02)	(-24.97)
		0.417 ^a	0.474 ^a	0.440 ^a	0.532 ^a
		(-46.94)	(-32.57)	(-36.13)	(-41.98)
Chlorophyll <i>b</i> (mg g ⁻¹ fresh wt)	Control / Témoin	0.437 ^d	0.365 ^c	0.482 ^c	0.531 ^d
Chlorophylle <i>b</i> (mg/g poids humide)	0.5%	0.393 ^c	0.352 ^c	0.482 ^c	0.478 ^c
	1.0%	(-10.06)	(-3.56)	(-6.22)	(-9.98)
	2.0%	0.379 ^b	0.328 ^b	0.412 ^b	0.454 ^b
		(-13.27)	(-10.13)	(-14.52)	(-14.50)
		0.281 ^a	0.251 ^a	0.330 ^a	0.342 ^a
		(-35.69)	(-31.23)	(-31.53)	(-35.59)
Carotenoids (µg g ⁻¹ fresh wt)	Control / Témoin	325.00 ^a	352.00 ^a	379.00 ^a	426.00 ^a
Caroténoïdes (µg/g poids humide)	0.5%	382.91 ^b	454.50 ^b	454.80 ^b	512.90 ^b
	1.0%	(+17.82)	(+29.12)	(+20.00)	(+20.40)
	2.0%	447.26 ^c	526.27 ^c	523.02 ^c	590.73 ^c
		(+37.62)	(+49.51)	(+38.00)	(+38.67)
		518.05 ^d	652.96 ^d	672.30 ^d	709.50 ^d
		(+59.40)	(+85.50)	(+77.39)	(+66.55)
Anthocyanins (µg g ⁻¹ fresh wt)	Control / Témoin	12.25 ^a	8.90 ^a	12.10 ^a	14.35 ^a
Anthocyanines (µg/g poids humide)	0.5%	13.30 ^b	13.30 ^b	13.60 ^b	16.30 ^b
	1.0%	(+8.57)	(+49.43)	(+12.39)	(+13.58)
	2.0%	15.30 ^c	16.60 ^c	17.30 ^c	19.50 ^c
		(+24.89)	(+86.51)	(+42.97)	(+35.88)
		20.30 ^d	23.30 ^d	22.60 ^d	26.30 ^d
		(+65.71)	(+161.79)	(+86.77)	(+83.27)

The mean values ($n = 4$) in each column for different parameters followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) from each other according to the DMR (Duncan's multiple range) test. Values in parentheses represent per cent change over control / Les valeurs moyennes ($n = 4$) de chaque colonne pour les différents paramètres suivies d'une même lettre ne varient pas de manière significative ($P < 0.05$) entre elles d'après le test de Duncan. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage de variation par rapport au témoin.

MATERIALS AND METHODS

Six-month-old planting material of four mulberry (*Morus alba* L.) varieties, i.e., K2, S30, S41 and S54, was procured from the Regional Sericultural Research Station, Anantapur, India. The cuttings were prepared by the procedure described by Krishnaswami (1978) and immediately planted in earthen pots (50 cm × 50 cm) containing 20 kg of red loamy soil and farmyard manure in proportion of 3:1. Four replications were carried out. The potted cuttings were watered once a day. The pots were kept under natural photoperiod of about 12-14 hr with a temperature of about $28 \pm 4^\circ\text{C}$ in the botanical garden.

After one month, the sprouted cuttings were thinned to three per pot, with a distance of 30 cm in a triangular arrangement. Three-month-old plants were subjected to salt stress induced by NaCl. Four levels of NaCl, 0.0 (control), 0.5, 1.0 and 2.0%, were used. Electrical conductivity (EC) of soil saturation extracts was 1.70, 2.0, 4.0 and 7.8 m mhos/cm², respectively. The pots were managed under salt stress conditions for 7 days and during the stress period care was taken to avoid the leaching of the salt solution or drainage from the pot by adding slightly less water than the field capacity. The EC of the soil saturation extracts was measured daily and adjusted to the respective conductivity level. The plants were uprooted carefully on day 7 after imposition of the salt stress. Leaves and roots were separated, washed thoroughly and used for biochemical analysis. Chlorophyll pigments (Arnon, 1949), carotenoids (Goodwin, 1954), anthocyanins (Moncinielli *et al.*, 1975), total protein (Lowry *et al.*, 1951) total amino acids (Moore and Stein, 1948) and proline (Bates *et al.*, 1973) were quantified in the fresh material.

Reducing sugars were estimated by the method of Nelson (1944) as modified by Somogyi (1952) in an alcoholic extract of oven-dried material. Levels of non-reducing sugars were estimated (Scott, 1960) from the neutralised alcoholic extract. Starch was estimated according to McCready (1960) by using an anthrone reagent.

RESULTS AND DISCUSSION

The total chlorophyll content decreased significantly in the four varieties at all stress levels except in S30 at the 0.5% level (2.0 m mhos/cm²) (Table I). The per cent inhibition was relatively lower in variety S30 and greater in K2. Sharma *et al.* (1990) showed that the magnitude of decrease in total chlorophyll content was greater in salt-sensitive than in salt-tolerant cultivars of chickpea under saline conditions. Similarly, variety S30 showed a lesser degree of inhibition in chlorophyll content than the other varieties, indicating its relative tolerance to salt. The inhibitory effect of salinity on chlorophyll may either be due to enhanced chlorophyllase activity or to interference of salt ions with *de novo* synthesis of proteins, the structural components of chloroplasts (Rao and Rao, 1981). The levels of carotenoids were significantly elevated in all the varieties under NaCl salinity.

The accumulation of anthocyanins in response to salt stress has been reported and attributed to the improved resistance to toxic effects of salts (Strogonov, 1973). The levels of anthocyanins significantly increased in all the stressed varieties; however, a greater accumulation was found in variety S30 (Table I), which further reveals its relative salt tolerance.

A wide range of mechanisms for maintaining turgor by osmotic adjustment occur in plants under stress conditions. One of these is the accumulation of important organic osmolytes such as sugars (Sacher and Staples, 1985) and amino acids, including substantial levels of proline (Cusido *et al.*, 1987; Sharma *et al.*, 1990).

The role of accumulated sugars under salt stress has been emphasized by several investigators (Sacher and Staples, 1985; Sudhakar *et al.*, 1987). Reducing and non-reducing sugars significantly accumulated in the leaves and roots of mulberry varieties under NaCl salinity (Table II). The magnitude of increase in reducing and non-reducing sugars varied among the varieties and was found to be concentration-dependent. The per cent accumulation of sugars was greater in variety S30 compared to other varieties. The starch content gradually declined with increment in salinity, and the decrease in starch content was comparatively lower in variety S30 (Table IV). These results are concomitant with those of Sharma *et al.* (1990) who reported that the degree of reduction in starch content was less in the tolerant than in the sensitive cultivars of chickpea. The higher levels of sugars

Table II. Levels of reducing and non-reducing sugars in the leaves and roots of 7-day-NaCl stressed mulberry (*Morus alba* L.) varieties.

Tableau II. Teneurs en sucres réducteurs et non réducteurs dans les feuilles et les racines des variétés de mûrier (Morus alba L.) soumises au stress du NaCl pendant 7 jours.

Organ Organe	Treatment Traitement	K2	S30	S41	S54
Reducing sugars (mg g ⁻¹ dry wt) / Sucres réducteurs (mg/g poids sec):					
Leaves Feuilles	Control / Témoin	8.72 ^a	10.90 ^a	8.02 ^a	7.65 ^a
	0.5%	8.93 ^a (+2.40)	11.27 ^a (+3.39)	8.27 ^a (+3.10)	7.88 ^a (+3.00)
	1.0%	9.36 ^b (+7.33)	11.95 ^b (+9.66)	8.77 ^b (+9.35)	8.27 ^b (+8.10)
	2.0%	10.59 ^c (+21.44)	13.92 ^c (+27.74)	10.19 ^c (+27.05)	9.55 ^c (+24.83)
Root Racine	Control / Témoin	2.003 ^a	2.026 ^a	2.141 ^a	2.137 ^a
	0.5%	2.076 ^a (+3.69)	2.122 ^a (+4.76)	2.262 ^a (+5.65)	2.221 ^a (+3.96)
	1.0%	2.326 ^b (+16.12)	2.547 ^b (+25.71)	2.578 ^b (+20.41)	2.561 ^b (+19.84)
	2.0%	2.953 ^c (+47.42)	3.108 ^c (+53.40)	3.271 ^c (+52.77)	3.224 ^c (+50.86)
Non-reducing sugars (mg g ⁻¹ dry wt) / Sucres non réducteurs (mg/g poids sec):					
Leaf Feuille	Control / Témoin	31.80 ^a	34.04 ^a	30.14 ^a	34.16 ^a
	0.5%	33.48 ^a (+5.28)	36.66 ^a (+7.69)	32.32 ^a (+7.23)	36.50 ^a (+6.85)
	1.0%	41.14 ^b (+29.37)	44.40 ^b (+30.43)	38.78 ^b (+28.66)	42.38 ^b (+24.06)
	2.0%	55.66 ^c (+75.03)	61.86 ^c (+81.72)	54.52 ^c (+80.88)	57.90 ^c (+69.49)
Root Racine	Control / Témoin	6.058 ^a	6.635 ^a	6.897 ^a	7.023 ^a
	0.5%	6.419 ^a (+5.97)	7.267 ^b (+9.54)	7.511 ^b (+8.91)	7.600 ^b (+8.23)
	1.0%	7.909 ^b (+30.57)	9.113 ^c (+37.36)	9.317 ^c (+35.10)	9.352 ^c (+33.17)
	2.0%	9.352 ^c (+54.38)	10.783 ^d (+62.53)	11.143 ^d (+61.57)	11.180 ^d (+59.20)

The mean values ($n = 4$) in each column for different parameters followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) from each other according to the DMR test. Values in parentheses represent per cent change over control.

Les valeurs moyennes ($n = 4$) de chaque colonne pour les différents paramètres suivies d'une même lettre ne varient pas de manière significative ($P < 0.05$) entre elles d'après le test de Duncan. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage de variation par rapport au témoin.

Table III. Levels of amino acids and proline in the leaves and roots of 7-day-NaCl stressed mulberry (*Morus alba* L.) varieties.

Tableau III. Teneurs en acides aminés et en proline dans les feuilles et les racines des variétés de mûrier (*Morus alba* L.) soumises au stress du NaCl pendant 7 jours.

Organ Organe	Treatment Traîtement	K2	S30	S41	S54
Amino acids (mg g ⁻¹ fresh wt) / Acides aminés (mg/g poids humide):					
Leaf Feuille	Control / Témoin	0.888 ^a	0.750 ^a	0.786 ^a	0.854 ^a
	0.5%	1.005 ^b (+13.17)	0.875 ^b (+16.70)	1.015 ^b (+15.45)	0.977 ^b (+14.45)
	1.0%	1.168 ^c (+31.53)	1.023 ^c (+36.50)	1.060 ^c (+34.90)	1.140 ^c (+33.48)
	2.0%	1.390 ^d (+56.60)	1.243 ^d (+65.75)	1.273 ^d (+62.00)	1.374 ^d (+60.99)
Root Racine	Control / Témoin	0.275 ^a	0.280 ^a	0.264 ^a	0.283 ^a
	0.5%	0.317 ^b (+15.60)	0.339 ^b (+18.25)	0.306 ^b (+15.95)	0.327 ^b (+15.80)
	1.0%	0.428 ^c (+55.81)	0.476 ^c (+70.21)	0.444 ^c (+68.25)	0.452 ^c (+60.00)
	2.0%	0.563 ^d (+105.00)	0.649 ^d (+132.10)	0.549 ^d (+125.08)	0.606 ^d (+114.38)
Proline (µg g ⁻¹ fresh wt) / Proline (µg/g poids humide):					
Leaf Feuille	Control / Témoin	16.48 ^a	31.90 ^a	19.52 ^a	18.83 ^a
	0.5%	21.75 ^b (+31.97)	51.43 ^b (+61.22)	28.53 ^b (+46.15)	26.50 ^b (+40.73)
	1.0%	33.25 ^c (+101.75)	83.16 ^c (+160.68)	41.25 ^c (+111.32)	37.80 ^c (+100.74)
	2.0%	37.00 ^d (+124.51)	106.00 ^d (+232.28)	56.33 ^d (+188.57)	51.25 ^d (+148.00)
Root Racine	Control / Témoin	13.16 ^a	21.12 ^a	14.00 ^a	14.86 ^a
	0.5%	17.33 ^b (+31.68)	32.50 ^b (+53.88)	20.40 ^b (+45.71)	21.00 ^b (+41.31)
	1.0%	26.80 ^c (+103.64)	51.00 ^c (+141.47)	32.00 ^c (+128.57)	32.00 ^c (+115.34)
	2.0%	34.50 ^d (+162.15)	78.25 ^d (+270.50)	46.10 ^d (+229.28)	41.00 ^d (+175.90)

The mean values (n = 4) in each column for different parameters followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05) from each other according to the DMR test. Values in parentheses represent per cent increase over control.

Les valeurs moyennes (n = 4) de chaque colonne pour les différents paramètres suivies d'une même lettre ne varient pas de manière significative (P < 0.05) entre elles d'après le test de Duncan. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'augmentation par rapport au témoin.

with smaller depletion in starch content of the S30 variety may be attributed to photosynthetic efficiency as ascribed by Kingsbury *et al.* (1985) to tolerant wheat lines under saline conditions.

Table IV. Levels of protein and starch in the leaves and roots of 7-day-NaCl stressed mulberry (*Morus alba* L.) varieties.

Tableau IV. Teneurs en protéines et en amidon dans les feuilles et les racines des variétés de mûrier (*Morus alba* L.) soumises au stress du NaCl pendant 7 jours.

Organ Organe	Treatment Traîtement	K2	S30	S41	S54
Protein content (mg g ⁻¹ fresh wt) / Teneur en protéines (mg/g poids humide):					
Leaf Feuille	Control / Témoin	129.30 ^d	122.00 ^c	134.00 ^c	124.05 ^d
	0.5%	114.81 ^c (-11.20)	112.12 ^c (-8.09)	122.00 ^c (-8.95)	110.65 ^c (-10.80)
	1.0%	98.44 ^b (-23.86)	102.61 ^b (-15.89)	111.61 ^b (-16.70)	98.37 ^b (-20.70)
	2.0%	78.61 ^a (-39.20)	85.57 ^a (-29.86)	92.14 ^a (-31.23)	80.83 ^a (-34.84)
Root Racine	Control / Témoin	89.20 ^d	94.80 ^c	92.45 ^d	83.52 ^d
	0.5%	81.84 ^c (-8.25)	90.85 ^c (-4.17)	86.94 ^c (-4.16)	77.58 ^c (-6.78)
	1.0%	67.33 ^b (-24.51)	74.13 ^b (-21.81)	71.80 ^b (-22.33)	64.21 ^b (-23.12)
	2.0%	54.36 ^a (-39.05)	59.67 ^a (-37.06)	57.22 ^a (-38.10)	50.61 ^a (-39.94)
Starch content (mg g ⁻¹ dry wt) / Teneur en amidon (mg/g poids sec):					
Leaf Feuille	Control / Témoin	69.55 ^c	67.35 ^b	75.25 ^c	69.00 ^c
	0.5%	67.63 ^c (-2.75)	66.79 ^b (-0.82)	74.00 ^c (-1.65)	67.48 ^c (-2.20)
	1.0%	62.80 ^b (-9.70)	64.68 ^b (-3.95)	69.79 ^b (-7.25)	63.13 ^b (-8.50)
	2.0%	54.88 ^a (-21.08)	56.06 ^a (-16.76)	61.64 ^a (-18.08)	55.44 ^a (-19.65)
Root Racine	Control / Témoin	66.10 ^c	65.40 ^b	73.55 ^c	64.65 ^c
	0.5%	64.18 ^c (-2.90)	64.71 ^b (-1.05)	72.26 ^c (-1.75)	63.17 ^c (-2.28)
	1.0%	58.89 ^b (-10.90)	62.77 ^b (-4.01)	67.44 ^b (-8.30)	58.31 ^b (-9.80)
	2.0%	51.29 ^a (-22.40)	53.95 ^a (-17.50)	58.98 ^a (-19.80)	50.71 ^a (-21.55)

The mean values (n = 4) in each column for different parameters followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05) from each other according to the DMR test. Values in parentheses represent per cent decrease over control.

Les valeurs moyennes (n = 4) de chaque colonne pour les différents paramètres suivies d'une même lettre ne varient pas de manière significative (P < 0.05) entre elles d'après le test de Duncan. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage de diminution par rapport au témoin.

Because proteins are the chief organic constituents of plants, they could be expected to play a role in compensatory mechanisms under stress conditions. Salt stress could evoke compensatory metabolic changes through modification and modulation of the quantity and quality of proteins (Ramagopal, 1987). The total protein content gradually declined with stress intensity, with a lower per cent decrease in variety S30 (Table IV). A decrease in protein content along with an increase in the free amino acid pool would suggest an acceleration in protein catabolism as one of the possible physiological compensatory mechanisms under salt stress conditions (Strogonov, 1973).

The levels of free amino acids in the mulberry varieties examined here were significantly elevated (Table III); similar reports have been made by many workers (Sudhakar *et al.*, 1987; Dubey and Manjurani, 1989). A higher accumulation of amino acids in the leaves and roots was observed in variety S30. Rush and Epstein (1976) correlated the salt tolerance of tomato varieties with a greater accumulation of amino acids. A condition of potassium deficiency associated with the increased accumulation of amino acids under salt stress was also observed in the present experiments, similar to the reports of Smith *et al.* (1982).

Proline has been implicated as a compatible osmotic solute under stress conditions (Handa *et al.*, 1986), acting as a protein stabilizing or solubilizing factor (Bogges and Stewart, 1980), and providing a store of nitrogen or respiratory substrate to facilitate post-stress recovery (Aspinall and Paleg, 1981). In the present study proline accumulation was significantly increased in leaves and roots of mulberry varieties under NaCl salinity (Table III), confirming the findings of Chu *et al.* (1976), Dix and Pearce (1981) and Sharma *et al.* (1990). The variety, S30, showed a greater accumulation of proline in the leaves and roots compared to the other varieties studied here. It has been suggested that the capacity of species to accumulate proline is correlated with their salt tolerance (Stewart and Lee, 1974).

From these results, it is clear that the greater accumulation of sugars, amino acids and particularly, proline, in the cytoplasm of plants can be viewed as adaptive feature and forms one of the indices for determining salt tolerance of mulberry varieties. Further, based on these physiological parameters it is concluded that the variety, S30, has a relatively more tolerant nature to NaCl salinity. Based on these results the ranking of these four varieties for salt tolerance was in the order, S30 > S41 > S54 > K2.

REFERENCES

- ARNON D.I. (1949) Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15.
- ASHRAF M., MCNEILLY T. (1988) Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. J. Agro. Crop Sci., 160, 14-21.
- ASPINALL D., PALEG L.G. (1981) Proline accumulation: physiological aspects. In Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Eds: L.G. Paleg and D. Aspinall, Academic Press, New York, 205-241.
- BATES L.S., WALDREN R.P., TEARE I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39, 205-208.
- BOGGESS S.F., STEWART C.R. (1980) The relationship between water stress-induced proline accumulation and inhibition of protein synthesis in tobacco leaves. Plant Sci. Lett., 17, 245-252.
- BOSE P.C., SENGUPTA K. (1990) Problematic soils of tropical mulberry garden and their management. Ed.: A.K. Ganguly, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore.
- CHU T.M., ASPINALL D., PALEG L.G. (1976) Stress metabolism VII. Salinity and proline accumulation in barley. Aust. J. Plant Physiol., 3, 219-225.
- CUSIDO R.M., PALAZON J., ALTABELLA T., MORALES C. (1987) Effect of salinity on soluble protein, free amino acids and nicotine contents in *Nicotiana rustica* L. Plant and Soil, 102, 55-60.
- DIX P.J., PEARCE R.C. (1981) Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. Z. Pflanzenphysiol., 102, 243-248.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. (1991) Screening of mulberry varieties for rainfed conditions. Sericologia, 31(1), 223-241.
- DUBEY R.S., MANJURANI (1989) Salinity induced accumulation of free amino acids in germinating rice seeds differing in salt tolerance. J. Agron. Crop Sci., 163(4), 236-247.

- GOODWIN T.W. (1954) Carotenoids. In Handbook of plant analysis. Eds: K. Peach and M.V. Tracey, Springer Verlag, Berlin, 272-311.
- HANDA S., HANDA A.K., PAUL M.H., RAY A.B. (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.*, 80, 938-945.
- KINGSBURY W.R., EPSTEIN E., PEARCY W.R. (1984) Physiological responses to salinity in selected lines of wheat. *Plant Physiol.*, 74, 417-423.
- KRISHNASWAMY S. (1978) Mulberry cultivation in South India. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Bull. No. 1, 3-4.
- KUMAR D. (1984) The value of certain plant parameters as an index for salt tolerance in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Plant and Soil*, 79, 261-272.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MONCINIELLI A.L., YANG C.H., LINDQUIST P., ANDERSON O.R., RABINO I. (1975) Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. Action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiol.*, 55, 251-257.
- McCREADY R.M., GUGGOLE J., SILVIERA V., OWENS H.S. (1960) Determination of starch and amylase in vegetables. Application to peas. *Anal. Chem.*, 29, 1156-1158.
- MOORE S., STEIN W.H. (1948) Photometric method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 307-318.
- NELSON N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
- RAMAGOPAL S. (1987) Salinity stress induced tissue specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol.*, 84, 324-331.
- RAO G.G., RAO G.R. (1981) Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeonpea (*Cajanus indicus* Spreng.) and gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. *Indian J. Exp. Biol.*, 19, 768, 770.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., SASTRY C.R., JOLLY M.S. (1976) Sericulture Manual, 1. Mulberry cultivation. FAO, Rome.
- RATNA SEN, BENCHAMIN K.V., JOLLY M.S. (1991) Studies on leaf quality under two pruning systems in mulberry. *Indian J. Seric.*, 30(1), 17-22.
- RUSH D.W., EPSTEIN E. (1976) Genotypic responses to salinity: differences between salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of the tomato. *Plant Physiol.*, 57, 162-166.
- SACHER R.F., STAPLES R.C. (1985) Inositol and sugars in adaptation of tomato to salt. *Plant Physiol.*, 77, 206-210.
- SCOTT F.G. (1960) Effect of supraoptimal boron levels on respiration and carbohydrate metabolism in *Helianthus annuus* L. *Plant Physiol.*, 35, 653-661.
- SHARMA K.D., DATTA K.S., VARMA S.K. (1990) Effect of chloride and sulphate types of salinity on some metabolic drifts in chickpea, *Cicer arietinum* L. *Indian J. Exp. Biol.*, 28, 890-892.
- SIKDAR A.K., JOLLY M.S., SUSHEELAMMA B.N., SUBRAMANYAM M.R. (1983) Evaluation of morpho-physiological parameters associated with drought resistance in mulberry. National Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, March 10-13, p. 1.
- SMITH G.S., LAUREN D.R., CORFORTH I.S., AGNEW M.P. (1982) Evaluation of putrescine as a biochemical indicator of the potassium requirement of Lucerne. *New Phytol.*, 91, 419-428.
- SOMOGYI M. (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-24.
- STEWART C.R., LEE J.A. (1974) The rate of proline accumulation in halophytes. *Planta*, 120, 279-289.
- SUDHAKAR C., REDDY P.S., VEERANJANEYULU K. (1987) Biochemical changes during early seedlings growth of horsegram (*Dolichos biflorus* L.) subjected to salt stress. *Indian J. Exp. Biol.*, 25, 479-482.
- VEERANJANEYULU K., RANJITHAKUMARI B.D. (1989) Proline metabolism during water stress in mulberry. *J. Exp. Bot.*, 40, 581-583.

TOLERANCE RELATIVE DE CERTAINES VARIETES DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) A LA SALINITE DUE AU NaCl

S. RAMANJULU, K. VEERANJANEYULU* & C. SUDHAKAR

Department of Botany, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, Inde.

*Quatre variétés de mûrier (*Morus alba* L.), K2, S30, S41 et S54, traitées avec plusieurs concentrations de NaCl, présentent des différences de tolérance à la salinité. Des plants âgés de trois ans ont été traités avec du NaCl à 0,0, 0,5, 1,0 et 2,0 %. La chlorophylle totale (chlorophylle a et chlorophylle b) diminue, tandis que les caroténoïdes et les anthocyanines augmentent chez les feuilles des variétés soumises au stress de la salinité. Les contenus en amidon et en protéines totales diminuent de manière significative chez les feuilles et les racines de toutes les variétés traitées au NaCl. Les teneurs en sucres réducteurs et non réducteurs, en acides aminés totaux et en proline augmentent de manière significative. La réduction relative et/ou l'accumulation de ces métabolites est(sont) liée(s) au taux de salinité. Cependant, la corrélation du pourcentage de variation avec chaque paramètre n'est significative que pour la tolérance relative de la variété S30. Sur la base de ces paramètres physiologiques, le classement de ces variétés par ordre de tolérance à la salinité est le suivant : S30 > S41 > S54 > K2. La tolérance plus grande de S30 est associée à la teneur relativement plus élevée en solutés osmotiques organiques.*

INTRODUCTION

La salinité est un obstacle à la productivité agricole couramment rencontré dans de nombreuses régions du globe et dans les zones en voie de désertification. Les différences de tolérance à la salinité entre cultivars ont été étudiées (Rush et Epstein, 1976 ; Kumar, 1984 ; Ashraf et McNeilly, 1988 ; Sharma et coll. 1990) et permettent d'envisager l'exploitation des sols salins et de l'eau par utilisation de variétés tolérantes. L'un des facteurs déterminants de la productivité et de la rentabilité en sériciculture est le rendement en feuilles dont la qualité varie fortement en fonction des conditions agroclimatiques. Les problèmes causés par la salinité sont généralement plus marqués dans les plantations de mûriers des régions tropicales et subtropicales à terre noire (Bose et Sengupta, 1990). De nombreux chercheurs de différents pays se sont récemment intéressés à l'approche biotique des problèmes liés à la salinité. L'identification de variétés existantes présentant des mécanismes internes de tolérance à la salinité offre un intérêt indéniable pour l'exploitation des sols salins en agriculture. Bien que des études physiologiques approfondies, dont la sélection de variétés adaptées aux conditions pluviales, aient été réalisées chez le mûrier (Rangaswami et coll., 1976 ; Sikdar et coll., 1983 ; Veeranjaneeyulu et Ranjithakumari, 1989 ; Ratna Sen et coll., 1991), il n'existe pas d'informations sur les niveaux relatifs de tolérance à la salinité chez différentes variétés de mûrier. Cette étude a donc été réalisée afin d'étudier les réactions physiologiques de certaines variétés de mûrier prometteuses et d'identifier les variétés ayant une tolérance supérieure à la salinité.

* Adresse actuelle : C.R. Photobiophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel, composé de plants âgés de six mois de quatre variétés de mûrier (*Morus alba* L.) (K2, S30, S41 et S54) a été fourni par la Regional Sericultural Research Station d'Anantapur (Inde). Les boutures ont été préparées selon le protocole décrit par Krishnaswami (1978) et plantées immédiatement dans des pots en terre (50 cm × 50 cm) contenant 20 kg de terre argileuse grasse et de fumier à raison de 3:1. Les boutures en pots ont été arrosées une fois par jour. Les pots ont été placés sous photopériode naturelle d'environ 12 à 14 h à une température de l'ordre de $28 \pm 4^\circ\text{C}$ dans le jardin botanique.

Après un mois, les boutures ayant donné des bourgeons ont été réduites à trois par pot, à une distance de 30 cm selon une configuration triangulaire. Les plants âgés de trois mois ont été soumis au stress de la salinité induit par NaCl. Quatre concentrations en NaCl ont été retenues : 0,0 (témoin), 0,5, 1,0 et 2,0 %. La conductivité électrique (CE) des extraits saturés du sol est respectivement de 1,70, 2,0, 4,0 et 7,8 m mhos/cm². Les pots ont été maintenus en condition de stress pendant 7 jours ; on a pris soin, pendant la période de stress, d'éviter la filtration de la solution saline ou son écoulement du pot en ajoutant une quantité d'eau légèrement inférieure à la capacité du terrain. La CE des extraits saturés du sol a été mesurée quotidiennement et ajustée au niveau de conductivité respectif. Les plants ont été déracinés avec toutes les précautions nécessaires 7 jours après l'administration du stress de salinité. Les feuilles et les racines ont été séparées, lavées soigneusement et utilisées pour l'analyse biochimique. Les chlorophylles (Arnon, 1949), les caroténoïdes (Goodwin, 1954), les anthocyanines (Moncinielli et coll., 1975), les protéines totales (Lowry et coll., 1951), les acides aminés totaux (Moore et Stein, 1948) et la proline (Bates et coll., 1973) ont été mesurés sur le matériel frais.

Les sucres réducteurs ont été évalués selon la méthode de Nelson (1944) modifiée par Somogyi (1952) dans un extrait alcoolique après séchage au four du matériel. Les niveaux de sucres non réducteurs ont été estimés (Scott, 1960) à partir d'un extrait alcoolique neutralisé. L'amidon a été estimé d'après McCready (1960) à l'aide d'un réactif anthrone.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le contenu en chlorophylle totale diminue de manière significative chez les quatre variétés quel que soit le degré de stress, excepté chez S30 à 0,5 % (2,0 m mhos/cm²) (Tableau I). Le pourcentage d'inhibition est relativement faible chez la variété S30 et fort chez K2. Sharma et coll. (1990) ont démontré que l'amplitude de diminution du contenu en chlorophylle totale est plus grande chez les cultivars sensibles à la salinité que chez les variétés tolérantes du pois chiche en milieu salin. De même, la variété S30 présente un degré d'inhibition du contenu en chlorophylle inférieur à celui des autres variétés, ce qui suggère qu'elle est relativement tolérante à la salinité. L'effet inhibiteur de la salinité sur la chlorophylle peut être dû soit à un accroissement de l'activité chlorophyllase, soit à une interférence des ions salés avec la synthèse *de novo* des protéines, composantes structurales des chloroplastes (Rao et Rao, 1981). Les niveaux de caroténoïdes augmentent de manière significative chez toutes les variétés soumises au stress de la salinité par NaCl.

L'accumulation d'anthocyanines en réponse au stress de la salinité a déjà été observée et a été considérée comme une résistance aux effets toxiques des sels (Strogonov, 1973). Le niveau d'anthocyanines augmente de manière significative chez toutes les variétés traitées ; cependant, on relève une accumulation plus importante chez la variété S30 (Tableau I), ce qui confirme sa tolérance relative à la salinité.

Un grand nombre de mécanismes entrent en jeu pour maintenir la turgescence par ajustement osmotique chez les végétaux soumis à des conditions de stress. L'un de ceux-ci est l'accumulation d'osmolytes organiques importants comme les sucres (Sacher et Staples, 1985) et les acides aminés, ainsi que des teneurs élevées en proline (Cusido et coll., 1987 ; Sharma et coll., 1990).

Le rôle des sucres accumulés lors d'un stress de salinité a été mis en évidence par plusieurs chercheurs (Sacher et Staples, 1985 ; Sudhakar et coll., 1987). Les sucres réducteurs et non réducteurs s'accumulent de manière significative dans les feuilles et les racines des variétés de mûriers soumises au stress de la salinité par le NaCl (Tableau II). L'amplitude de l'augmentation des sucres réducteurs et non réducteurs varie en fonction des variétés et est liée à la concentration. Le pourcentage

d'accumulation des sucres est plus forte chez la variété S30 que chez les autres variétés. Le contenu en amidon diminue progressivement à mesure que la salinité augmente ; la diminution du contenu en amidon est comparativement plus faible chez la variété S30 (Tableau IV). Ces résultats corroborent ceux de Sharma et coll. (1990) qui ont observé que le degré de diminution du contenu en amidon était plus faible chez les cultivars tolérants que chez les cultivars sensibles du pois chiche. Les fortes teneurs en sucres ainsi que la diminution plus faible du contenu en amidon constatées chez la variété S30 peuvent être dues à l'action de la photosynthèse, comme l'a attribué Kingsbury et coll. (1985) aux lignées de blé tolérantes aux conditions salines.

Les protéines étant le principal composant organique des végétaux, on pourrait penser qu'elles jouent un rôle dans les mécanismes de compensation en milieu salin. Le stress de la salinité pourrait induire des changements métaboliques par modification et modulation de la quantité et de la qualité des protéines (Ramagopal, 1987). Le contenu en protéines totales diminue progressivement en fonction de l'intensité du stress, avec un pourcentage de diminution plus faible pour la variété S30 (Tableau IV). La diminution du contenu en protéines, s'accompagnant d'une augmentation du pool d'acides aminés, tendrait à indiquer que l'accélération du catabolisme des protéines pourrait constituer l'un des mécanismes de compensation physiologique lors d'un stress de la salinité (Strogonov, 1973).

Les niveaux d'acides aminés chez les variétés de mûriers étudiées ici augmentent de manière significative (Tableau III) ; des observations similaires ont été faites par de nombreux chercheurs (Sudhakar et coll., 1987 ; Dubey et Manjurani, 1989). Une accumulation d'acides aminés plus importante dans les feuilles et dans les racines a été observée chez la variété S30. Rush et Epstein (1976) ont attribué la tolérance à la salinité des variétés de tomates à une plus grande accumulation d'acides aminés. Une déficience en potassium associée à une augmentation de l'accumulation des acides aminés lors d'un stress de la salinité a également été observée ici, corroborant les résultats de Smith et coll. (1982).

Il a été suggéré que la proline était un corps dissous osmotique compatible en milieu salin (Handa et coll., 1986) car c'est un facteur de stabilisation ou de solubilisation des protéines (Bogges et Stewart, 1980) et fournit une réserve d'azote ou de substrat respiratoire pour faciliter le rétablissement de la plante après le stress (Aspinall et Paleg, 1981). Dans cette étude, l'accumulation de proline augmente de manière significative dans les feuilles et les racines des variétés de mûrier soumises à la salinité NaCl (Tableau III), ce qui confirme les résultats de Chu et coll. (1976), Dix et Pearce (1981) et Sharma et coll. (1990). La variété S30 présente une accumulation plus importante de proline dans les feuilles et les racines que les autres variétés étudiées ici. Il a été suggéré que la capacité des espèces à accumuler de la proline est corrélée à leur tolérance à la salinité (Stewart et Lee, 1974).

Au vu de ces résultats, il est clair que l'accumulation plus importante de sucres, d'acides aminés et, en particulier, de proline dans le cytoplasme des plantes peut être considérée comme un caractère d'adaptation et peut servir d'indice pour déterminer la tolérance à la salinité des feuilles de mûrier. De plus, on peut conclure, d'après les paramètres physiologiques, que la variété S30 a une tolérance relativement plus forte à la salinité due au NaCl. Les résultats obtenus permettent de classer les quatre variétés étudiées dans l'ordre de tolérance à la salinité suivant : S30 > S41 > S54 > K2.

FIELD EVALUATION OF FUNGICIDES AGAINST POWDERY MILDEW OF MULBERRY IN KASHMIR

N.A. MUNSHI, T.N. TANKI, M.A. ZARGAR, A.R. TRAG & R.K. GROVER*

Division of Sericulture, Mirgund, SK University of Agricultural Sciences and Technology,
Post Bag No. 23, GPO Srinagar - 190 001, India.

Attempts were made to evaluate the efficacy of four fungicides, namely, Carbendazim (Bavistin 50% W.P.), Myclobutanil (Systane 10% W.P.), Triforine (Saprol 15% E.C.) and Hexaconazole (Anvil 5% E.C.) against powdery mildew of mulberry (*Morus alba* L.) caused by *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst in the Kashmir Valley. Carbendazim at 0.05% and Myclobutanil at 0.05% were found to be comparatively more effective against the disease. A feeding trial indicated that these two fungicides at such concentrations have no adverse residual effect on the growth and development of the silkworm when fed two days after the date of spraying.

Keywords: Fungicides, powdery mildew, mulberry.

INTRODUCTION

Powdery mildew of mulberry (*Morus alba* L.), caused by *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst, has been observed to be at its high intensity in the Kashmir Valley during the months of August to November. The disease reduces leaf yield and adversely affects the feeding quality of the leaves. A prolonged larval period and poor cocoon formation has been reported upon feeding mildew-affected to silkworms (Suryanarayanan and Ganesh, 1969; Noamani *et al.*, 1970). In the advanced condition the disease has been found to reduce the crude leaf protein content by as much as 33% (Anonymous, 1969). None of the mulberry cultivars grown in the valley has been observed to be free from this disease, though there are differences in the degree of tolerance/susceptibility (Munshi *et al.*, 1990).

Considerable work has been carried out by a number of workers like Siddaramaiah *et al.* (1978) on the chemical control of this disease, and the residual toxicity of an effective fungicide, chinomathionate (Morestan), has been studied by Sitrama Iyenger (1975). However, there is no information available regarding the efficacy of various fungicides against this disease from the Kashmir Valley, where the agroclimatic conditions are different from the rest of India. Therefore, a number of fungicides were tried to combat this disease, the results of which are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the mulberry farm of the Division of Sericulture SKUAST at Mirgund, Kashmir, in the years 1988, 1989 and 1990. The experiment was laid out in a randomised block design with three replications using a plot size of 12' x 12' comprising four plants each of the same age group (between ten to twelve years of age) of the variety Goshocrami per replication. Four systemic fungicides, namely, Carbendazim (Bavistin 50% W.P.), Myclobutanil (Systane 10% W.P.), Triforine (Saprol 15% E.C.), and Hexaconazole (Anvil 5% E.C.), were each applied three times (1500 litres per spray/hectare) at intervals of 20 days beginning with the first sign of the appearance

* Prof. R.K. Grover, Emeritus Scientist, Plant Pathology Division, HPKVV, Palampore, HP, India.

of the disease (Table I). Note that these fungicides are referred to by the initial trade names listed here throughout the manuscript. Care was taken to confine the treatments by maintaining guard rows between the plots. Observations on the incidence of disease were recorded 20 days after the last spray. From each plant, leaves of three randomly selected branches were observed for the assessment of the intensity of the disease. The leaves were grouped into the following five grades on the basis of the leaf area infected (Croxall *et al.*, 1952).

Grade:

0: No infection.

1: 1 to 25% of the total area infected.

2: 26 to 50% of the total area infected.

3: 51 to 75% of the total area infected.

4: 76 to 100% of the total area infected.

Table I. Efficacy of different fungicides for the control of mulberry powdery mildew disease (three year data).

Tableau I. Efficacité de différents fongicides dans la lutte contre l'oïdium du mûrier (résultats pour trois années).

Sl no.	Treatment <i>Traitement</i>	1988		1989		1990	
		PDI	PDC	PDI	PDC	PDI	PDC
1	Carbendazim 0.025%	16.95 (24.33)*		19.25 (26.0)	77.06	20.55 (26.93)	76.33
2	Carbendazim 0.05%	15.55 (23.25)	76.79	15.25 (22.97)	81.83	15.15 (22.89)	82.55
3	Myclobutanil 0.025%	22.65 (28.44)	76.19	22.05 (27.99)	73.73	23.25 (28.83)	73.22
4	Myclobutanil 0.05%	20.30 (26.78)	69.70	17.30 (24.58)	79.39	18.55 (24.83)	78.64
5	Triforine 0.025%	29.75 (33.03)	55.59	31.05 (33.87)	63.01	32.25 (34.60)	62.86
6	Triforine 0.05%	24.65 (29.78)	63.20	23.45 (28.94)	72.06	22.85 (28.56)	73.69
7	Hexaconazole 0.025%	46.45 (42.97)	30.67	37.30 (37.64)	55.56	37.05 (37.48)	57.34
8	Hexaconazole 0.05%	32.70 (32.58)	51.19	25.75 (30.52)	69.32	26.35 (30.88)	69.66
9	Control with water <i>Témoin traité à l'eau</i>	67.00 (54.94)	-	83.95 (66.35)	-	86.85 (68.75)	-
	CD at 5%	(6.59)	-	(3.66)	-	(2.35)	-
	CD at 1%	(9.08)	-	(5.05)	-	(3.24)	-

* Figures in parentheses denote transformed values.

* Les chiffres entre parenthèses expriment des transformées angulaires.

The percent disease intensity (PDI) and percent disease control (PDC) were calculated using standard methods of plant disease assessment (FAO, 1967). The following formulae were applied:

$$\text{PDI} = \frac{\sum \text{numerical values} \times \text{grades}}{\text{Total number of observations}} \times \frac{100}{\text{Max. value}}$$

$$\text{PDC} = \frac{\text{Control PDI} - \text{treatment PDI}}{\text{Control PDI}} \times 100$$

In another experiment the residual toxicity of Carbendazim at 0.05% concentration and Myclobutanil at 0.05% concentration, which showed promising results in all the 3 years, were assessed by regularly feeding freshly hatched larvae of hybrid (C108 × J112) univoltine silkworms throughout their larval period with leaves sprayed 2 days and 4 days earlier. To assess the residual toxicity of the chemicals on the health of the worms and the quality of the cocoons formed, the total number of cocoons formed, weight of ten mature larvae, single cocoon weight and shell percentage were examined.

RESULTS AND DISCUSSION

The data presented in Table I reveal that all of the fungicides were effective in checking the disease as compared to the control. The Bartlett test of homogeneity of variance (Gomez and Gomez, 1984) shows that the three year data are homogenous.

In the year 1988 Carbendazim at 0.05% concentration proved to be the most effective fungicide as the lowest mean percentage disease intensity of 15.55 was recorded using this treatment compared to the control, with 67 mean percent disease intensity. Carbendazim at 0.05% is statistically on a par with Carbendazim at 0.025% and Myclobutanil at 0.05% and 0.025%, with mean percent disease intensities of 16.95, 20.30 and 22.65, respectively. Triforine and Hexaconazole were less effective at both 0.05% and 0.025% concentrations.

In the year 1989 Carbendazim at 0.05% concentration proved to be the most effective fungicide with the lowest mean percentage of disease intensity of 15.25 recorded, compared to the control, with 83.75 mean percent disease intensity. Carbendazim at 0.05% concentration is statistically on a par with Myclobutanil at 0.05% concentration and Carbendazim at 0.025% concentration with mean percent disease intensities of 17.30 and 19.25, respectively. Triforine at 0.05% and 0.025% concentrations, and Hexaconazole at 0.05% and 0.025% concentrations were less effective in checking the disease.

In the year 1990, again Carbendazim at 0.05% concentration proved to be the most effective fungicide, and a least mean percent disease intensity of 15.15 was recorded compared to the control, with 86.85 mean percent disease intensity. Carbendazim at 0.05% concentration is statistically on a par with Myclobutanil at 0.05% concentration, with an 18.55 mean percent disease intensity. Carbendazim at 0.025% concentration, Myclobutanil at 0.025% concentration, Triforine at both 0.05% and 0.025% concentrations, and Hexaconazole at both 0.05% and 0.025% concentrations were found to be comparatively less effective.

During the years 1988, 1989 and 1990 Carbendazim at 0.05% concentration showed 76.79, 81.83, and 82.55 percent disease control, respectively, and Myclobutanil at 0.05% concentration showed 69.70, 79.39 and 78.64 percent disease control.

Thus, it is clear from the three year results that Carbendazim and Myclobutanil at 0.05% concentration are comparatively the most efficacious fungicides against this pathogen.

The feeding trials indicated (Table II) that Carbendazim at 0.05% concentration and Myclobutanil at 0.05% concentration have no adverse residual effects on the growth and development of silkworms when fed two days after the date of spraying. Morestan has not been tried because it has a strong radiomimetic agent action (Zutshi and Kaul, 1975).

Table II. Effect of feeding Carbendazim and Myclobutanil treated/sprayed leaves to silkworms (mean of three replications).

Tableau II. Effet du nourrissage des vers à soie avec des feuilles traitées/vaporisées avec du Carbendazim et du Myclobutanil (moyenne de trois répliquats).

Sl no.	Treatment	Days after spraying	Conc. (%)	No. of larvae brushed	No. of cocoons formed	Weight of 10 mature larvae	Single cocoon wt (g)	Single shell wt (cg)	Shell percentage
<i>N° de série</i>	<i>Traitement</i>	<i>Nombre de jours après la vaporisation</i>	<i>Conc. (%)</i>	<i>Nombre de larves levées</i>	<i>Nombre de cocons filés</i>	<i>Poids de 10 larves matures</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
1	Carbendazim	2	0.05	200	196	23.6	0.90	21.5	23.53 (28.98)
2	Myclobutanil	2	0.05	200	197	23.3	0.92	21.3	23.02 (28.65)
3	Carbendazim	4	0.05	200	195	24.7	0.91	21.9	23.75 (29.14)
4	Myclobutanil	4	0.05	200	198	24.2	0.93	21.6	23.62 (29.06)
5	Control*			200	198	24.9	0.91	21.6	23.45 (28.94)
					NS	NS	NS	NS	NS

* Unsprayed leaves / *Feuilles non traitées.*

Figures in parentheses denote transformed values.

Les chiffres entre parenthèses expriment des transformées angulaires.

Conc.: Concentrations.

NS: Not significant / *Non significatif.*

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Vice-Chancellor of Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology for his constant encouragement during the present studies and to the Head of the Division of Sericulture for providing the facilities during the present study. Thanks are also due to Shri M.A. Malik, Field-cum-Laboratory Assistant, for his help.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1969) Annual administration and Scientific Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- CROXALL H.E., GWINO D.C., JANKINS J.E.E. (1952) Plant Pathol., 1, 39-41.
- FAO (1967) FAO Symposium on crop losses. Rome, 2-4 Oct., 330 pp.
- GOMEZ K.A., GOMEZ A.A. (1964) Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and Sons, Wiley Intersciences Publication, New York.
- MUNSHI N.A., TANKI T.N., ZARGAR M.A., DAS B.C. (1987) Field evaluation of fungicides against leaf spot disease of mulberry in Kashmir. Indian J. Seric., 28(3), 86-89.

- MUNSHI N.A., TANKI T.N., ZARGAR M.A. (1989-90) Research Projects. University of Agricultural Sciences and Technology, Division of Sericulture, Mirgund, Kashmir.
- NOAMANI K.B., MUKERJEE P.K., KRISHNASWAMI S. (1970) Studies on the effect of feeding mildew affected mulberry leaves. *Indian J. Seric.*, 9, 49-52.
- SIDDARAMAIAH A.L., KRISHNA PRASAD K.S., PADAGANUR G.M. (1978) Field evaluation of fungicides in the control of mulberry powdery mildew. *Indian J. Seric.*, 17, 37-41.
- SIDDARAMAIAH A.L., PADAGANUR G.N., KRISHNA PRASAD K.S., GOVINDAN R. (1978) Control of mulberry leaf spot caused by *Cercospora moricola* Cooke. *Indian J. Seric.*, 17, 23-27.
- SITARAMA IYENGER M.N. (1975) Effect of feeding mulberry leaves sprayed with morestan on the survival and growth of silkworm, *Bombyx mori*. *Indian J. Seric.*, 14, 1-5.
- SURYANARAYAN S.K., GANESH N.K. (1969) Silkworm Inf. Bull., 1(1), 62-67.
- ZUTSHI U., KAUL B.L. (1975) Studies on the cytogenetic activity of some fungicides in higher plants. *Cytobios*, 12, 61-67.

EVALUATION SUR LE TERRAIN DE L'EFFET DE FONGICIDES SUR L'OIDIUM DU MURIER DANS LE CACHEMIRE

N.A. MUNSHI, T.N. TANKI, M.A. ZARGAR, A.R. TRAG & R.K. GROVER *

Division of Sericulture, Mirgund, SK University of Agricultural Sciences and Technology, Post
Bag No. 23, GPO Srinagar - 190 001, Inde.

*Des tests ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité de quatre fongicides, le Carbendazim (Bavistine 50 % W.P.), le Myclobutanil (Systhane 10 % W.P.), la Triforine (Saprol 15 % E.C.) et l'Hexaconazole (Anvil 5 % E.C.), sur l'oïdium du mûrier (*Morus alba* L.) provoqué par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst dans la vallée du Cachemire. Le Carbendazim à 0,05 % et le Myclobutanil à 0,05 % sont comparativement plus efficaces contre cette maladie. Le test de nourrissage montre que ces deux fongicides aux concentrations indiquées n'ont pas d'effets résiduels négatifs sur la croissance et le développement du ver à soie lorsque le nourrissage est réalisé deux jours après la vaporisation.*

INTRODUCTION

L'incidence de l'oïdium du mûrier (*Morus alba* L.), provoqué par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karts, est maximale dans la vallée du Cachemire d'août à novembre. Cette maladie entraîne une diminution du rendement en feuilles et affecte de manière négative la qualité nutritive des feuilles. On a également observé un allongement de la durée larvaire et un filage médiocre chez les vers à soie nourris avec des feuilles infestées d'oïdium (Suryanarayanan et Ganesh, 1969 ; Noamani et coll., 1970). Aux stades les plus avancés, cette maladie entraîne une diminution du contenu en protéines brutes pouvant s'élever à 33 % (Anonyme, 1969). Aucun des cultivars de mûrier cultivés dans la vallée du Cachemire n'en est exempt, bien qu'ils présentent des différences de degrés de tolérance/sensibilité (Munshi et coll., 1990).

Des travaux approfondis ont été réalisés par un certain nombre de chercheurs comme Siddaramaiah et coll. (1978) sur la lutte chimique contre cette maladie et la toxicité résiduelle d'un fongicide efficace, le chinomathionate (Morestan), a été étudiée par Sitrama Iyenger (1975). Cependant, on ne dispose d'aucune information concernant l'efficacité de différents fongicides sur cette maladie dans la vallée du Cachemire où les conditions agroclimatiques sont différentes du reste de l'Inde. Plusieurs fongicides ont donc été testés pour tenter de lutter contre cette maladie ; les résultats sont présentés ici.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée sur la plantation de mûriers de la Division of Sericulture SKUAST de Mirgund (Cachemire) au cours des années 1988, 1989 et 1990. L'expérience a été configurée selon la méthode des blocs aléatoires avec trois réplicats, chaque réplicat étant composé d'une parcelle de 12' x 12' comprenant quatre plants d'un même groupe d'âge (de 10 à 12 ans) de la variété Goshorami. Quatre fongicides systémiques, à savoir : le Carbendazim (Bavistine 50 % W.P.), le Myclobutanil

* Prof. R.K. Grover, Emeritus Scientist, Plant Pathology Division, HPKV, Palampore, HP, Inde.

(Systhane 10 % W.P.), la Triforine (Saprol 15 % E.C.) et l'Hexaconazole (Anvil 5 % E.C.), ont été appliqués trois fois (1 500 litres par vaporisation/ha) à intervalles de 20 jours dès l'apparition des premiers signes de la maladie (Tableau I). Dans cet article, les fongicides sont indiqués par leurs marques commerciales originales. On a pris soin d'isoler les traitements en maintenant des rangées de protection entre chaque parcelle. Les observations sur l'incidence de la maladie ont été réalisées 20 jours après la dernière vaporisation. Pour chaque plant, des feuilles ont été prélevées sur trois branches sélectionnées afin d'évaluer l'intensité de la maladie. Les feuilles ont été classées selon cinq degrés sur la base de la surface foliaire infestée (Croxall et coll., 1952) :

Degré :

- 0 : Pas d'infestation.
- 1 : de 1 à 25 % d'infestation de la surface totale.
- 2 : 26 à 50 % d'infestation de la surface totale.
- 3 : 51 à 75 % d'infestation de la surface totale.
- 4 : 76 à 100 % d'infestation de la surface totale.

Le pourcentage d'intensité de la maladie (PDI) et le pourcentage d'inhibition de la maladie (PDC) ont été calculés d'après les méthodes standard d'évaluation de maladie des plantes (FAO, 1967). Les formules suivantes ont été utilisées :

$$PDI = \frac{\sum \text{valeurs numériques} \times \text{degré}}{\text{Nombre total d'observations}} \times \frac{100}{\text{valeur max.}}$$

$$PDC = \frac{PDI \text{ chez le témoin} - PDI \text{ chez le traitement}}{PDI \text{ chez le témoin}} \times 100$$

La toxicité résiduelle du Carbendazim à la concentration de 0,05 % et du Myclobutanil à 0,05 % a été testée par nourrissage régulier de larves nouvellement écloses de l'hybride monovoltin C108 x J112 sur toute la durée de leur période larvaire avec des feuilles traitées 2 et 4 jours plus tôt. Les résultats obtenus sont prometteurs pour les trois années. Le nombre total de cocons filés, le poids de dix larves matures, le poids d'un cocon et la richesse soyeuse ont été mesurés afin d'évaluer la toxicité résiduelle des substances chimiques sur la santé des larves et la qualité des cocons filés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le tableau I révèlent que tous les fongicides permettent d'inhiber la maladie. Le test de Bartlett d'homogénéité de la variance (Gomez et Gomez, 1984) montre que les données sont homogènes pour les trois années.

Pour l'année 1988, le Carbendazim à la concentration de 0,05 % est le fongicide le plus efficace car il donne le pourcentage moyen d'intensité de la maladie le plus faible (15,55) par rapport au témoin, pour lequel on enregistre une intensité moyenne de 67 %. Le Carbendazim à 0,05 % donne des résultats statistiquement comparables à ceux obtenus avec le Carbendazim à 0,025 % et le Myclobutanil à 0,05 % et à 0,025 %, pour lesquels les pourcentages d'intensité sont respectivement de 16,95, de 20,30 et de 22,65. Le Triforine et l'Hexaconazole sont les moins efficaces aussi bien à 0,05 % qu'à 0,025 %.

Pour l'année 1989, le Carbendazim à la concentration de 0,05 % est le fongicide le plus efficace avec un pourcentage moyen d'intensité de la maladie de 15,25 contre 83,75 chez le témoin. Le Carbendazim à la concentration de 0,05 % donne des résultats statistiquement comparables à ceux obtenus avec le Myclobutanil à la concentration de 0,05 % et le Carbendazim à la concentration de 0,025 %, pour lesquels les pourcentages d'intensité sont respectivement de 17,30 et 19,25. La Triforine aux concentrations de 0,05 % et de 0,025 % et l'Hexaconazole aux concentrations de 0,05 % et de 0,025 % sont comparativement moins efficaces pour lutter contre la maladie.

Pour l'année 1990, le Carbendazim à la concentration de 0,05 % se présente à nouveau comme le fongicide le plus efficace avec un pourcentage d'infestation minimal de 15,15 contre 86,85 chez le

témoin. Le Carbendazim à la concentration de 0,05 % donne des résultats statistiquement comparables à ceux obtenus pour le Myclobutanil à la concentration de 0,05 %, pour lequel le pourcentage moyen d'intensité de la maladie est de 18,55. Le Carbendazim à la concentration de 0,025 %, le Myclobutanil à la concentration de 0,025 %, la Triforine aux concentrations de 0,05 % et de 0,025 et l'Hexaconazole aux concentrations de 0,05 % et de 0,025 % sont comparativement moins efficaces.

Pour les années 1988, 1989 et 1990, le Carbendazim à la concentration de 0,05 % donne des pourcentages d'inhibition de la maladie de 76,79, 81,83 et 82,55 %, respectivement. Le Myclobutanil à la concentration de 0,05 % donne des pourcentages d'inhibition de la maladie de 69,70, 79,39 et 78,64 %.

Les résultats obtenus pour ces trois années montrent clairement que le Carbendazim et le Myclobutanil à la concentration de 0,05 % sont comparativement les fongicides les plus efficaces dans la lutte contre cet agent pathogène.

Les tests de nourrissage (Tableau II) indiquent que le Carbendazim à la concentration de 0,05 % et le Myclobutanil à la concentration de 0,05 % n'ont pas d'effets résiduels négatifs sur la croissance et le développement des vers à soie nourris avec des feuilles traitées deux jours après la vaporisation. Le Morestan n'a pas été testé car il a une forte action radiomimétique (Zutshi et Kaul, 1975).

EFFICACY OF DIFFERENT DOSES OF NEEM CAKE ON *MELOIDOGYNE INCOGNITA* INFECTING MULBERRY

GOVINDAIAH, S.B. DANDIN*, K. GIRIDHAR & R.K. DATTA

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

Delipidated neem cake was tested in different doses, i.e., 1, 2 and 3 tonnes/ha, against Meloidogyne incognita infecting mulberry under field conditions. Neem cake application in all doses tested significantly improved the growth parameters and leaf yield over control. The percentage increase in plant height ranged from 9.7 to 15.6 in different dosages compared to the control. Similar trends were also observed in the number of leaves and leaf moisture. The leaf yield increased progressively with increase in the dose of neem cake; the percentage increase was 7.8 to 22.7 at different doses. Neem cake application significantly reduced the number of root galls/plant and egg mass production. The percentage reduction in galls and egg masses ranged from 73.3 to 85.4 and 56.4 to 70.8 respectively at the different doses tested.

Keywords: Neem cake, *Meloidogyne incognita*, nematode control, mulberry.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.), the sole food plant of the silk insect, *Bombyx mori* L., is cultivated in 343 thousand hectares in India. The root gall nematode (*Meloidogyne incognita*) affecting mulberry has been reported in almost all countries practicing sericulture. It causes stunting of plants, chlorosis of leaves, and reduction of leaf yield in mulberry (Campos *et al.*, 1974; Saha *et al.*, 1983). The avoidable leaf yield loss due to the root-knot nematode has been reported to be about 10-12 per cent (Govindaiah, 1990). In recent years, due to the prohibitive cost of pesticides and their toxicity to human beings and soil flora, considerable attention has been paid to the cultural control of disease through organic amendments. The application of oil cakes, specially the neem cake, has shown great potential against different nematodes, including the root gall nematode, in various crops (Singh and Sitaramaiah, 1971; Sharma *et al.*, 1985; Sitaramaiah, 1987). Oil cakes, besides being nontoxic, have no residual effect on the plants, and also improve plant growth. During the process of decomposition in the soil, oil cakes release considerable amount of phenols, which are found to be highly toxic to nematodes (Alam *et al.*, 1978). In mulberry, preliminary trials have been conducted with neem cake against *M. incognita* (Sikdar *et al.*, 1986). However, detailed studies are not available on the efficacy of different doses of neem cake in improving the plant growth and reducing the nematode population. Hence the present study was undertaken.

MATERIALS AND METHODS

Efficacy of different doses of neem cake was tested against *Meloidogyne incognita* under field conditions in RDB during 1987-89. The trial was conducted in a field infested with *M. incognita*

* Present address: Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, India.

Table I. Effect of neem cake on growth and leaf yield of mulberry infected by *Meloidogyne incognita*.*

*Tableau I. Effet du tourteau de margousier sur la croissance et le rendement en feuilles chez le mûrier infesté par Meloidogyne incognita.**

Doses of neem cake	Plant height (cm)	Increase over control (%)	Leaves/plant (no.)	Increase over control (%)	Leaf moisture (%)	Increase over control (%)	Leaf yield/ha (kg)	Increase over control (%)
<i>Doses de tourteau de margousier</i>	<i>Hauteur du plant (cm)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>	<i>Feuilles/plant (nombre)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>	<i>Humidité des feuilles (%)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>	<i>Rendement en feuilles par ha (kg)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>
1 tonne/ha/yr <i>1 tonne/ha/an</i>	146.02	9.75	156.59	6.15	71.96 (58.15)	3.52	7108.20	7.86
2 tonnes/ha/yr <i>2 tonnes/ha/an</i>	150.59	12.51	164.57	11.08	72.53 (58.39)	4.28	7653.75	16.10
3 tonnes/ha/yr <i>3 tonnes/ha/an</i>	156.15	15.60	169.90	13.87	73.40 (58.93)	5.30	8086.93	22.72
Control <i>Témoin</i>	131.78		146.32		69.42 (56.45)		6589.73	
SEm	2.59		3.31		0.14		148.66	
CD at 5%	7.26		9.28		0.40		416.27	

* Mean of 5 trials / *Moyenne de 5 tests.*

Figures in parentheses are angular transformed values / *Les chiffres entre parenthèses expriment les transformées angulaires.*

SEm: Standard error of the mean / *Ecart type de la moyenne.*

CD: Critical difference / *Intervalle de confiance.*

measuring 500 m², with 124.89 m² for each treatment, using the Kanva-2 variety of mulberry. The initial nematode population was estimated as 400-450 larvae/250 ml of soil by Cobb's sieving and Baermann's funnel technique (Southey, 1970). Three doses of neem cake viz., 1, 2 and 3 tonnes/ha/yr, were applied. Each treatment was replicated four times, together with a control. Neem cake was applied to the soil and thoroughly mixed by light digging followed by irrigation. Healthy mulberry saplings were planted in the plots at a spacing of 60 cm × 60 cm and the usual intercultural operations were carried out. After 70 days of application, 10 plants from each replication were selected at random and observations were recorded on plant height, number of leaves, fresh and dry weight of leaves, leaf moisture, leaf yield, number of galls/plant and number of egg masses/gram of root.

RESULTS AND DISCUSSION

There was a significant improvement in all growth parameters in the range of doses of neem cake tested. The plant height was maximum 156.15 cm at 3 tonnes of neem cake, followed by 150.59 cm at 2 tonnes, whereas it was 131.78 cm in the control. The percentage increase in plant height was 9.75, 12.51 and 15.6 at 1, 2 and 3 tonnes/ha, respectively. The difference in growth was not significant between 1 and 2, and 2 and 3 tonnes, whereas it was significant between 1 and 3 tonnes. The maximum number of leaves/plant was recorded using 3 tonnes (169.90), followed by 2 tonnes (164.57), and 1 tonne (156.59). The percentage increase was 6.15, 11.08 and 13.87 at 1, 2 and 3 tonnes/ha, respectively, over the control. The leaf yield improved significantly in all doses of neem cake tested. The maximum leaf yield of 8086.93 kg/ha/crop was recorded at 3 tonnes, followed by 2 tonnes (7653.75 kg) and 1 tonne (7108.20 kg), whereas it was 6589.73 kg/ha/crop in the control. The percentage increase in leaf yield was 7.86, 16.10 and 22.72 at 1, 2 and 3 tonnes/ha/crop, respectively.

Table II. Effect of neem cake on the development of *Meloidogyne incognita*.*

Tableau II. Effet du tourteau de margousier sur le développement de *Meloidogyne incognita*.*

Doses of neem cake	Number of galls/plant	Reduction over control (%)	Number of egg masses/g of root	Reduction over control (%)
<i>Doses de tourteau de margousier</i>	<i>Nombre de galles/plant</i>	<i>Diminution par rapport au témoin (%)</i>	<i>Nombre d'oeufs par g de racine</i>	<i>Diminution par rapport au témoin (%)</i>
1 tonne/ha/yr / 1 tonne/ha/an	42.56	73.35	17.76	56.46
2 tonnes/ha/yr / 2 tonnes/ha/an	34.30	78.52	14.76	63.73
3 tonnes/ha/an / 3 tonnes/ha/an	23.30	85.40	11.90	70.86
Control / Témoin	159.73		40.70	
SEm+	4.46		0.91	
CD at 5%	12.51		2.55	

* Mean of 5 trials / Moyenne de 5 tests.

SEm: Standard error of the mean / Ecart type de la moyenne.

CD: Critical difference / Intervalle de confiance.

A similar trend was observed with respect to leaf moisture content. The percentage increase was 3.52 to 5.30 in different treatments over the control (Table I). The present investigations are consistent with the results obtained by Desai *et al.* (1979), who have tested neem cake against *M. incognita* on tobacco and found improved plant growth and leaf yield. Darekar *et al.* (1989) found that application of neem cake at 1 tonne/ha increased leaf yield by 40.5 per cent in betelvine. Similarly, Acharya (1989) found that the application of neem cake in established betelvine gardens was most effective against *M. incognita* and in increasing the leaf yield.

Neem cake application effectively reduced the development and reproduction of nematodes. The number of nematode galls/plant was significantly reduced in all treatments over the control. The number of galls recorded were 42.56, 34.30 and 23.30 at 1, 2 and 3 tonnes, respectively, while the maximum number of 159.73 galls was recorded in the control. The percentage reduction was 73.35, 78.52 and 85.40 at 1, 2 and 3 tonnes/ha, respectively. The number of egg masses/g root weight was also significantly reduced, giving values of 11.90, 14.76 and 17.76 at 3, 2 and 1 tonnes/ha, respectively. Control plants had maximum production of egg masses (40.70) (Table II). The reduction in root galls and egg masses was most likely due to the toxic effect of phenols released from neem cake during decomposition. These results are in conformity with the findings of Alam *et al.* (1980), who observed a reduced number of galls in neem cake-amended soil due to a higher amount of total free phenols. Jagdale *et al.* (1985) found that neem cake application at 1 tonne/ha reduced the number of galls and nematode population of *M. incognita* and increased the leaf yield in betelvine.

Neem cake, besides being nematicidal, increased the leaf yield significantly, which may be due to its nutritional value as well as the leaf moisture, which is also an important factor in maintaining the quality of leaves for silkworm feeding. In view of the high sensitivity of the silkworm to pesticides, neem cake application at 2 tonnes/ha in 4 equal split doses together with the recommended fertilizer application was found quite effective to control the disease and increase the leaf yield. Hence, this method is of great importance to countries like India where large-scale use of nematicides is not practical for marginal farmers.

REFERENCES

- ACHARYA A. (1989) Nematological research of betelvine at Ouatt, Bhubaneswar. pp. 26-27. Fourth Group Meeting on Nematological Problems of Plantation Crops. Sept. 5-7, Univ. Agricult. Sci., GKVK, Bangalore, India.
- ALAM M.M., KHAN A.M., SAXENA S.K. (1978) Mechanism of control of plant parasitic nematodes as a result of the application of organic amendments to the soil. (V) Role of phenolic compounds. *Indian J. Nematol.*, 9, 136-142.
- ALAM M.M., SIDDIQUI Z.A., KHAN A.M., SAXENA S.K. (1980) Effect of different cropping sequences on the population of plant parasitic nematodes. *Indian J. Nematol.*, 10, 35-39.
- CAMPOS A.R., LORDELLO L.G.E., ABREU O.C., OLIVIRA D.A. (1974) Incidence of *Meloidogyne* on mulberry varieties. In *Trabalhos apresentados de Scuriao de Nematologia*. Ed. L.G.B. Dordello, Piracicaba, Brazil, 6-7 Feb.
- DAREKAR K.S., SHEPTE S.S., MHASE W.L. (1989) Problems and progress in research on crop loss assessment, pesticide residues and integrated management with special reference to biological control of nematodes on betelvine. Fourth Group Meeting on Nematological Problems of Plantation Crops. Sept. 5-7, Univ. Agricult. Sci., GKVK, Bangalore, India.
- DESAI M.V., SHAH H.M., PILLAI S.N., PATEL A.S. (1979) Oil cakes in the control of root-knot nematodes. *Tob. Res.*, 5, 105-108.
- GOVINDAIAH (1990) Studies on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, infesting mulberry. Ph. D. Thesis, University of Mysore, India.
- JAGDALE G.B., PAWAR A.B., DAREKAR K.S. (1985) Effect of organic amendments on root-knot nematodes infecting betelvine. *International Nem. Network Newsletter*, 2, 7-10.
- SAHA S.S., SINHABABU S.P., SUKUL M.C. (1983) The effect of nematode infestation on mulberry plants and their effect on feeding silkworm (*Bombyx mori* L.). *Nematologica*, 29, 463-467.

- SHARMA H.L., VIMAL O.P., PRASAD D. (1985) Nematicidal and manurial value of some oil cake. Indian J. Tropical Plant Disease, 3, 51-55.
- SINGH R.S., SITARAMAIAH K. (1971) Control of root-knot through organic and inorganic amendments of soil effect oil cakes and saw dust. Indian J. Mycol. and Plant Pathol., 1, 20-29.
- SIKDAR A.K., GOVINDAIAH, MADHAVA RAO Y.R., JOLLY M.S., GIRIDHAR K. (1986) Control of root-knot nematode disease (*M. incognita*) in mulberry by aldicarb and oil cakes. Indian J. Seric., 25, 33-35.
- SITARAMAIAH K. (1987) Cultural control of plant parasitic nematodes. In Problems and Progress in Economic Phytonematology. Ed. D.S. Bhatti and R.K. Walis, Haryana Agricultural University, Hissar, India, 262 pp.
- SOUTHEY J.F. (1970) Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Tech. Bull. No. 2, MAFF, Her Majesty's Stationary Office, London.

EFFICACITE DE DIFFERENTES DOSES DE TOURTEAU DE MARGOUSIER SUR *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, PARASITE DU MURIER

GOVINDAIAH, S.B. DANDIN*, K. GIRIDHAR & R.K. DATTA

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

On a testé l'effet du tourteau de margousier à différentes doses, soit 1, 2 et 3 tonnes/ha, sur Meloidogyne incognita infestant le mûrier en conditions naturelles. A toutes les doses testées, l'application de tourteau de margousier améliore les paramètres de croissance et le rendement en feuilles par rapport au témoin. Le pourcentage d'augmentation de la hauteur du plant par rapport au témoin varie de 9,7 à 15,6 selon le dosage. Des tendances similaires ont été observées pour ce qui concerne le rendement et l'humidité des feuilles. L'augmentation du rendement en feuilles est fonction de celle de la dose de tourteau de margousier ; le pourcentage d'augmentation se situe entre 7,8 et 22,7 suivant la dose. L'application de tourteau de margousier réduit le nombre de galles/plant et la production de masses d'oeufs de manière significative. Les pourcentages de réduction des galles et des masses d'oeufs varient respectivement de 73,3 à 85,4 et de 56,4 à 70,8 suivant la dose.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.), la seule nourriture de l'insecte séricigène *Bombyx mori* L., est cultivé sur 343 000 hectares en Inde. Le nématode de la galle des racines (*Meloidogyne incognita*) infestant le mûrier a été observé dans la plupart des pays séricicoles. Il provoque l'étiollement des plantes, la chlorose des feuilles et entraîne une diminution du rendement en feuilles (Campos et coll., 1974 ; Saha et coll., 1983). La perte de rendement en feuilles occasionnée par le nématode de la galle des racines s'élève à environ 10 à 12 % (Govindaiah, 1990). Ces dernières années, en raison du coût exorbitant des pesticides et de leur toxicité pour les êtres humains et la flore, on s'est intéressé à la lutte culturale contre cette maladie par l'utilisation d'amendements organiques. L'application de tourteau et, particulièrement, de tourteau de margousier offre un excellent potentiel de lutte contre les différents nématodes, y compris le nématode de la galle des racines, chez plusieurs types de culture (Singh et Sitaramaiah, 1971 ; Sharma et coll., 1985 ; Sitaramaiah, 1987). Le tourteau, outre le fait qu'il n'est pas toxique, n'a pas d'effet résiduel sur les végétaux et améliore leur croissance. Au cours du processus de décomposition dans la terre, le tourteau libère des quantités importantes de phénols qui sont fortement toxiques pour les nématodes (Alama et coll., 1978). Chez le mûrier, des tests préliminaires utilisant le tourteau de margousier ont été réalisés sur *M. incognita* (Sikdar et coll., 1986). Cette étude a été entreprise car on ne dispose d'aucune information détaillée sur l'efficacité de doses différentes de tourteau de margousier dans l'amélioration de la croissance des plantes et la réduction de la population de nématode.

* Adresse actuelle : Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Inde.

MATERIELS ET METHODES

L'efficacité de doses différentes de tourteau de margousier sur *Meloidogyne incognita* a été testée sur le terrain, selon la méthode des blocs aléatoires, de 1987 à 1989. Le test a été réalisé dans une plantation de 500 m² infestée par *M. incognita*, avec 124,89 m² pour chaque traitement avec la variété de mûrier Kanva 2. La population initiale de nématodes a été estimée à 400-450 larves/250 ml de terre selon la méthode de tamisage de Cobb et la technique de décantation de Baermann (Southey, 1970). Trois doses de tourteau de margousier, soit 1, 2 et 3 tonnes/ha/an, ont été appliquées. Chaque traitement a été répété quatre fois. Le tourteau de margousier a été appliqué dans la terre et mélangé soigneusement par bêchage et irrigation. Des plantules de mûrier saines ont été plantées dans les parcelles à 60 cm × 60 cm d'intervalle et les opérations culturales courantes ont été réalisées. Soixante-dix jours après l'application, 10 plants de chaque réplicat ont été sélectionnés au hasard. Les observations concernent la hauteur du plant, le nombre de feuilles, le poids sec et frais des feuilles, l'humidité, le rendement en feuilles, le nombre de galles/plant et le nombre de masses d'oeufs/gramme de racine.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe une amélioration significative de tous les paramètres de croissance pour toutes les doses considérées. La hauteur du plant est maximale (156,15 cm) avec 3 tonnes de tourteau de margousier, elle est de 150,59 cm avec 2 tonnes de tourteau contre 131,78 cm chez le témoin. Le pourcentage d'augmentation de la hauteur du plant est de 9,75 pour 1 tonne/ha, 12,51 pour 2 tonnes/ha et 15,6 pour 3 tonnes/ha. La différence de croissance n'est pas significative entre 1 et 2 tonnes/ha et 2 et 3 tonnes/ha, mais elle est significative entre 1 et 3 tonnes. Le nombre de feuilles/plant est maximal pour la dose de 3 tonnes (169,90), il est de 164,57 pour 2 tonnes et de 156,59 pour 1 tonne. Le pourcentage d'augmentation par rapport au témoin est de 6,15 pour 1 tonne/ha, de 11,08 pour 2 tonnes/ha et de 13,87 pour 3 tonnes/ha. L'amélioration du rendement en feuilles est significative pour toutes les doses de tourteau de margousier testées. La dose de 3 tonnes donne un rendement maximal de 8 086,93 kg/ha/récolte, contre 7 653,75 kg pour 2 tonnes et 7 108,20 kg pour 1 tonne ; le rendement chez le témoin est de 6 589,73 kg/ha/récolte. Le pourcentage d'augmentation du rendement en feuilles par rapport au témoin est de 7,86 pour 1 tonne/ha/récolte, de 16,10 pour 2 tonnes/ha/récolte et de 22,72 pour 3 tonnes/ha/récolte. Le contenu en eau des feuilles révèle une tendance similaire. Le pourcentage d'augmentation par rapport au témoin varie de 3,52 à 5,30 suivant la dose (Tableau I). Ces observations confirment les résultats obtenus par Desai et coll. (1979) qui ont testé l'effet du tourteau de margousier sur *M. incognita* chez le tabac et ont observé une amélioration de la croissance des plants et du rendement en feuilles. Darekar et coll. (1989) ont observé que l'application du tourteau de margousier à raison de 1 tonne/ha entraîne une augmentation de 40,5 % du rendement en feuilles chez l'aréquier. De même, Acharya (1989) a découvert que l'application de tourteau de margousier dans les plantations d'aréquier permet d'inhiber efficacement *M. incognita* et d'améliorer le rendement en feuilles.

L'application de tourteau de margousier entraîne une réduction très nette du développement et de la reproduction des nématodes. Le nombre de galles de nématodes par plant diminue de manière significative chez tous les traitements par rapport au témoin. Le nombre de galles relevé est de 42,56 pour 1 tonne, de 34,30 pour 2 tonnes et de 23,30 pour 3 tonnes, tandis que le témoin présente le nombre maximal de galles (159,73). Le pourcentage de réduction est de 73,35 pour 1 tonne, 78,52 pour 2 tonnes et 85,40 pour 3 tonnes. La masse d'oeufs/g de racines diminue également de manière significative, avec des valeurs de 11,90 pour 3 tonnes/ha, de 14,76 pour 2 tonnes/ha et 17,76 pour 1 tonne/ha. Les plants témoins présentent la production maximale d'oeufs (40,70) (Tableau II). La réduction des nombres de galles et d'oeufs est vraisemblablement due à l'effet toxique des phénols libérés par le tourteau de margousier au cours de la décomposition. Ces résultats sont conformes aux observations d'Alam et coll. (1980) qui ont observé une réduction du nombre de galles dans les sols traités avec du tourteau de margousier due à la présence d'une plus grande quantité de phénols libres. Jagdale et coll. (1985) ont observé que l'application de tourteau de margousier à raison de 1 tonne/ha

entraîne une réduction du nombre de galles et de la population de nématodes de *Meloidogyne incognita* et une augmentation du rendement en feuilles chez l'aréquier.

Le tourteau de margousier, outre son action nématocide, augmente, de manière significative, le rendement en feuilles, ce qui pourrait être dû à sa valeur nutritionnelle ainsi qu'à l'humidité des feuilles qui joue également un rôle important dans la préservation de la qualité des feuilles destinées au nourrissage des vers à soie. Etant donné la sensibilité élevée du ver à soie aux pesticides, l'administration de tourteau de margousier à raison de 2 tonnes/ha en quatre doses égales combinée avec l'application des engrais recommandés permet de lutter efficacement contre cette maladie et d'augmenter le rendement en feuilles. Cette méthode présente donc un grand intérêt pour les pays comme l'Inde où l'utilisation à grande échelle des nématocides n'est pas possible pour les fermiers défavorisés.

LE PROGRAMME D'AMELIORATION DU MURIER DANS L'ETAT DE SÃO PAULO AU BRÉSIL

T.C. FONSECA¹, J.E. ALMEIDA² & F. OKAMOTO²

1. Divisão de Nutrição Animal e Pastagens, D4, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13460-000 Nova Odessa, São Paulo, Brésil.
2. Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura, CEPAS, CP 16, CEP 17450-000, Galia, São Paulo, Brésil.

Mots-clés : Mûrier, amélioration.

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

La sériciculture au Brésil peut être considérée comme une activité traditionnelle ; dans certaines régions de l'Etat de São Paulo, où elle est pratiquée depuis presque 100 ans, des périodes de grand développement alternent avec des périodes de stagnation. A l'heure actuelle, la sériciculture brésilienne utilise les techniques japonaises introduites par les industries du secteur textile, lesquelles disposent de parcs industriels modernes, d'instituts de production d'oeufs sains et de souches parentales de *Bombyx mori* L. pour la production d'hybrides qui sont, au deuxième âge, envoyés aux sériciculteurs. On sait néanmoins que, pour obtenir une bonne productivité de cocons présentant une richesse soyeuse élevée, il faut absolument disposer de feuilles de mûrier riches en éléments nutritifs et appropriées à l'alimentation du ver à soie (Scarpelli, 1968 ; Hazama, 1968).

Dans le but d'améliorer la qualité de l'alimentation des vers à soie au Brésil, on a introduit quelques clones d'Italie (Catania, Roso, etc.) et du Japon (Kokuso 20, 21, 27 et Nezumigeashi) qui sont considérés au Brésil comme des "variétés nobles" en raison de leurs excellentes qualités nutritionnelles et leur bon rendement en feuilles. Cependant, elles nécessitent le greffage comme méthode de propagation végétative, ce qui rend onéreuse la rénovation des mûriers habituellement reproduits par bouturage, méthode utilisée pour les clones locaux bien adaptés aux conditions pédologiques et climatiques et appelés "variétés communes".

Afin d'obtenir des clones de mûrier de propagation facile, d'une haute valeur nutritive et ayant un bon rendement en feuilles, un programme d'amélioration du mûrier a été lancé en 1965. Ce programme a été tout d'abord coordonné par les chercheurs Luis Paolieri et Antonio da Silveira Fonseca qui travaillaient au Service de Sériciculture de Campinas (Etat de São Paulo). A partir de 1975, il a été coordonné par la section de sériciculture de l'Institut de Zootechnie sous la direction du Dr Fonseca et de son équipe.

Aujourd'hui, ce programme appartient au CEPAS (Centre de Recherche appliquée en sériciculture) à Galia (Etat de São Paulo).

METHODOLOGIE UTILISEE

Le programme d'amélioration du mûrier prévoit tout d'abord l'observation de 33 clones de la collection du Service de Sériciculture de Campinas (Etat de São Paulo), lesquels ont été obtenus dans des régions productrices de l'époque ou importés de pays étrangers. Les performances de ces clones ont été classifiées selon une échelle de pourcentages pour quelques caractères reflétant l'acclimatation, la productivité, le taux de réussite du bouturage, la précocité des bourgeons et la résistance aux maladies et aux parasites, selon le résumé présenté dans le tableau I (Fonseca et coll., 1985a).

Tableau I. Résumé de quelques caractéristiques présentées par les 33 variétés étudiées.

Table I. Summary of some characteristics shown by the 33 varieties studied.

Variétés	Source	Sexe	Propagation par bouturage	Propagation par greffage	Acclimatation	Productivité	Développement T/P/MP
<i>Varieties</i>	<i>Source</i>	<i>Sex</i>	<i>Propagation by cuttings</i>	<i>Propagation by grafting</i>	<i>Acclimation</i>	<i>Productivity</i>	<i>Development T/P/MP</i>
Branca da Espanha	E	F	< 80 %	-	B	B	P
Calabresa	I	F	> 80 %	-	TB	F	MP
Catania 1	I	F	-	*	B	TB	P
Catania 2	I	F	-	*	B	B	P
Catania Paulista	B	M	-	*	-	B	P
Contadini	I	F	< 80 %	-	B	B	P
Fernão Dias	B	F	> 80 %	-	-	B	P
Florio	I	F	-	*	M	F	P
Formosa	F	F	> 80 %	-	TB	B	P
Galiana	B	F	-	*	-	B	T
Iamada	B	F	< 80 %	-	-	B	P
Kokuso 20	J	M	-	*	M	-	T
Kokuso 21	J	M	-	*	M	-	T
Kokuso 27	J	M	-	*	M	-	T
Lopes Lins	B	F	< 80 %	-	M	B	P
Miura	B	F	> 80 %	-	-	B	P
Moretiana	I	F	-	*	TB	B	T
Moscatela	I	F	< 80 %	-	B	B	T
Nezumigaeshi	J	M	-	*	B	B	-
Nostrana	B	F	> 80 %	-	-	B	P
Paduana	B	M	< 80 %	-	-	B	P
Pendula	B	F	< 80 %	-	F	F	P
Rosa	I	F	< 80 %	-	B	TF	P
Rosa da Lombardia	I	F	-	*	M	F	T
Rosa de Limeira	B	F	< 80 %	-	-	TB	P
Rosol	B	F	< 80 %	-	-	TB	P
Selvagem	B	F	< 80 %	-	-	TF	P
Serra das Araras	B	F	> 80 %	-	-	F	P
Siciliana	B	M	> 80 %	-	-	F	P
Talo Roxo	B	F	> 80 %	-	-	F	P
Tiete	B	F	< 80 %	-	-	F	P
Toshiana	B	F	< 80 %	-	-	B	P
Ungaresa	B	M	> 80 %	-	-	B	P

Légende du tableau I / Legend to Table I :

Source : E : Espagne / Spain. I : Italie / Italy. B : Brésil / Brazil. F : Formose / Formosa (Taiwan).

Sexe / Sex : F : Femelle / Female. M : Mâle / Male.

Propagation : * Clones se reproduisant seulement par greffage / Clones that are propagated only by grafting.

Acclimatation / Acclimation : B : Bonne / Good. TB : Très bonne / Very good. M : Mauvaise / Bad.

Productivité / Productivity :

B : Bonne / Good. TB : Très bonne / Very good. F : Faible / Low. TF : Très faible / Very low.

Développement / Development :

P : Précoce / Early. MP : Moyennement précoce / Moderately early. T : Tardif / Late.

L'analyse de ces résultats a permis la planification des croisements possibles entre les clones mâles et femelles présentant des caractéristiques complémentaires. On a ainsi produit des nouveaux individus "hybrides" par deux méthodes distinctes :

- 1) pollinisation ouverte = hybrides naturels ;
- 2) pollinisation contrôlée = hybrides artificiels.

On a obtenu, par la première méthode, 390 plants de différentes progénitures femelles chez lesquelles on a étudié la productivité, la relation tige/feuille, la vigueur de bourgeonnement et, surtout, la capacité de propagation par bouturage (Fonseca et coll., 1985b).

A ce stade du programme, 64 plants prometteurs ont été sélectionnés et clonés par bouturage puis numérotés de IZ 1 à IZ 64 (IZ = Institut de Zootechnie). Seuls 15 clones se sont avérés supérieurs et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau II.

La deuxième méthode, plus élaborée, concerne les croisements contrôlés. On a utilisé 29 clones donnant 57 combinaisons qui offraient de plus grandes possibilités de réussite.

Tableau II. Quelques caractéristiques des clones naturels sélectionnés pour les tests de productivité.

Table II. Some characteristics of the natural clones selected for productivity tests.

Clone	Sexe	Rendement en feuilles g/m de branche	Poids moyen de la feuille (g)	Pourcentage de reproduction par bouturage	Feuilles Forme/Surface
<i>Clone</i>	<i>Sex</i>	<i>Leaf yield g/m of branch</i>	<i>Average leaf weight (g)</i>	<i>Percentage of propagation by cuttings</i>	<i>Leaves Shape/Surface</i>
IZ 3	F	96	2,47	56	E/L
IZ 5	F	78	2,60	86	E/R**
IZ 10	F	62	2,83	76	E/L
IZ 14	F	53	1,93	94	E/R
IZ 18	F	100	3,43	98	E/L**
IZ 26	F	79	1,98	72	E/L
IZ 27	F	65	3,09	56	E/L
IZ 29	F	64	2,09	62	E/R
IZ 30	F	59	2,52	94	E/L
IZ 34	F	75	2,89	82	E/R
IZ 37	F	70	2,34	86	E/L
IZ 40	F	115	3,39	86	E/L
IZ 43	F	83	3,47	74	E/L
IZ 57	F	70	2,29	76	E/R
IZ 64	F/M*	114	4,70	54	E/R

Légende du tableau II / Legend to Table II :

Sexe / Sex : F : Femelle / Female. M : Mâle / Male.

g/m : Gramme par mètre / Gram per meter.

Feuille / Leaf : E : Entière / Entire. L : Lisse / Smooth. R : Rugueuse / Rough.

* Variété femelle avec de très rares fleurs mâles / Female variety with very few male flowers.

** Feuille asymétrique / Asymmetric leaf.

Le nombre de plants obtenus pour chaque combinaison variait en fonction de la présence de fleurs mâles et femelles au stade voulu pour effectuer les pollinisations, de l'abondance ou de la rareté des inflorescences et aussi de la viabilité embryonnaire de la pollinisation.

On a ainsi obtenu 619 plants qui, sur la base des critères de sélection choisis pour la première méthode, ont donné 132 clones parmi lesquels 24 clones prometteurs ont été sélectionnés après examen rigoureux ; leur productivité et leur valeur nutritive ainsi que leur comportement en fonction de différents milieux ont été évalués (Fonseca et coll., 1985c).

Ces clones obtenus par croisement contrôlé ont été identifiés par le sigle IZ suivi du numéro d'ordre de la combinaison des progénitures allant de 1 à 57, séparé par une barre de fraction (/) du numéro de la plante parentale, selon le tableau III.

Tableau III. Quelques caractéristiques des 24 clones artificiels sélectionnés pour les tests de productivité.

Table III. Some characteristics of the 24 artificial clones selected for productivity tests.

Clone	Sexe	Parents Femelle / Mâle (g/m de branche)	Rendement en feuilles (g)	Poids moyen de la feuille	Feuilles Forme/Surface
<i>Clone</i>	<i>Sex</i>	<i>Parent Female / Male (g/m of branch)</i>	<i>Leaf yield (g)</i>	<i>Average leaf weight</i>	<i>Leaves Shape/Surface</i>
IZ 1/17	M	Fernão Dias / Catania Paulista	100,4	5,28	E/R
IZ 2/2	F	Calabresa / Catania Paulista	73,5	3,06	E/R
IZ 3/2	F	Contadini / Catania Paulista	110,7	4,10	E/R
IZ 5/2	M	Br. da Espanha / Catania Paul.	99,3	4,13	E/R
IZ 6/2	F	Lopes Lins / Catania Paulista	90,1	4,09	E/R
IZ 10/1	F	Lopes Lins / Catania Paulista	122,5	5,56	E/R
IZ 10/4	F	Lopes Lins / Catania Paulista	98,0	4,26	E/R
IZ 10/8	F	Lopes Lins / Catania Paulista	81,2	4,27	E/R
IZ 12/3	M	Fernão Dias / Catania Paulista	97,2	3,88	E/R
IZ 13/6	M	Fernão Dias / Kokuso 27	120,7	4,82	E/R
IZ 15/1	F	Calabresa / Nezumigaeshi	93,7	3,74	P/L
IZ 15/7	F	Calabresa / Nezumigaeshi	63,3	1,83	E/L
IZ 19/1	F	Talo Roxo / Kokuso 27	86,8	3,10	E/L
IZ 19/13	F	Talo Roxo / Kokuso 27	130,0	4,06	E/R
IZ 23/8	F	Rosol / Catania Paulista	129,3	5,62	E/R
IZ 29/1	F	Campinas / Nezumigaeshi	100,0	3,57	C/L
IZ 31/1	F	Campinas / Kokuso 27	75,0	2,59	E/R
IZ 42/12	F	Catania 1 / Siciliana	73,6	3,34	E/L
IZ 45/1	F	Formosa / Nezumigaeshi	95,8	4,35	E/L
IZ 49/10	F	Rosol / Nezumigaeshi	79,5	2,74	E/R
IZ 51/1	F	Br. da Espanha / Nezumigaeshi	81,7	3,89	E/R
IZ 54/5	F	Lopes Lins / Catania Paulista	107,3	5,11	P/L
IZ 56/4	F	Formosa / Catania Paulista	97,5	4,24	E/R
IZ 57/2	F	Formosa / Kokuso 27	104,0	4,16	E/L

Légende du tableau III / Legend to Table III :

Sexe / Sex : F : Femelle / Female. M : Mâle / Male.

g/m : Gramme par mètre / Gram per meter.

Forme / Shape : E : Entière / Entire. P : Avec 5 lobes / Having 5 lobes. C : En forme de coeur / Heart-shaped.

Surface : L : Lisse / Smooth. R : Rugueuse / Rough.

TESTS DE PRODUCTIVITE

Les tests de productivités ont été réalisés à l'Unité expérimentale de sériciculture de Limeira (São Paulo), maintenant fermée, qui appartenait à l'Institut de Zootechnie.

L'expérience a été effectuée selon la méthode des blocs aléatoires avec 4 réplicats et les résultats ont été analysés selon la méthode des "split plots", les clones représentant les parcelles et les tailles dans l'année, les sous-parcelles. Les récoltes au cours des différentes années ont ensuite été regroupées et analysées.

Malgré sa faible productivité, la variété "Calabresa" a été utilisée comme témoin car c'était la variété la plus cultivée à cette époque en raison de sa facilité à raciner par les branches (100 %).

L'engrais, à raison de $N_{20}P_{5}K_{15}$ à 30 g/pied/taille, a été recommandé aux sériciculteurs pendant les tests. Les arbres ont été taillés une fois en hiver (mois de juillet) avant le début des récoltes pour uniformiser les plants et 3 à 4 fois par an pendant les 4 à 5 ans de durée des tests (Fonseca et coll., 1986, 1987a, 1987b, 1987c).

RESULTATS OBTENUS

A la suite des tests de productivité, on a sélectionné 8 clones dont 6 obtenus par pollinisation contrôlée et 2 par pollinisation ouverte (Tableau IV).

Tableau IV. Données obtenues pour les meilleurs clones par rapport au témoin Calabresa.

Table IV. Data obtained for the best clones in comparison with the control, Calabresa.

Clones	Méthodes de croisement	Rendement en feuilles (kg/ha/an)	Rendement en cocons (kg/ha/an)	Productivité par rapport à Calabresa
<i>Clones</i>	<i>Crossing methods</i>	<i>Leaf yield (kg/ha/yr)</i>	<i>Cocoon yield (kg/ha/yr)</i>	<i>Productivity in comparison with Calabresa</i>
IZ 56/4	PC	20,416	798	236
IZ 13/6	PC	19,983	781	231
IZ 57/2	PC	18,859	736	218
IZ 19/13	PC	17,821	696	206
IZ 40	PO	16,782	656	194
IZ 3/2	PC	15,917	622	184
IZ 30	PO	14,793	578	171
IZ 15/7	PC	14,274	558	165
Calabresa	-	8,651	338	100

PC : Pollinisation contrôlée / *Controlled pollination*.

PO : Pollinisation ouverte / *Open pollination*.

Quelques uns de ces clones ont été offerts en 1989 à la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (Perea et Holfmann, 1991) qui les a mis en compétition à la ferme "La Catalina" à Pereira

(Colombie) avec les variétés Tai Song (Formose), Kanva 2 et Kanva 2 M5 (Sri Lanka), Miura (Bratac/Brésil) et Calabresa (Italie). Les données obtenues sont présentées dans le tableau V.

Tableau V. Données obtenues dans les tests de compétition réalisés à la ferme "La Catalina" à Pereira, Colombie.

Table V. Results obtained in the competition tests carried out at the farm 'La Catalina' in Pereira, Colombia.

Clones	Source	Rendement en feuilles (kg/ha/an)	Productivité nombre de boîtes/an	Rendement en cocons (kg/ha/an)	Productivité par rapport à Calabresa
<i>Clones</i>	<i>Source</i>	<i>Leaf yield (kg/ha/yr)</i>	<i>Productivity number of boxes/yr</i>	<i>Cocoon yield (kg/ha/yr)</i>	<i>Productivity in comparison with Calabresa</i>
IZ 13/6	Brésil / <i>Brazil</i>	991,71	152	4 560	142
IZ 19/13	Brésil / <i>Brazil</i>	953,30	146	4 380	136
Kanva 2 M5	Sri Lanka	767,66	118	3 540	110
Kanva 2	Sri Lanka	751,74	116	3 480	108
IZ 56/4	Brésil / <i>Brazil</i>	722,38	111	3 330	104
Calabresa	Italie / <i>Italy</i>	698,28	107	3 210	100
Miura	Brésil / <i>Brazil</i>	662,49	101	3 030	94
Tai-Song	Formose / <i>Formosa</i>	644,11	99	2 970	93

Ces résultats montrent qu'en matière agricole, le transfert direct des technologies ne correspond pas toujours à ce que l'on espère, comme le révèlent les différentes performances des clones brésiliens obtenues en milieu colombien (Tableau V) et au Brésil (Tableau III) par rapport à Calabresa. Bien que Calabresa donne normalement une production identique à celle de Miura, le potentiel de production de Miura obtenu lors des tests présentés ici est supérieur ; ceci pourrait être dû à l'effet de l'interaction génotype $\times$ milieu. Par contre, Fonseca et Vencovsky (1979) ont constaté que Calabresa présentait une productivité relative supérieure pour la première année en raison de son racinement rapide et du bourgeonnement exubérant des branches de ce clone lorsqu'il vient d'être planté. Au cours des années suivantes, l'accroissement observé ne suit pas celui des clones sélectionnés.

L'adaptabilité et la stabilité génotypique de quelques clones supérieurs obtenus dans le cadre du programme d'amélioration des mûriers de l'Etat de São Paulo ont été étudiés par Almeida et coll. (1991) d'après la méthode d'Eberhart et Russel (1966) et ils ont isolé des clones présentant une capacité élevée de réponse à des milieux favorables avec le clone IZ 64 ($b = 1,8897$), recommandés aux producteurs utilisant une technologie avancée, ainsi que des clones à grande stabilité de production, comme IZ 1/17 et IZ 29/1 ($b = 0,4955$ et $b = 0,5412$ respectivement) qui présentent tous les deux des moyennes supérieures à celles du clone Calabresa et qui peuvent donc être recommandés aux producteurs utilisant des méthodes de culture conventionnelles.

Fonseca et coll. (1990) ont également étudié l'acceptation de ces clones par le ver à soie (*Bombyx mori* L.) et ont constaté que, à l'exception des clones IZ 57/2 et IZ 30 pour le poids de la coque et IZ 57/2 pour la richesse soyeuse, tous les clones identifiés dans le tableau IV donnaient des valeurs supérieures à celles de Calabresa pour ces deux caractéristiques.

REFERENCES

- ALMEIDA J.E., SOARES A.R., RAMALHO M.A.P., FONSECA T.C. (1991) Stabilité phénotypique chez le mûrier. *Sericologia*, 31(3), 469-474.
- EBERHART S.A., RUSSEL W.A. (1966) Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.*, 6, 36-40.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L. (1985a) Caracterização de algumas variedades de amoreira. *Zootecnia*, 23(2), 111-129.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L. (1985b) Híbridos naturais de amoreira. *B. indús. anim.*, 42(1), 71-77.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L. (1985c) Melhoramento da amoreira por meio da hibridação artificial. *B. indús. anim.*, 42(2), 256-276.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L., SCHAMMASS E.A. (1986) Competição de híbridos artificiais de amoreira. *B. indús. anim.* 43(2), 367-373.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L., SCHAMMASS E.A. (1987a) Competição de híbridos artificiais de amoreira II. *B. indús. anim.*, 44(2), 315-322.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L., SCHAMMASS E.A. (1987b) Competição de híbridos naturais e artificiais da amoreira III. *B. indús. anim.*, 44(2), 323-328.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L., SCHAMMASS E.A. (1987c) Competição de variedades, híbridos naturais e artificiais de amoreira IV. *B. indús. anim.*, 44(2), 329-334.
- FONSECA T.C., ALMEIDA J.E., FONSECA A.S. (1990) Effet de la sélection des mûriers sur l'alimentation des vers à soie. *Sericologia*, 30(4), 469-474.
- FONSECA T.C., VENCOSKY R. (1981) Estimação de parâmetros visando à seleção de híbridos artificiais de amoreira (*Morus alba* L.). *B. indús. anim.*, 38(1), 85-105.
- HAZAMA K. (1968) Breeding of mulberry trees. *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)*, 3(2), 15-19.
- PEREA O., HOLFMANN B.K. (1991) Estudio de adaptación de variedades promisorias de morera (*Morus alba* L.) en la Granja Experimental de "La Catalina", Pereira-Risaralda. *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia*, 25 pp.
- SCARPELLI E. (1969) Viagem à Italia et Japão. *Serviço de Sericicultura*. Campinas, 53 pp.

THE MULBERRY IMPROVEMENT PROGRAMME IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

T.C. FONSECA¹, J.E. ALMEIDA² & F. OKAMOTO²

1. Divisão de Nutrição Animal e Pastagens, D4, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13460-000 Nova Odessa, São Paulo, Brazil.
2. Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura, CEPAS, CP 16, CEP 17450-000, Galia, São Paulo, Brazil.

Keywords: Mulberry, improvement.

INTRODUCTION AND HISTORY

Sericulture in Brazil can be considered as a traditional activity; in certain areas of the State of São Paulo, where it has been practised for almost 100 years, periods of great development alternate with periods of stagnation. At present, Brazilian sericulture uses Japanese techniques that were introduced by industries of the textile sector which command modern industrial parks, healthy egg production institutes and parent strains of *Bombyx mori* L. for production of hybrids which are distributed to farmers in the second instar. Nevertheless, it is well known that, to achieve a good productivity in cocoons with a high silk ratio, mulberry leaves with high nutritive contents and fit for consumption by the silkworm are a prerequisite (Scarpelli, 1968; Hazama, 1968).

With the aim of improving the quality of the feed of silkworms in Brazil, a few clones were introduced from Italy (Catania, Roso, etc.) and from Japan (Kokuso 20, 21, 27 and Nezumigaeshi) which are regarded in Brazil as "noble varieties" owing to their excellent nutritive value and high leaf yield. However, they require grafting as a means of vegetative reproduction, which makes it costly to renew mulberries, which are normally reproduced by cuttings, a method used for local clones that are well adapted to the prevailing pedological and climatic conditions and are called "common varieties".

In order to obtain mulberry clones that can be easily reproduced, have a high nutritive value and lead to a good silk yield, a mulberry improvement programme was initiated in 1965. This programme was first coordinated by the scientists Luis Paolieri and Antonio da Silveira Fonseca who were then working at the Sericulture Department of Campinas (State of São Paulo). From 1975 onwards, it was taken over by the sericulture section of the Institute of Zootechnics under the supervision of Dr Fonseca and her team.

Today, this programme belongs to the CEPAS (Centre of Applied Research in Sericulture) in Galia (State of São Paulo).

METHODOLOGY USED

In the framework of the mulberry improvement programme, 33 clones from the collection of the Sericulture Department of Campinas (State of São Paulo) were screened. These clones were isolated in the areas producing at that time or imported from abroad. The performance of these clones was grouped according to a scale of percentages for a few characters reflecting acclimation, productivity, rate of successful reproduction by cuttings, earliness of sprouting and resistance to pests and diseases, as per the summary shown in Table I (Fonseca *et al.*, 1985a).

Analysis of these results led to the planning of possible crosses between male and female clones showing complementary characters. New individual hybrids were thus produced by two distinct methods, namely:

- 1) open pollination = natural hybrids;
- 2) controlled pollination = artificial hybrids.

The first method gave 390 plants of different female progeny in which the productivity, stem/leaf relation, sprouting vigour and, especially, cutting reproduction ability were studied (Fonseca *et al.*, 1985b).

At this stage of the programme, 64 promising plants were selected and cloned by cuttings then numbered from IZ 1 to IZ 64 (IZ = Institute of Zootechnics). Only 15 clones proved superior and their characteristics are presented in Table II.

The second method, which is more elaborate, concerns controlled pollination. Twenty-nine clones giving 57 combinations were used to ensure greater opportunity of success.

The number of plants obtained for each combination varied according to the presence of male and female flowers at the desired stage to carry out the pollination and determine the abundance or scarceness of inflorescence as well as the embryonic viability of pollination.

Six hundred and nineteen plants were thus obtained, which, on the basis of the criteria selected for the first method, gave 132 clones, of which 24 promising clones were selected after thorough examination; their productivity, nutritive value and behaviour in various environments were assessed (Fonseca *et al.*, 1985c).

The clones that were obtained by controlled pollination were identified by the mark IZ followed by the serial number of the combination of progeny, from 1-57, separated from the number of the parent plant by a stroke (/), as shown in Table III.

PRODUCTIVITY TESTS

The productivity tests were performed at the former Sericultural Experiment Unit of Limeira (São Paulo), which belonged to the Institute of Zootechnics.

The experiment was carried out according to the randomised block design with four replications and the results were analysed by the split plot method, clones representing the plots and prunings during the year, the sub-plots. The harvests in the different years were then pooled and analysed.

In spite of its low productivity, the variety "Calabresa" was used as a control because it was the most widely grown variety at the time due to its good ability to root by branches (100 %).

Fertiliser was recommended to sericulturists at the rate of N₂₀P₅K₁₅ at 30 g/plant/pruning throughout the tests. The trees were pruned once in winter (month of June) before the beginning of harvests to standardise the plants and three to four times during the 4-5 years' tests (Fonseca *et al.*, 1986, 1987a, 1987b, 1987c).

RESULTS OBTAINED

Following the productivity tests, 8 clones were selected, of which 6 were obtained by controlled pollination and 2 by open pollination (Table IV).

Some of these clones were offered to the Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (Perca and Holmann, 1991) who placed them in competition with varieties Tai Song (Formosa), Kanva 2 and Kanva 2 M5 (Sri Lanka), Miura (Bratac/Brazil) and Calabresa (Italy) at the experimental farm 'La Catalina' in Pereira. The data obtained are presented in Table V.

These results show that, in agricultural matters, direct transfer of technology does not always meet expectations, as shown by the different performances of Brazilian clones obtained for Colombian conditions (Table V) and for Brazilian conditions (Table III) in comparison with Calabresa. Although Calabresa expectedly gave a production that was identical to that of Miura, the potential of production of Miura obtained in the tests presented here was higher; this could be due to the effect of genotype × environment interaction. By contrast, Fonseca and Vencovsky (1979) observed that Calabresa showed

a higher relative production for the first year owing to its fast rooting and the exuberant sprouting of the branches of this clone upon planting. In following years, the observed increase did not follow that of selected clones.

Adaptability and genotypic stability of some superior clones obtained within the framework of the mulberry improvement programme in the State of São Paulo were studied by Almeida *et al.* (1991). Using the method of Eberhart and Russel (1966) they isolated clones showing a high ability of response to favourable environments with clone IZ 64 ($b = 1,8897$), recommended to producers using advanced technology, as well as clones with a high stability of production, such as IZ 1/17 and IZ 29/1 ($b = 0,4955$ and $b = 0,5412$, respectively) which both show means that are higher than those of clone Calabresa and which therefore can be recommended to producers using conventional cultivation methods.

Fonseca *et al.* (1990) also studied the acceptability of these clones by the silkworm (*Bombyx mori* L.) and observed that, except for clones IZ 57/2 and IZ 30 for cocoon shell and IZ 57/2 for silk ratio, all the clones identified in Table IV gave higher values than Calabresa for these two characters.

THE SILKWORM CHRYSALIS MAY BE A FOOD SOURCE FOR HUMAN NUTRITION

S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA & RANJIT KAR

Section of Soil Science and Chemistry, Central Sericultural Research and Training Institute,
Berhampore 742 101, West Bengal, India.

A laboratory analysis was conducted to determine the nutritional composition of silkworm delipidated chrysalis powder (DLCP) for human nutrition. Analysis of data reveals that it is a nutritious food. It contains fairly good amounts of moisture, chitin, water-soluble proteins, carbohydrates, amino acids, minerals (potassium, sodium, calcium and phosphorus) and vitamin C besides protein as the major constituent. Moreover, it has a well-balanced amino acid composition. DLCP is adequate in most amino acids and is comparable in lysine, isoleucine, valine, methionine and threonine to the FAO reference pattern for protein.

Keywords: Chrysalis (*Bombyx mori* L.), delipidated chrysalis powder (DLCP), moisture, chitin, water-soluble proteins, carbohydrates, amino acids, vitamin C, crude protein.

INTRODUCTION

The term 'protein' is taken from the Greek word, *proteuo*, which roughly means 'first'. This terminology was suggested in 1840 by Mulder, who clearly recognized that protein was an essential component of human tissues, including body fluids such as blood. It is needed for body building repair and maintenance of body tissues and for synthesis of certain substances like antibodies, plasma proteins, haemoglobin, enzymes, hormones and other protective bodies (Pike *et al.*, 1970). Protein can supply energy if the calorific intake from other foods is inadequate (Srivastava, 1990).

In most of the developing countries of the world, including India, the population is increasing faster than the food supply. These countries are facing the problem of protein-calorie malnutrition because of their large population, low income and lower industrial and technological development. This problem is further aggravated by inadequate distribution of the world's protein resources between the rich and poor. Protein consumption in developed countries is in excess of 100 g per capita per day while the average figure for developing countries is about 48 g, significantly below the FAO/WHO minimum of balanced dietary protein of 54 g per capita per day (FAO, 1964; FAO/WHO, 1965).

Most of the protein requirement of the population of India is achieved by use of vegetable protein; pulses, especially, from the main source in our daily diet. According to the current production of vegetable protein, national consumption is about 50 g per capita per day (Srivastava, 1990). In order to make a significant improvement in protein intake the protein requirement has to be raised to at least 100 g per capita per day. To achieve this target, the production of vegetable protein has to be doubled. However, it seems impossible because of many constraints.

Sources of animal protein like milk, egg, meat and fish are expensive because of their inadequate production.

Unconventional sources of protein, which include oil-seed meals, fish protein and above all insect protein, have a tremendous scope for developing low-cost protein food and for increasing its total availability. Among these unconventional sources of protein the silkworm pupa, or chrysalis as it will

be called here, appears to have a better scope than many other possibilities as food source for human nutrition.

MATERIALS AND METHODS

Chrysalises (pupae) (*Bombyx mori* L.) were collected from the Reeling Section of the Institute and dried in an oven at 70 °C until constant weight was obtained. The dried chrysalises were finely powdered and stored in a desiccator.

Chrysalis powder was taken in a thimble and oil was extracted using a Soxhlet apparatus with hexane as a solvent. The delipidated chrysalis powder (DLCP) was then dried in an oven at 60-70 °C, stored in a desiccator and chemically analysed. The percentage of moisture, chitin and minerals was determined according to the method of the AOAC (1984), nitrogen by a micro-Kjeldahl method (Jackson, 1967) and crude protein content by using a conversion factor of 6.25. The components in minerals were determined by Jackson's method (1967) and vitamin C by Roe and Kuether's method (1943).

For the estimation of water-soluble proteins and carbohydrates, DLCP was homogenised in ice-cold water. Proteins were precipitated from the homogenate by addition of trichloroacetic acid (6% w/v). The residue was separated by centrifugation. The supernatant was used for the estimation of carbohydrates by the method of Trevelyan and Harrison (1952). The residue was dissolved in 0.1 N sodium hydroxide and used for the estimation of proteins by Lowry's method (1951).

For the separation of amino acids, DLCP was digested with 6 N hydrochloric acid in a sealed tube at 110 °C for 16 hours. The hydrolysates were diluted with water and evaporated to dryness until the smell of hydrochloric acid gas disappeared. The residue was then extracted with isopropanol (10%, v/v) and used for paper chromatography following the two-dimensional technique described by Datta *et al.* (1950) using water-saturated phenol (75:25 w/v) for the first run and n-butanol:acetic acid:water (4:1:1, v/v) for the second run as solvents.

Amino acids were located by spraying the chromatogram with ninhydrin solution (0.25% w/v in acetone) and then heating at 65 °C for 15 minutes. The individual amino acids were identified by comparison with a standard map of amino acids prepared under identical conditions in the laboratory. For quantitative estimation of individual amino acids the method of Price (1963) was followed.

RESULTS AND DISCUSSION

The nutritional composition of DLCP was analysed and is presented in Table I. The results show that DLCP is a nutritious food. It contains a balanced amount of moisture, chitin, water-soluble proteins, carbohydrates, amino acids and vitamin C, besides crude protein as the major constituent. In addition, it contains a fairly large amount of nutritionally important minerals like sodium, potassium, calcium and phosphorus. Moreover, it is a food which also contains vitamins, especially vitamin B₂, nicotinic acid, folic acid and vitamin B₁ (Bose *et al.*, 1990). Thus it forms an ideal supplement to prevent malnutrition.

DLCP has a well-balanced amino acid composition. The nutritionally important amino acid contents of DLCP along with the provisional FAO pattern for protein (FAO, 1965) are given in Table II. DLCP is adequate in most of the essential amino acids except phenylalanine and tryptophan, which might have been destroyed at the time of acid hydrolysis (Hawk, 1947). The sulphur-containing amino acids like cystine and cysteic acid are found in a lower quantity, also perhaps due to their partial destruction during acid hydrolysis (Hawk, 1947). DLCP is comparable to the FAO reference pattern for protein in essential amino acids like lysine, isoleucine, leucine, valine, methionine and threonine, but richer in nonessential amino acids like glycine, serine and alanine, having the same trend as that of silk proteins (Bose *et al.*, 1989). In addition, DLCP is rich in proline but moderate in tyrosine, arginine and histidine and poor in glutamic acid.

Yokoyama (1962) reported that pupae had remarkably high nutritive value, superior to that of fish meal and not inferior to that of beef. Krishnaswami *et al.* (1972) opined that pupae can be made fit for human consumption. Several authors suggested that the food value of insects, including the Lepidoptera, is more or less equivalent to that of chicken feed (Bose, 1992).

Table I. Nutritional composition of DLCP.

Tableau I. Composition nutritionnelle de la DLCP.

Constituent <i>Composant</i>	Dry weight (%) <i>Poids sec (%)</i>
Moisture / <i>Humidité</i>	9.88
Chitin / <i>Chitine</i>	4.30
Crude protein / <i>Protéines brutes</i>	71.75
Water-soluble proteins / <i>Protéines solubles</i>	26.10
Carbohydrates / <i>Hydrates de carbone</i>	6.85
Amino acids / <i>Acides aminés</i>	27.35
Minerals / <i>Minéraux</i>	7.13
Potassium	1.86
Sodium	0.068
Calcium	4.44
Phosphorus / <i>Phosphore</i>	0.685
Vitamin C / <i>Vitamine C</i>	187.7*

* The value is expressed in µg/g. Each value represents the mean of three observations.

* Cette valeur est exprimée en µg/g. Chaque valeur représente la moyenne de trois observations.

Table II. Amino acid composition of DLCP and FAO reference pattern for protein.

Tableau II. Composition en acides aminés de la DLCP et modèle de référence de l'OAA pour les protéines.

Protein source	Chrysalis	FAO reference pattern
<i>Source de protéines</i>	<i>Chrysalide</i>	<i>Modèle de référence OAA</i>
Lysine	2.60	4.30
Leucine + isoleucine	6.73	9.30
Valine + methionine / <i>Valine + méthionine</i>	4.95	6.60
Threonine / <i>Thréonine</i>	1.46	2.90
Cystine	0.21	2.10
Tyrosine	1.53	-
Histidine	1.46	-
Arginine	2.47	-
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	0.25	-
Glycine	4.60	-
Serine / <i>Sérine</i>	2.33	-
Alanine	4.90	-
Proline	4.40	-
Cysteic acid / <i>Acide cystéique</i>	0.28	-

Values are expressed in g per 16 g N. Each value represents the mean of three observations

Les valeurs sont exprimées en g pour 16 g N. Chaque valeur représente la moyenne de trois observations.

Though it is hard to believe that humans would eat insects, it is true that tribal people in many countries like Africa, China and Japan once used pupae as food. The ancient Greeks and Romans also used to collect pupae, dry and powder them and finally used the powder in the preparation of bread and cakes. In China, children prefer pupae as food to chocolate. Native American Indians use the dried pupae in flour and chicklets (Bose, 1992).

On the basis of the above findings, it appears that DLCP has great promise as a future supplementary protein food source for human nutrition because of its greater nutritive value and for developing a low-cost protein food. However, further studies are needed to work out the protein efficiency ratio (PER), the structure, and the properties of the protein, which may include testing it in suitable animal models.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly grateful to Dr S.S. Sinha, Director, C.S.R. & T.I., Berhampore, West Bengal, India, for facilities provided. Thanks are due to the Reeling Section for supplying the pupae.

REFERENCES

- AOAC (1984) Official methods of analysis. Publ. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA.
- BOSE A.N. (1992) Protein from insect. Ananda Bazar Patrika, Calcutta Publication (daily newspaper), 21st June, p. 16.
- BOSE P.C., MAJUMDER S.K., SENGUPTA K. (1989) Role of amino acids in silkworm, *Bombyx mori* L., nutrition and their occurrence in haemolymph, silk gland and silk cocoons—a review. Indian J. Seric., 28, 17-31.
- BOSE P.C., MAJUMDER S.K. (1990) Biochemical composition of pupae-waste and its utilization. Indian Silk, 29, 45-46.
- DATTA S.P., DENT C.E., HARRIES H. (1950) An apparatus for the simultaneous production of many two-dimensional paper chromatograms. Science, 112, 621.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1964) Program of food consumption surveys. FAO, Rome, p. 70.
- FAO/WHO EXPERT GROUP (1965) Protein requirements. WHO Technical Report Series No. 301, Rome, FAO Nutrition Meetings Report, Series No. 37.
- HAWK P.B., OSER B.L., SUMMERSON W.H. (1947) Practical physiological chemistry. J & A Churchill Ltd, London, 12th Edition, p. 101.
- JACKSON M.L. (1967) Soil chemical analysis. Prentice Hall of India Pvt Ltd, New Delhi.
- KRISHNASWAMI S., MADHAVA N.R., SURYANARAYAN S.K. (1972) Sericulture manual. 3 Silk reeling. FAO, Rome, Agricultural Services Bulletin, 15/3, p. 57.
- LOWRY O.H., ROSEBEROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- PIKE R.L., BROWN M.L. (1970) Nutrition: an integrated approach. Wiley Eastern Pvt Ltd, New Delhi, p. 33-44.
- PRICE G.M. (1963) The effect of anoxia on metabolism in the adult house fly, *M. domestica*. Biochem. J., 86, 372.
- ROE J.H., KUETHER C.A. (1943) Determination of ascorbic acid in whole blood, plasma or urine. J. Biol. Chem., 147, 399.
- SRIVASTAVA G.P. (1990) Leaf protein: a future food source for human nutrition. Indian Farm., 40, 20-23.
- TREVELYAN W.E., HARRISON J.S. (1952) Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. Biochem. J., 50, 298-303.
- YOKOYAMA T. (1962) Synthesized science of sericulture. Central Silk Board, India, p. 242-253.

LA CHRYSALIDE DE VER A SOIE PEUT CONSTITUER UNE SOURCE DE NOURRITURE POUR LES HUMAINS

S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA & RANJIT KAR

Section of Soil Science and Chemistry, Central Sericultural Research and Training Institute,
Berhampore 742 101, West Bengal, Inde.

Une analyse expérimentale a été réalisée afin de déterminer si la composition nutritionnelle de la poudre de chrysalides de vers à soie dégraissée (DLCP) était adaptée à l'alimentation humaine. L'analyse des données révèle que cet aliment est nutritif. Outre les protéines qui forment le constituant principal, il contient de l'eau, de la chitine, des protéines solubles dans l'eau, des hydrates de carbone, des acides aminés, des minéraux (potassium, sodium, calcium et phosphore) et de la vitamine C en assez grandes quantités. De plus, cet aliment présente une composition en acides aminés bien équilibrée. La DLCP contient des proportions d'acides aminés qui correspondent au profil de référence de la FAO pour ce qui concerne la lysine, l'isoleucine, la valine, la méthionine et la thréonine.

INTRODUCTION

Le terme "protéine" est dérivé du grec "protos" qui signifie approximativement "premier". Cette terminologie a été proposée en 1840 par Mulder qui a identifié les protéines comme composant majeur des tissus humains, y compris de certains fluides comme le sang. Elles sont nécessaires pour la reconstitution et l'entretien des tissus et pour la synthèse de certaines substances comme les anticorps, les protéines plasmatiques, l'hémoglobine, les enzymes, les hormones et autres corpuscules protecteurs (Pike et coll., 1970). Les protéines peuvent fournir de l'énergie lorsque l'apport en calories par d'autres aliments est insuffisant (Srivastava, 1990).

Dans la plupart des pays en voie de développement, y compris l'Inde, la population augmente plus vite que la production de nourriture. Ces pays sont confrontés à un problème de malnutrition en protéines/calories en raison de leur population importante, des faibles revenus et de leur sous-développement industriel et technologique. Ce problème est encore aggravé par la répartition inégale des ressources mondiales en protéines entre les riches et les pauvres. La consommation de protéines dans les pays développés dépasse les 100 g par habitant et par jour ; tandis que le chiffre moyen dans les pays en voie de développement (48 g) est nettement inférieur au minimum de protéines alimentaires recommandé par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (54 g par habitant et par jour) (FAO, 1964 ; FAO/WHO, 1965).

La majeure partie des besoins en protéines en Inde sont comblés par l'utilisation de protéines végétales ; les plantes légumineuses, en particulier, constituent la source principale d'alimentation quotidienne. Selon la production actuelle de protéines végétales, la consommation nationale est d'environ 50 g par habitant et par jour (Srivastava, 1990). Afin d'améliorer de manière significative la nutrition, la consommation de protéines doit passer à 100 g par personne et par jour. Pour atteindre cette cible, il est nécessaire de multiplier par deux la production de protéines végétales. Cependant, cela ne semble pas possible en raison de nombreuses contraintes.

Les sources de protéines animales comme le lait, les oeufs, la viande et le poisson sont onéreuses du fait de leur production insuffisante.

La recherche de sources alternatives de protéines, comme la farine d'oléagineux, les protéines issues de poisson et, surtout, d'insectes, ouvre de nouvelles possibilités pour mettre au point des aliments contenant des protéines à prix abordable et les rendre plus accessibles à l'ensemble de la population. Parmi ces sources alternatives de protéines, la chrysalide de ver à soie semble présenter des avantages par rapport aux autres sources possibles d'aliments pour les humains.

MATERIELS ET METHODES

Les chrysalides (*Bombyx mori* L.) ont été fournies par la section de dévidage de notre Institut et séchées au four à 70 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Les chrysalides séchées ont été pulvérisées finement et stockées dans un dessiccateur.

La poudre de chrysalide a été placée dans un dé à coudre et l'huile a été extraite à l'aide d'un appareil Soxhlet avec de l'hexane comme solvant. La poudre de chrysalide dégraissée (DLCP) a ensuite été séchée au four entre 60 et 70 °C, stockée dans un dessiccateur et analysée chimiquement. Les pourcentages d'humidité, de chitine et de minéraux ont été déterminés selon la méthode de l'AOAC (1984), l'azote par la méthode de micro-Kjeldahl (Jackson, 1967) et le contenu en protéines brutes d'après un facteur de conversion de 6,25. Les constituants minéraux ont été déterminés d'après la méthode de Jackson (1967) et la vitamine C selon la méthode de Roe et Kuehter (1943).

Pour l'estimation des protéines solubles dans l'eau et des hydrates de carbone, la DLCP a été homogénéisée dans de l'eau glacée. Les protéines ont été précipitées de l'homogénat par addition d'acide trichloracétique (6 % p/v). Le résidu a été séparé par centrifugation. Le surnageant a été utilisé pour l'estimation des hydrates de carbone selon la méthode de Trevelyan et Harrison (1952). Le culot a été dissous dans de la soude 0.1 N et utilisé pour l'estimation des protéines, selon la méthode de Lowry (1951).

Pour la séparation des acides aminés, la DLCP a été digérée avec de l'acide chlorhydrique 6 N dans une éprouvette scellée à 110 °C pendant 16 heures. Les hydrolysats ont été dilués dans l'eau et évaporés par séchage jusqu'à disparition de l'odeur du gaz chlorhydrique. Le résidu a ensuite été extrait avec de l'isopropanol (10 % v/v) et utilisé pour la chromatographie sur papier suivant la technique bidimensionnelle décrite par Datta et coll. (1950) avec du phénol saturé en eau (75:25 p/v) pour la première dimension et du N-butanol-acide acétique:eau (4:1:1 v/v) pour la deuxième dimension.

Les acides aminés ont été localisés en vaporisant le chromatogramme avec une solution de ninhydrine (0,25 % p/v dans l'acétone) et par chauffage à 65 °C pendant 15 minutes. Les acides aminés ont été identifiés individuellement par comparaison avec une carte standard des acides aminés préparés dans des conditions identiques en laboratoire. L'estimation quantitative de chaque acide aminé a été réalisée selon la méthode de Price (1963).

RESULTATS ET DISCUSSION

La composition nutritionnelle de la DLCP a été analysée et est présentée dans le tableau I. Les résultats montrent que la DLCP est un aliment nutritif. Outre les protéines brutes comme constituant principal, elle contient de l'humidité, de la chitine, des protéines solubles dans l'eau, des hydrates de carbone, des acides aminés et de la vitamine C dans des proportions équilibrées. De plus, elle contient d'assez grandes quantités de minéraux importants sur le plan nutritionnel, comme le sodium, le potassium, le calcium et le phosphore. Cet aliment contient également des vitamines et, en particulier, de la vitamine B₂, de l'acide nicotinique, de l'acide folique et de la vitamine B₁ (Bose et coll., 1990). Il constitue donc un complément idéal pour prévenir la malnutrition.

La DLCP a une composition équilibrée en acides aminés. Les contenus de la DLCP en acides aminés nutritionnellement importants ainsi que le profil de la FAO pour les protéines (FAO, 1965) sont donnés dans le tableau II. La DLCP contient, en quantités suffisantes, la plupart des acides aminés essentiels, sauf la phénylalanine et le tryptophane, qui pourraient avoir été détruits au cours de l'hydrolyse par les acides (Hawk, 1947). Les acides aminés contenant du soufre, comme la cystine et l'acide cystéique, sont présents en quantités plus faibles, peut-être également du fait de leur destruction partielle durant l'hydrolyse acide (Hawk, 1947). La DLCP est comparable au profil de référence de

la FAO pour les protéines pour ce qui concerne les acides aminés essentiels, comme la lysine, l'isoleucine, la leucine, la valine, la méthionine et la thréonine, mais plus riche en certains acides aminés non essentiels, comme la glycine, la sérine et l'alanine, et présente la même tendance que les protéines de la soie (Bose et coll., 1989). De plus, la DLCP est riche en proline mais contient des quantités moyennes de tyrosine, d'arginine et d'histidine et des quantités faibles d'acide glutamique.

Yokoyama (1962) a observé que les chrysalides ont une valeur nutritive élevée, supérieure à celle de la farine de poisson et comparable à celle du boeuf. Krishnaswami et coll. (1972) pensent que les chrysalides sont propres à la consommation pour les humains. Plusieurs auteurs suggèrent que la valeur alimentaire des insectes, y compris des lépidoptères, est plus ou moins équivalente à celle du poulet (Bose, 1992).

Bien que le fait que les humains puissent manger des insectes soit difficile à croire, il est vrai que les tribus de nombreux pays africains, de Chine ou du Japon ont par le passé utilisé les chrysalides comme source de nourriture. Les Grecs anciens et les Romains collectaient les chrysalides, les séchaient et les pulvérisaient pour les utiliser dans la préparation de pain et de gâteaux. En Chine, les enfants préfèrent les chrysalides au chocolat. Les Amérindiens utilisent les chrysalides séchées dans la farine et le chicklet (Bose, 1992).

Sur la base des résultats obtenus, il apparaît que la DLCP a un potentiel prometteur comme source additionnelle de protéines dans la nutrition humaine en raison de sa valeur nutritive supérieure et du faible coût de sa production. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer le rapport d'efficacité des protéines, la structure et les propriétés des protéines, entre autres par des tests sur des modèles animaux appropriés.

BRIEF INTRODUCTION TO FIVE NEWLY BRED MULBERRY VARIETIES OF 'YU' SERIES AND 'FENG-CHI'

SUN X.-x.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang City, Jiangsu 212018, China.

In this paper, four of the 'Yu' series of new mulberry varieties, Yu-151, Yu-237, Yu-2, Yu-71-1, and a new mulberry hybrid, Feng-chi, are reported. 'Yu' means 'to breed' in Chinese. How these varieties fit into the needs of the national economy and their social significance is discussed.

Keywords: Mulberry variety, Yu-151, Yu-237, Yu-2, Yu-71-1, Feng-chi.

1. TWO NEW EARLY BUDDING (SPROUTING) MULBERRY VARIETIES, YU-151 AND YU-237

Farmers in the main mulberry cocoon production areas of Jiangsu, Zhejiang and Anhui Provinces conventionally begin rearing, or ant brushing, of the spring silkworms on May 1st or 2nd. During the 5th stadium of these worms the following scenes are common in the countryside:

In the cereal fields the ripe wheat urgently needs to be reaped (or else the wheat grains will fall on the ground or germinate if it rains). After the wheat is harvested the same fields, scheduled to be transformed into paddy fields, have to be promptly irrigated, ploughed, well raked and transplanted in a timely manner with rice seedlings (if late, the growing season for the rice will be too short and thermal summation will not be high enough for the paddy to ear normally). At the same time, in the silkworm rearing room many mature larvae await timely mounting on spinning racks (or else they will unmethodically spin useless silk somewhere on the rearing tray). The 5th instar silkworms may also be at their gluttonous feeding stage, requiring intensive labour to bring heavy and voluminous fresh mulberry leaves into the rearing room and removal of large quantities of waste litter (bed refuse). Moreover, in the mulberry gardens many trees, stripped of their leaves, require timely pruning (or the growing season after summer pruning will be too short, leading to a decrease in the mulberry leaf yield in the coming autumn and spring). In sum, this period is characterized by the fact that both the cocoon crop and the cereal crops are contending for labourers and man-days so that the farmers are hurrying reaping and hurrying planting, giving rise to the local name of 'double hurry period'. During this period farmers are most strenuous and hard-working.

The extreme labour tension during this period is caused by the fact that the conventional spring silkworm rearing season and the 'double hurry period' overlap each other at the end of May. The author wondered whether we could rear the spring silkworm much earlier in order to avoid the overlap of the end of the spring rearing season with the 'double hurry period'. The only natural barrier that prevents us from attaining this goal is that, among mulberry varieties, there is no ideal naturally occurring variety that can offer fresh mulberry leaves as early as late April, so the earliest possible date to begin 'ant brushing' is May 1st or 2nd. Hence, the above consequences.

As a result of breeding work carried out during 1959-1978 (Sun *et al.*, 1990), two new early budding varieties, Yu-151 and Yu-237, were developed, making fresh mulberry leaves available as early as late April. Consequently, spring silkworms can be reared 7-8 days earlier than previously. This would enable full use of the genial spring climate, which is especially favourable to the silkworm

during its whole larval period; moreover, the occasional periods of high temperature at the end of May can thus be avoided in order to obtain a higher cocoon yield (for industrial cocoon rearers) and more eggs laid (for grainages). Accordingly, the silk worms may mature earlier and be mounted on spinning racks well before the 'double hurry period' sets in. This would eliminate the need for the cocoon crop to contend with cereal crops for labourers and significantly relieve the labour tension at the end of May.

2. A NEW MULBERRY DWARF DISEASE RESISTANT VARIETY, YU-2

Mulberry dwarf disease is the most destructive disease of mulberry trees in China. The earliest record of occurrence of this disease may be traced back 350 years (Shen, 1644). Since then, this disease has spread to sericultural districts in 13 provinces, and it is still rampant in some major silk production areas. The leaves of diseased trees become small, with a diameter of less than 2 mm, and the internodal distance is around 1 mm. This disease is contagious, transmitted by the vector, the rombic marked leafhopper (Ye *et al.*, 1968-1971). No cure is available and a diseased tree will die within 1-2 years. Indigenous practice is to dig up and dispose of diseased trees to avoid infection of healthy trees.

Initially, there may be only one or two diseased trees in a mulberry garden which may serve as a source of infection. As the incidence rises, the chance of mutual infection will be increasingly greater and then there will be an outburst of disease. The whole garden may be devastated and all diseased trees will have to be dug up. For example, in Chidu, a township district of Wu-Jiang County, a total of 300,000-500,000 trees were removed in 1973 (Xia *et al.*, 1973).

Silkworm rearing farmers who lost mulberry trees to this disease also lost their cocoon crops and hence their confidence in the silk industry. Although some integrated control measures have been taken to combat this disease, yet it is still not possible to keep it in check. Factors that lead to the occurrence of this disease are complicated and we cannot rely on one or two sprayings to kill all of the vector insects. Breeding a disease-resistant mulberry variety is the only economic, practical approach to control.

After 20 years of breeding work, a resistant variety, Yu-2, was developed (Sun *et al.*, 1978), which shows such strong specific resistance to mulberry dwarf disease that it can withstand it as if it were a dreadnaught. When both Yu-2 and Husang-32 were planted together in the mulberry dwarf disease epidemic area, the disease incidence of the former was only 0-1.36% while that of the latter was 15-51%. This means that, once this variety is extended and planted, the tempo of spread of the disease can be instantly halted. Yu-2 can restore verdure to devastated gardens and confidence to the sericulturists, allowing the silk industry to regain its foothold in the epidemic area. Yu-2 is also fairly resistant to another mulberry disease, bacterial dieback. In addition, the leaf yield of Yu-2 is 10% higher than that of the current variety, Husang-32.

3. A NEW ELITE MULBERRY VARIETY, YU-71-1

Recently, high-yield silkworm races have been successfully bred. Accordingly, new elite mulberry varieties must be bred to supply these worms with quality leaves to enable these high-yield worms to spin higher quality silk. So, what is now required of a mulberry variety is not only the quantity of leaves it will yield but, more important, also the quality, or the nutritive value, of the leaves of that variety for the silkworm.

As a result of twenty years (1971-1989) of breeding work, a new elite mulberry variety, Yu-71-1, was developed (Sun *et al.*, 1988). The characters and traits of Yu-71-1 include: leaf blades are large, thick, lustrous and deep green in colour. The weights of a single leaf blade, 100 cm² of fresh leaves, and 100 cm² dried leaves are 6.33 g, 1.856 g, and 0.606 g, respectively, while those of the control variety (Husang-32) are 4.89 g, 1.792 g, and 0.564 g, respectively. After experiments in 3 spring cocoon crops and 3 autumn cocoon crops during 3 successive years, it was found that the average intact cocoon weight and the average cocoon shell weight from 10,000 individual silkworms fed with Yu-71-1 leaves during all larval stages were 5.29% and 4.44% higher, respectively, than the respective average weight of 10,000 silkworms fed on leaves of the current variety, Husang-32. In these

experiments, only one factor differed between the two experimental plots, i.e., two mulberry varieties (Yu-71-1 and Husang-32) were used separately for the bioassay.

4. FENG-CHI MULBERRY VARIETY

Pocket grafting is a conventional method for propagating mulberry in most part of China. By using this method, the same plot of land must be occupied by the seedlings and then by the grafted seedlings (saplings) for at least two years before the output of qualified saplings. Moreover, after the qualified saplings are transplanted to another piece of cultivated land which is intended to be set up as a mulberry garden, 3 years must elapse (for training of the tree types) before a productive mulberry garden is established. In total, it requires 2 years to produce qualified saplings and another 3 years to set up a productive mulberry garden. These time-consuming processes pose a bottleneck preventing the rapid development of the silk industry.

During the fifties, the author imagined breeding an elite cross and sowing the hybrid seeds directly on cultivated land to set up a one-step mulberry garden. The breeding experiments were conducted during 1958-1961 and resumed during 1970-1976. During 1974, from various crosses only a single cross was ideal (Sun *et al.*, 1980). Although its parent plants were not from a pure line, the seedling colony grown from the hybrid seeds showed morphological uniformity between individuals, with coefficients of variation of various morphological traits being less than 15%. The proportion of inferior quality individuals from this cross was less than 7-12%. The word 'Feng-chi' (meaning 'bumper-gallop' in Chinese) was coined to designate this cross.

With the advent of Feng-chi, a new era in mulberry propagation methods has been introduced in appropriate regions of China where grafting is unnecessary and it is only required to sow the Feng-chi mulberry seeds on the main fields using the planting distance typical of an established mulberry garden. At the end of a year, this approach yields productive results in mulberry gardens. Thus, this method is highly economic both in terms of time and space. If this method is scrupulously followed, we can carry out and complete all of the following work in the same year: reap the ripe berries, obtain and sow the seeds, allow them to grow into seedlings, utilize the leaves from these matured seedlings to feed late autumn silkworms, and harvest a crop of cocoons. In addition, in the next complete year we can harvest mulberry leaves totalling 22,500-45,000 kg/ha from the same seedlings. This means that Feng-chi seeds can be used to set up a densely populated and quick-yielding mulberry garden. Moreover, because it has a short internodal distance, medium-sized leaves of elite quality, and high budding percentage, Feng-chi can also be used for shoot rearing.

REFERENCES

- SHEN ?, (1644) (An anonymous author, only his surname is known) An Essay on Agriculture. Supplemented in 1658 by Zhang Lu-qiang. From the book "Researches on Mr Shen's Supplemented Essay on Agriculture, 230 pp. Compiled by Chen H.-l., published in 1958 by Zhong-Hua Press, Beijing.
- SUN X.-x., SHI B.-k., XIA M.-j., YE Y.-b., PAN Y.-l., ZHANG H.-s., WANG D.-c. (1978) The breeding of a disease-resistant and high yielding mulberry variety, Yu-2. Anthology of papers presented at the 1978 annual meeting sponsored by the Agricultural Society of China.
- SUN X.-x., ZHANG H.-s., SHI B.-k., WANG D.-c., PAN Y.-l., WU Z.-j. (1980) Preliminary report on the breeding of Feng-chi, a new mulberry mulberry variety. *Canye Kexue*, 6(1), 36-41.
- SUN X.-x., ZHANG M.-b., PAN Y.-l. (1988) Preliminary report on breeding of the new mulberry variety, Yu-71-1. *Canye Kexue*, 14(2), 55-59.
- SUN X.-x., SHI B.-k., PAN Y.-l., XIA M.-j., ZHANG H.-s., ZHANG M.-b., WU Z.-j., WANG D.-c. (1990) The breeding of two early sprouting mulberry varieties, Yu-151 and Yu-237. *Canye Kexue*, 16(1), 1-4.
- XIA M.-j., GU B.-l., ZHANG M.-b., GU Z.-f., LI X.-k. (1973) Summary of the works done during the summer of 1973 in the extension site of the Sericultural Research Institute in Chidu township district, Wu-Jiang County. 5, Inst. Preserved Archives.

YE Y.-b., GU Z.-f., SHIU L.-h., CHEN P.-g. (1968-1971) The path of transmission of the causal organism of mulberry dwarf disease. Annual Report of Research Work from 1968 to 1971. Sericult. Res. Inst., Chinese Acad. Agricult. Sci., Inst. Preserved Archives.

BREVE PRESENTATION DE CINQ NOUVELLES VARIETES DE MURIER : SERIE "YU" ET "FENG-CHI"

SUN X.-x.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang City, Jiangsu 212018, Chine.

Cet article présente quatre des nouvelles variétés de mûrier de la série "Yu" (Yu-151, Yu-237, Yu-2, Yu-71-1) et un nouvel hybride (Feng-chi). "Yu" signifie "sélectionner" en chinois. Nous verrons dans quelle mesure ces variétés répondent aux besoins de l'économie nationale et quelle est leur signification sur le plan social.

1. DEUX VARIETES DE MURIER A BOURGEONNEMENT PRECOCE, YU-151 ET YU-237

Les fermiers des principales zones de production de cocons, dans les provinces de Jiangsu, Zhejiang et Anhui, commencent traditionnellement l'élevage, ou la levée des larves, des vers à soie de printemps le 1er ou le 2 mai. Lorsque les vers atteignent le 5e âge, il est courant d'observer les scènes décrites ci-dessous dans la campagne.

Dans les champs de céréales, le blé mûr demande à être récolté rapidement (sinon les grains de blé tomberont des épis ou germeront en cas de pluie). Dès que le blé est récolté, ces mêmes champs, qui sont transformés en rizières, doivent être irrigués, labourés, soigneusement râtelés et les plantules de riz doivent être transplantées à temps (en cas de transplantation tardive, la saison de culture du riz sera trop courte et la sommation thermique ne sera pas suffisamment élevée pour que le riz puisse monter en épi normalement). A la même période, dans la pièce d'élevage des vers à soie, un grand nombre de larves arrivées à maturité attendent de monter sur les encabanages (sinon elles fileront, à même la litière et de manière erratique, de la soie rendue inutilisable). Il se peut aussi que les larves du 5e âge en soient à leur stade de voracité qui nécessite une main d'œuvre importante pour leur apporter des quantités volumineuses de feuilles de mûrier fraîches et enlever de grandes quantités de déchets (délitage). De plus, dans les champs de mûrier, de nombreux arbres, dont les feuilles ont été détachées, demandent à être taillés (sinon la période de croissance après la taille d'été sera trop courte, entraînant une diminution du rendement en feuilles à l'automne et au printemps suivant). En résumé, cette période se caractérise par le fait que les fermiers sont confrontés en même temps à la récolte des cocons et à celle des céréales et qu'ils doivent donc récolter et planter dans les plus brefs délais, ce qui a donné naissance à l'expression locale "période de double travail". Au cours de cette période, les fermiers doivent être très actifs et travailler durement.

La tension extrême du travail pendant cette période est due au fait que l'élevage de printemps traditionnel et la "période de double travail" se chevauchent à la fin du mois de mai. L'auteur a donc cherché à savoir s'il n'était pas possible d'élever les vers de printemps beaucoup plus tôt afin d'éviter le chevauchement de la fin de l'élevage de printemps avec la "période de double travail". La seule barrière naturelle est que, parmi les variétés de mûrier, il n'existe aucune variété pouvant donner naturellement des feuilles dès la fin du mois d'avril, aussi la date de levée la plus précoce possible est-elle le 1er ou le 2 mai, d'où les inconvénients décrits ci-dessus.

A la suite d'un travail de sélection réalisé de 1959 à 1978 (Sun et coll., 1990), on a mis au point deux nouvelles variétés à bourgeonnement précoce, Yu-151 et Yu-237, donnant des feuilles de mûrier

fraîches dès la fin avril. En conséquence, les élevages de printemps peuvent commencer 7 à 8 jours plus tôt. Ceci permettrait de tirer un profit maximal du climat de printemps, qui est tout particulièrement propice à tous les stades larvaires du ver à soie ; de plus, on évite ainsi les périodes de fortes températures qui peuvent survenir à la fin du mois de mai et obtenir un meilleur rendement en cocons (pour les élevages à l'échelle industrielle) et un plus grand nombre de pontes (pour les grainages). Les vers à soie peuvent ainsi arriver à maturité plus tôt et être placés sur les encabanages bien avant le début de la "période de double travail". Ceci éliminerait la compétition entre la récolte de cocons et celle de céréales pour les agriculteurs et diminuerait de manière significative la tension de travail à la fin mai.

2. UNE NOUVELLE VARIETE DE MURIER RESISTANTE AU NANISME, YU-2

Le nanisme est la plus destructrice des maladies du mûrier en Chine. Les plus anciens documents citant l'apparition de cette maladie remontent à 350 ans (Shen, 1644). Depuis, elle s'est propagée aux districts séricicoles de 13 provinces et continue de sévir dans certaines des zones principales de production séricicole. Les feuilles des arbres malades sont petites, d'une épaisseur de moins de 2 mm, et la distance internodale est d'environ 2 mm. Cette maladie est contagieuse, elle se transmet par la cicadelle rombique marquée (Ye et coll., 1968-1971). On ne dispose d'aucun remède ; un arbre malade meurt dans les 1 à 2 ans. La méthode de lutte indigène consiste à arracher et jeter les arbres malades afin d'éviter l'infestation des arbres sains.

Au départ, il n'y a qu'un ou deux arbres malades dans une plantation qui constituent la source d'infestation. A mesure que l'incidence augmente, le risque d'infestation croît progressivement jusqu'au déchaînement de la maladie. La totalité de la plantation peut être détruite et tous les arbres malades devront être arrachés. Par exemple, à Chidu, district municipal du Comté de Wu-Jiang, 300 000 à 500 000 arbres ont dû être arrachés en 1973 (Xia et coll., 1973).

Les sériciculteurs qui perdirent des arbres lors de cette épidémie perdirent également leurs récoltes de cocons et ne firent plus confiance à la sériciculture. Bien que des mesures de lutte intégrées aient été prises pour lutter contre cette maladie, il n'est pas encore possible de l'éliminer. Les facteurs qui conduisent à son apparition sont complexes et on ne peut compter sur une ou deux vaporisations pour tuer tous les insectes porteurs. La mise au point d'une variété de mûrier résistante constitue la seule approche économique et pratique de la lutte contre cette pathologie.

Des travaux de sélection sur 20 ans ont abouti à l'élaboration d'une variété résistante, Yu-2 (Sun et coll., 1978) présentant une résistance spécifique si élevée au nanisme qu'elle se comporte comme si elle avait un véritable blindage. Une expérience consistant à planter Yu-2 et Husang-32 dans une zone d'épidémie de nanisme a montré que l'incidence de la maladie était seulement de 0 à 1,36 % pour Yu-2 contre 15,51 % chez Husang-32. Ceci signifie qu'une fois cette variété reproduite et plantée, la propagation de la maladie peut être arrêtée instantanément. Yu-2 peut permettre de rétablir la végétation des plantations dévastées et, ainsi, de redonner confiance aux sériciculteurs en permettant à l'industrie de la soie de revenir dans les zones d'épidémie. Yu-2 est également assez résistant à une autre maladie du mûrier, le dépérissement bactérien. De plus, le rendement en feuilles de Yu-2 est supérieur de 10 % à celle de la variété utilisée actuellement, Husang-32.

3. UNE NOUVELLE VARIETE DE MURIER SUPERIEURE, YU-71-1

Récemment, on est parvenu à isoler des races de vers à soie performantes. Il devient donc nécessaire de sélectionner des variétés de mûrier à haut rendement afin de fournir à ces vers à soie des feuilles de qualité pour leur permettre de filer une soie de meilleure qualité. Ainsi, ce que l'on recherche chez une variété de mûrier, ce n'est pas seulement la quantité de feuilles qu'elle est susceptible de produire mais, surtout, la qualité, ou valeur nutritive, des feuilles de cette variété pour le ver à soie.

Après vingt années de travail de sélection (1971-1989), une nouvelle variété de mûrier supérieure, Yu-71-1, a été sélectionnée (Sun et coll., 1988). Les caractères et les traits de Yu-71-1 sont les suivants : les feuilles sont grandes, épaisses, brillantes et de couleur vert foncé. Les poids d'une feuille, de 100 cm² de feuilles fraîches et de 100 cm² de feuilles sèches sont respectivement de

6,33 g, 1,856 g et 0,606 g pour Yu-71-1 contre 4,89 g, 1,792 g et 0,564 g pour la variété témoin (Husang-32). A la suite d'expériences réalisées sur trois récoltes de printemps et d'automne pendant trois années successives, on a observé que le poids moyen d'un cocon intact et le poids moyen d'une coque soyeuse à partir de 10 000 individus nourris avec des feuilles de Yu-71-1 pendant la totalité de leur stade larvaire sont supérieurs respectivement de 5,29 % et 4,44 % à ceux de 10 000 larves nourries avec des feuilles de la variété utilisée actuellement, Husang-32. Dans ces expériences, un seul facteur diffère entre les deux parcelles expérimentales : les deux variétés de mûrier (Yu-71-1 et Husang-32) ont été utilisées séparément pour le dosage biologique.

4. LA VARIÉTÉ DE MÛRIER FENG-CHI

Le greffage en pépinière est une méthode de reproduction du mûrier couramment utilisée dans la majeure partie de la Chine. Selon cette méthode, une même parcelle de terrain doit être occupée par les semis puis par les semis greffés (plantules) pendant au moins deux ans avant de disposer de plantules qualifiées. De plus, une fois que les plantules qualifiées sont transplantées dans une autre parcelle cultivée qui deviendra une plantation de mûrier, trois années sont nécessaires (pour la formation des types d'arbres) à l'établissement d'une plantation de mûrier productive. Au total, il faut deux ans pour produire des plantules qualifiées et trois ans de plus pour établir une mûraie productive. Ces processus sont longs et créent des obstacles au développement rapide de l'industrie de la soie.

Dans les années cinquante, l'auteur a imaginé de sélectionner un croisement supérieur et de semer les graines hybrides directement dans la terre cultivée afin d'établir une mûraie en une seule étape. Les expériences de sélection ont été réalisées de 1958 à 1961, puis de 1970 à 1976. En 1974, sur plusieurs croisements, un seul s'est avéré idéal (Sun et coll., 1980). Bien que ses parents ne soient pas issus d'une lignée pure, la colonie de plantules cultivées à partir des graines hybrides présente une uniformité morphologique entre individus avec des coefficients de variation pour les divers caractères morphologiques inférieurs à 15 %. La proportion d'individus de qualité médiocre chez ce croisement est inférieure à 7-12 %. Le mot "Feng-chi", qui signifie "galop exceptionnel", a été inventé pour désigner ce croisement.

Avec la mise au point de Feng-chi, une nouvelle étape dans les méthodes de propagation du mûrier a été franchie dans les régions de Chine où le greffage n'est pas indispensable et où il suffit de planter les graines de Feng-chi dans les principaux champs en tenant compte de l'espacement recommandé pour les mûraies établies. Au bout d'un an, cette approche aboutit à des résultats productifs dans les mûraies. Cette méthode est donc tout à fait économique en termes d'espace aussi bien que de temps. Si cette méthode est suivie scrupuleusement, il est possible de récolter des baies mûres, d'obtenir et de semer les graines, d'obtenir les plantules, d'utiliser les feuilles des plantules matures pour l'élevage de fin d'automne et de récolter les cocons sur une même année. De plus, au cours de l'année suivante on obtient un rendement en feuilles de 22 500 à 45 000 kg/ha à partir de ces mêmes plantules. Ceci implique que les graines de Feng-chi peuvent être utilisées pour mettre en place une mûraie dense et à rendement rapide. En outre, cette variété présentant une distance internodale courte, des feuilles de taille moyenne et de qualité supérieure et un pourcentage de bourgeonnement élevé, elle peut également être utilisée pour l'élevage sur rameaux.

Brief note

EUTETRANYCHUS ORIENTALIS (KLEIN) (TETRANYCHIDAE : ACARI), A NEW RECORD OF AN INSECT PEST OF MORUS SPECIES IN NILGIRIS

V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ

Regional Sericultural Research Station, P.B. No. 21, Coonoor - 643 101, India.

Keywords: *Eutetranychus orientalis*, red spider mite, mulberry pest.

The Nilgiris, popularly known as 'the Queen of Hills', is located in the Western Ghats of Tamil Nadu in South India between 11° and 22° north latitude and 76°15' and 77° east longitude. The elevation of the hills ranges from 1000-2636 metres above mean sea level (MSL). The altitude of the Regional Sericultural Research Station at Coonoor is 1780 m above MSL. The annual rainfall varies from 1000 mm to 1400 mm.

The red spider mites, *Tetranychus telarius* (Linn.) and *Tetranychus equatorius* (McGr.), are well established as pests of the mulberry (Pillai and Jolly, 1986). Another species, *Tetranychus ludeni*, Zacher, has also been reported in India (Nair, 1986; Anonymous, 1990). The eriophyid mite, *Aceria mori*, Keifer, has been recorded in India (Channabasavanna, 1966), and it is known to infest bud scales of mulberry plants in Tamil Nadu (Mohanasundaram, 1984).

During March, 1992, a red spider mite was found infesting the tender mulberry leaves of the M5 variety at the Regional Sericultural Research Station, Coonoor. This red spider mite sucks the sap on the ventral side of the leaves and the leaves become pale. The red spider mite has been identified as *Eutetranychus orientalis* (Klein) of the family, Tetranychidae. Perusal of the literature showed that *Eutetranychus orientalis* has been reported in India on tapioca, sweet potato, citrus and potato (Lal and Mukharji, 1980). It has not yet been reported as a pest on mulberry.

This is the first time that this species is reported as a pest on mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr M. Mohanasundaram, Professor of Entomology, Agriculture College, Madurai, for identifying the specimen. Our thanks are also due to Shri S. Sekar, Stenographer of this Station, for having typed the manuscript.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1990) Pests of mulberry and their control. *In* Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. Ed. K. Sengupta, p. 40, United Nations, Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- CHANNABASAVANNA G.P. (1966) A contribution to the knowledge of Indian eriophyid mites (Eriophyoidea: Trombidiformes: Acarina). Univ. Agricult. Sci., Bangalore, India, p. 154.
- LAL L., MUKHARJI S.P. (1980) Seasonal history of three phytophagous mites at Varanasi (Uttar Pradesh). Indian J. Acarol., 4, 61-67.
- MOHANASUNDARAM M., SIVAGAMI M. (1983) Occurrence of the budmite, *Aceria mori* Keifer (Eriophyidae: Aceri), on *Morus alba*, the mulberry plant in Tamil Nadu, its economic significance and control. Indian J. Seric., 22, 75.
- NAIR M.R.G.K. (1986) Insects and mites of crops in India. ICAR, New Delhi.
- PILLAI S.V., JOLLY M.S. (1986) Studies on the population build-up and control measures of the red spider mite, *Tetranychus equatorius* (McGr.). Indian J. Seric., 25, 15-21.

**EUTETRANYCHUS ORIENTALIS (KLEIN) (TETRANYCHIDAE :
ACARI) : PREMIERE OBSERVATION D'UN INSECTE
PARASITE DU GENRE MORUS DANS LES MONTS NILGIRI**

V. THIAGARAJAN, S.K. BHARGAVA, M. RAMESH BABU & B. NAGARAJ

Regional Sericultural Research Station, P.B. No. 21, Coonoor - 643 101, Inde.

Les monts Nilgiri, communément appelés "Reine des Montagnes", sont situés dans les Ghats occidentaux du Tamil Nadu au sud de l'Inde entre 11° et 22° de latitude nord et 76°15' et 77° de longitude est. L'altitude des monts varie de 1 000 à 2 636 mètres au-dessus du niveau de la mer. La Regional Sericultural Research Station de Coonoor est située à une altitude de 1 780 m au-dessus du niveau de la mer. Les précipitations annuelles sont de 1000 mm à 1400 mm.

Les tétranyques *Tetranychus telarius* (Linn.) et *Tetranychus equatorius* (McGr.) sont des parasites connus du mûrier (Pillai et Jolly, 1986). Une autre espèce, *Tetranychus ludeni* Zacher, a également été observée en Inde (Channabasavanna, 1966) ; cette espèce infeste les écailles de bourgeons des plants de mûrier dans le Tamil Nadu (Mohanasundaram, 1984).

Durant le mois de mars 1992, on a observé la présence d'un tétranyque infestant les jeunes feuilles de mûrier de la variété M5 à la Regional Sericultural Research Station de Coonoor. Ce tétranyque suce la sève à partir de la surface ventrale des feuilles, entraînant une chlorose des feuilles. Ce tétranyque a été identifié comme étant *Eutetranychus orientalis* (Klein) de la famille des tétranychidés. La lecture de la documentation révèle qu'*Eutetranychus orientalis* a déjà été observé en Inde sur le tapioca, la patate douce, le citron et la pomme de terre (Lal et Mukharji, 1980) mais pas encore sur le mûrier.

C'est la première fois que ce parasite est observé chez le mûrier.

VARIETAL RESISTANCE OF MULBERRY TO LEAF RUST CAUSED BY *AECIDIUM MORI* BERCLAY

R.S. TEOTIA, S.K. SEN, S.K. MANDAL & S.S. SINHA

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

*High yielding varieties of mulberry, i.e. S₁, S₇₉₉, S₁₆₃₅, C₇₆₃, C₇₇₆, C₁₇₂₆, C₁₇₂₉, Tr₄ and Tr₁₀, were screened against *Aecidium mori* Berclay under field conditions during autumn and spring seasons of 1990-91 and 1991-92. Of these, none was found immune or resistant. However, four varieties, S₁₆₃₅, C₁₇₂₆, C₁₇₂₉ and C₁₇₄₃, were found to be moderately resistant. Varieties S₁₆₃₅ and C₁₇₃₀ showed consistently less infection (%) and percent disease index (PDI) in both years of the study. The remaining varieties were observed to be moderately susceptible. In addition, seasons were also found to influence the varietal responses significantly.*

Keywords: Varietal screening, mulberry, leaf rust.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is attacked by a number of diseases from the time of sprouting to harvesting of leaves, resulting in a considerable loss in foliage yield (Teotia and Sen, 1994). Leaf rust caused by *Aecidium mori* Berclay is an important foliar disease responsible for low nutritive values and defoliation during autumn and spring seasons (Wang, 1980; Teotia and Mandal, 1991). Cultivation of disease-resistant varieties offers the best approach to disease management when coordinated with appropriate agronomical practices. Only a few exotic and indigenous varieties of mulberry have been screened for resistance against *Aecidium* leaf rust (Boraiah *et al.*, 1987), leaving ample opportunity to screen for additional promising ones. It is therefore thought imperative to screen high yielding mulberry varieties for resistance to this disease.

MATERIALS AND METHODS

Experimental material and agronomical practices:

Ten promising varieties, i.e., S₁ (Mandalaya), S₇₉₉, S₁₆₃₅, C₇₆₃, C₇₇₆, C₁₇₂₆, C₁₇₂₉, C₁₇₃₀, Tr₄ and Tr₁₀, evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal), India, were tested against *Aecidium mori* (leaf rust) under field conditions during autumn and spring seasons of 1990-91 and 1991-92. Each variety was maintained in a 100 sq. foot plot (2' × 1.5' spacing) in a split plot design with three replications. Plants were pruned at quarterly intervals in the first weeks of March, June, September and December. Other agronomical practices like digging, weeding, irrigation, manure and fertilizer application (N:P:K @ 300:180:120 kg/ha/yr in four split doses) were carried out according to the recommended package of practices. Varieties were allowed to undergo heavy infection under natural field conditions.

Screening procedure:

Disease incidence was recorded during November (80 days), January (50 days old) and March (80 days old) each year by randomly selecting five plants in each replication, avoiding the border rows. In each plant the total number of diseased and healthy leaves was recorded on three branches

to calculate the percentage of disease incidence (PDI) following the formula adopted by McKinney (1923) using the following grades.

0 = No infection.

I = 1-10% leaf area infected.

II = 11-25% leaf area infected.

III = 26-50% leaf area infected.

IV = 51-75% leaf area infected.

V = 76-100% leaf area infected.

$$\text{PDI} = \frac{\text{Sum of numerical values}}{\text{Total number of leaves observed} \times \text{Maximum grading (5)}} \times 100$$

Accordingly, varieties were grouped into six categories, i.e., 0, I, II, III, IV and V, indicating, immune, resistant, moderately resistant, moderately susceptible, susceptible and highly susceptible.

Table I. Summary of means for infection percentage.*

Tableau I. Moyennes obtenues pour le pourcentage d'infestation.*

Varieties Variétés	Year / Année		Season** / Saison**			Mean Moyenne
	1990-91	1991-92	S ₁	S ₂	S ₃	
S ₁	47.67	58.70	60.52	45.05	53.98	53.18
S ₇₉₉	50.40	59.48	59.01	51.28	54.53	54.94
S ₁₆₃₅	48.20	59.35	60.87	47.21	53.25	53.78
C ₇₆₃	50.40	66.24	58.09	52.67	64.20	58.32
C ₇₇₆	46.20	68.11	64.09	46.70	60.67	57.15
C ₁₇₂₆	51.40	60.25	58.36	50.79	58.33	55.82
C ₁₇₂₉	47.19	60.49	53.36	52.24	55.93	53.84
C ₁₇₃₀	44.85	59.32	58.47	42.28	55.51	52.08
Tr ₄	49.07	67.19	59.65	51.64	63.09	58.13
Tr ₁₀	51.04	69.89	64.01	52.05	65.33	60.47
Mean / Moyenne	48.64	62.90	59.64	49.19	58.48	

CD at 5% / Intervalle de confiance à 5 %:

For year / Pour l'année: 1.368

For variety / Pour la variété: 3.059

For season / Pour la saison: 1.675

Year × variety / Année × variété: 4.326

Year × season / Année × saison: 2.369

Variety × season / Variété × saison: 5.298

Year × variety × season / Année × variété × saison: 7.493

Standard error / Ecart type: 2.676

* Transformed values / Valeurs transformées.

** Pooled for 1990-91 and 1991-92.

** Regroupées pour 1990-91 et 1991-92.

S₁: November / Novembre.

S₂: January / Janvier.

S₃: March / Mars.

Table II. Summary of means for percent disease incidence.

Tableau II. Moyennes obtenues pour le pourcentage d'incidence de la maladie.

Varieties Variétés	Year / Année		Season* / Saison*			Mean Moyenne
	1990-91	1991-92	S ₁	S ₂	S ₃	
S ₁	17.66	35.77	23.41	23.65	33.08	26.71
S ₇₉₉	18.95	39.42	23.81	32.23	31.52	29.18
S ₁₆₃₅	12.70	29.03	16.64	20.34	25.62	20.87
C ₇₆₃	20.35	42.47	25.69	26.87	41.68	31.41
C ₇₇₆	24.90	41.02	28.03	28.83	42.62	32.96
C ₁₇₂₆	14.86	34.78	18.14	26.67	29.65	24.82
C ₁₇₂₉	13.54	33.77	15.25	26.75	28.97	23.66
C ₁₇₃₀	13.22	28.53	18.90	18.03	25.70	20.87
Tr ₄	21.48	39.40	26.64	26.95	37.73	30.44
Tr ₁₀	22.14	42.61	27.46	29.43	40.25	32.38
Mean / Moyenne	17.98	36.68	22.40	25.97	33.62	

CD at 5% / Intervalle de confiance à 5 %:

For year / Pour l'année: .985

For variety / Pour la variété: 2.202

For season / Pour la saison: 1.206

Year × variety / Année × variété: 3.115

Year × season / Année × saison: 1.706

Variety × season / Variété × saison: 3.815

Year × variety × season / Année × variété × saison: 5.395

Standard error / Ecart type: 1.297

* Pooled for 1990-91 and 1991-92.

* Regroupées pour 1990-91 et 1991-92.

S₁: November / Novembre.S₂: January / Janvier.S₃: March / Mars.

Table III. Analysis of variance (mean sum of squares).

Tableau III. Analyse de variance (somme des carrés moyens).

Source Source	DF DF	Percent disease index Indice de la maladie (%)	Infection percentage Pourcentage d'infestation
Replication / Réplicat	2	.4770312 E + 01	.1300208 E + 02
Year / Année	1	.1506930 E + 05**	.9152138 E + 04**
Variety / Variété	9	.3932764 E + 03**	.1293511 E + 03**
Year × variety / Année × variété	9	.3282418 E + 02**	.8697854 E + 02**
Season / Saison	2	.1972266 E + 04**	.1969135 E + 04**
Year × season / Année × saison	2	.5131556 E + 04**	.1957565 E + 04**
Variety × season / Année × saison	18	.5325034 E + 02**	.6477354 E + 02**
Year × variety × season	18	.9257096 E + 02**	.7748434 E + 02**
Année × variété × saison			
Error / Ecart	118	.1113563 E + 02	.2148072 E + 02

DF: Degree of freedom / Degré de liberté. ** Significant at 1% level / Significatif au seuil de 1 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Varietal reaction to leaf rust disease varied significantly (Tables I and II). Of the ten high yielding test varieties none could be rated as immune or resistant. Four varieties, viz. S1635, C1730, C1729 and C1726, were found moderately resistant. Amongst them varieties like S1635 and C1730 consistently showed lower infection percentage and PDI in both years 1990-91 and 1991-92. The remaining varieties were found to be moderately susceptible. This is in concurrence with the study of Boraiah *et al.* (1987), who observed varieties C763 and C776 to be moderately susceptible to this pathogen.

Table IV. Effect of weather parameters on seasonal responses of mulberry varieties to *Aecidium mori*.

Tableau IV. Effet des paramètres météorologiques sur les réactions saisonnières des variétés de mûrier à *Aecidium mori*.

Months <i>Mois</i>	1990-1991					1991-92				
	Mean infection % and PDI value	Temp. (°C)		RH (%)	RF (mm)	Mean infection % and PDI value	Temp. (°C)		RH (%)	RF (mm)
		Max.	Min.				Max.	Min.		
<i>Infestation moyenne (%) et valeur PDI</i>	<i>Temp. (°C)</i>		<i>RH (%)</i>	<i>RF (mm)</i>	<i>Infestation moyenne (%) et valeur PDI</i>	<i>Temp. (°C)</i>		<i>RH (%)</i>	<i>RF (mm)</i>	
	Max.	Min.				Max.	Min.			

September <i>Septembre</i>		34.0	22.97	82.20	194.5		32.93	22.2	82.1	188.5
October <i>Octobre</i>		29.9	21.63	87.50	82.0		32.04	22.08	80.77	91.0
November <i>Novembre</i>	57.55 (23.16)	30.1	15.90	67.95	Nil <i>Néant</i>	61.74 (21.33)	27.12	14.86	64.76	57.5
December <i>Décembre</i>		26.3	9.16	64.19	Nil		24.34	10.31	66.05	7.5
January <i>Janvier</i>	43.23 (14.54)	23.87	8.01	63.87	Nil <i>Néant</i>	55.15 (37.01)	22.2	11.40	70.0	14.5
February <i>Février</i>		28.41	11.27	68.0	Nil <i>Néant</i>		25.55	13.25	57.13	19.5
March <i>Mars</i>	45.14 (16.24)	33.45	15.5	47.92	Nil <i>Néant</i>	71.82 (50.60)	33.78	19.69	44.39	Nil <i>Néant</i>
Mean <i>Moyenne</i>	48.64 (17.98)	29.43	14.92	68.8	+276.5	62.90 (36.28)	28.28	16.26	66.46	378.5

* Transformed values / Valeurs transformées.

** PDI values are given in parentheses.

** Les valeurs du PDI sont données entre parenthèses.

+ Total rainfall / Précipitations totales.

Temp.: Temperature / Température.

RH: Relative humidity / Humidité relative.

RF: Rainfall / Précipitations.

Under the weather conditions prevailing at the experimental site (Table IV), disease incidence (PDI) was observed to be significantly higher in the 1991-92 seasons with values of 29.03 to 42.61 in contrast to 12.70 to 24.90 in the 1990-91 seasons (Table II). Other responses of the varieties also varied from season to season. The PDI was significantly lower during the November sampling, and gradually increased during January and March (Table II), whereas the infection percentage was significantly lower in January than at other sampling periods (Table I).

The higher incidence of leaf rust during 1991-92 was presumably due to lower fluctuations in temperature, supported by moderate relative humidity and high rainfall distributed consistently over 85.71% of the growth period than in 1990-91, when greater fluctuations in temperature and less precipitation distributed over only 28.57% of the growth period were recorded (Table IV). The study thus indicates that variability among genotypes to *Aecidium mori* is not only governed by genetic factors but also influenced by the length of the crop growth period and variable environmental factors at the experimental site (Bell, 1981).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Shri B.P. Nair, Assistant Director (Statistics) of this Institute, for analysing the data.

REFERENCES

- BELL A.A. (1981) Biochemical mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 21-81.
 BORAIGH G., SHREE M.P., NARAYANA GOWDA S.N. (1987) Screening of mulberry plants for foliar diseases in the germ plasm bank. *Sericologia*, 27(2), 165-176.
 McKINNEY H.H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.*, 26, 195-210.
 TEOTIA R.S., MANDAL S.K. (1991) Controlling leaf rust disease of mulberry. *Indian Silk*, 29(12), 12-14.
 TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. *Sericologia*, 34(1), 1-18.
 WANG H. (1980) Rust of mulberry (*Aecidium mori*). *Nat. Sci. Coun. Mon.*, 8(7), 604-615.

RESISTANCE VARIETALE DU MURIER A LA ROUILLE FOLIAIRE PROVOQUEE PAR *AECIDIUM MORI* BERCLAY

R.S. TEOTIA, S.K. SEN, S.K. MANDAL & S.S. SINHA

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

On a testé la résistance à Aecidium mori des variétés de mûrier performantes S₁, S₇₉₉, S₁₆₃₅, C₇₆₃, C₇₇₆, C₁₇₂₆, Tr₄ et Tr₁₀ en milieu naturel au cours du printemps et de l'automne 1990-91 et 1991-92. Parmi ces variétés, aucune n'est immunisée ou résistante. Cependant, quatre variétés, C₁₆₃₅, C₁₇₂₆, C₁₇₂₉ et C₁₇₃₀, sont modérément résistantes. Les variétés S₁₆₃₅ et C₁₇₃₀ présentent des pourcentages d'infestation et d'incidence de la maladie (PDI) inférieurs au cours des deux années considérées. Les autres variétés sont modérément sensibles. De plus, les saisons influent également de manière significative sur la réponse variétale.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est affecté par un certain nombre de maladies, depuis le bourgeonnement jusqu'à la récolte des feuilles, entraînant une perte considérable du rendement en feuilles (Teotia et Sen, 1994). La rouille foliaire, provoquée par *Aecidium mori* Berclay est une maladie foliaire grave provoquant une diminution de la valeur nutritive et une défoliation au cours des saisons de printemps et d'automne (Wang, 1980 ; Teotia et Mandal, 1991). La culture de variétés résistantes constitue la meilleure approche dans la lutte contre les maladies lorsqu'elle est combinée avec des méthodes agronomiques appropriées. La résistance à *Aecidium mori* n'a été étudiée que chez quelques variétés de mûrier exotiques et indigènes (Boraiah et coll., 1987), et il existe donc encore de nombreuses possibilités d'études de variétés prometteuses. Nous avons estimé qu'il était impératif d'examiner la résistance à cette maladie chez des variétés de mûrier performantes.

MATERIELS ET METHODES

Matériel expérimental et méthodes agronomiques :

Dix variétés de mûrier prometteuses, c'est-à-dire S₁ (Mandalaya), S₇₉₉, S₁₆₃₅, C₇₆₃, C₇₇₆, C₁₇₂₉, C₁₇₃₀, Tr₄ et Tr₁₀, isolées au Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore (Bengale occidentale, Inde) ont été examinées pour leur résistance à *Aecidium mori* (rouille foliaire) en conditions naturelles au cours du printemps et de l'automne de 1990-91 et de 1991-92. Chaque variété a été cultivée dans une parcelle de 100 pieds carrés (= 929 m²) (intervalle de 2' × 1,5') selon la configuration des parcelles scindées avec trois réplicats. Les plants ont été taillés tous les trimestres au cours de la première semaine de mars, de juin, de septembre et de décembre. D'autres méthodes agronomiques, comme le bêchage, le désherbage, l'irrigation, la fumure et l'application d'engrais (N:P:K à raison de 300:180:120 kg/ha/an en quatre doses égales) ont été utilisées, conformément à l'ensemble des pratiques agronomiques recommandées. On a soumis les variétés à une infestation forte dans les conditions naturelles du milieu.

Protocole d'examen :

L'incidence de la maladie a été enregistrée en novembre (après 80 jours), janvier (après 50 jours) et mars (après 80 jours) tous les ans en sélectionnant cinq plants au hasard dans chaque réplicat, sauf

les plants situés en bordure. Pour chaque plant, le nombre total de feuilles malades et saines a été enregistré sur trois branches afin de calculer le pourcentage d'incidence de la maladie (PDI), suivant la formule adoptée par McKinney (1923) en utilisant les degrés suivants :

0 = pas d'infestation.

I = 1 à 10 % de surface foliaire infestée.

II = 11 à 25 % de la surface foliaire infestée.

III = 26 à 50 % de la surface foliaire infestée.

IV = 51 à 75 % de la surface foliaire infestée.

V = 76 à 100 % de la surface foliaire infestée.

$$PDI = \frac{\text{Somme des valeurs numériques}}{\text{Nombre total de feuilles observées} \times \text{Degré maximal (5)}} \times 100$$

Les variétés ont ainsi été réparties en six catégories, 0, I, II, III, IV et V signifiant respectivement immunisé, résistant, modérément résistant, modérément sensible, sensible et fortement sensible.

RESULTATS ET DISCUSSION

La réaction variétale à la rouille foliaire varie de manière significative (Tableaux I et II). Sur les dix variétés performantes considérées, aucune n'a pu être classée comme étant immunisée ou résistante. Quatre variétés, S1635, C1730, C1729 et C1726, sont modérément résistantes ; parmi ces dernières, C1635 et C1730 présentent des pourcentages d'infestation et d'incidence de la maladie inférieurs pour les deux années 1990-91 et 1991-92. Les autres variétés sont modérément sensibles. Ceci corrobore les travaux de Boraiah et coll. (1987) qui ont observé que les variétés S763 et C776 étaient modérément sensibles à cet agent pathogène.

Dans les conditions météorologiques du site d'étude (Tableau IV), l'incidence de la maladie (PDI) est nettement plus élevée en 1991-92 avec des valeurs de 29,03 à 42,61 contre 12,70 à 24,90 en 1990-91 (Tableau II). Les autres réponses des variétés varient également en fonction des saisons. Le PDI est nettement plus faible pour les échantillons de novembre et augmente progressivement en janvier et mars (Tableau II), tandis que le pourcentage d'infestation est significativement plus faible pour le mois de janvier que pour les autres périodes d'échantillonnage (Tableau I).

L'augmentation de l'incidence de la rouille en 1991-92 semble être due à des fluctuations moins importantes de la température accompagnées d'une humidité relative plus faible et d'un taux de précipitations réparti de manière plus uniforme sur 85,71 % de la période de croissance au cours de cette année qu'en 1990-91, année durant laquelle on a relevé des fluctuations plus fortes de la température et des précipitations moins importantes réparties sur seulement 28,57 % de la période de croissance (Tableau IV). Cette étude indique donc que la variabilité de la résistance à *Aecidium mori* entre les génotypes n'est pas seulement gouvernée par des facteurs génétiques mais est également influencée par la durée de la période de croissance des plants et par les fluctuations des facteurs environnementaux sur le site expérimental (Bell, 1981).

SURVEY ON THE DISTRIBUTION OF THE ROOT-KNOT NEMATODE (*MELOIDOGYNE INCOGNITA*) IN CERTAIN MULBERRY GROWING AREAS OF KARNATAKA (INDIA)

GOVINDAIAH, S.B. DANDIN*, V. GUNASEKHAR, CHIKKANNA & R.K. DATTA

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

A survey was conducted in mulberry growing areas of Bangalore, Mandya and Mysore Districts of Karnataka State to determine the distribution and intensity of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). The percentage of disease incidence was 57.74, 61.86 and 13.00 in Bangalore, Mandya and Mysore Districts, respectively. In Bangalore District, the incidence was greater in the Ramanagaram area (50.00-96.60%), with a root-knot index of 1.19-3.41 compared to the Anekal area. In Mandya District, the disease incidence ranged from 33.4-83.4%, with a root-knot index of 1.41-2.87. In Mysore District, the incidence and severity were much less. Maximum intensity was seen in sandy soils under irrigated conditions in Bangalore and Mandya Districts compared to the lowest incidence in clay soils under rainfed conditions of Mysore District.

Keywords: Survey, distribution, *Meloidogyne incognita*, Karnataka, mulberry.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is affected by a number of diseases, of which the root-knot nematode disease caused by *Meloidogyne incognita* is a serious one due to the perennial nature of mulberry and the endoparasitic habit of the nematode. It was first reported in the USA by Bessey in 1911. Subsequently, it was reported in other countries, viz., Japan (Nozu, 1940), Australia (Colbran, 1958), India (Narayanan *et al.*, 1966), Brazil (Campos *et al.*, 1974), USSR (Adylov, 1979) and China (Zhou *et al.*, 1982). In addition to causing a reduction of 10-12 per cent leaf yield, the disease also affects leaf quality (Govindaiah, 1990; Campos *et al.*, 1974; Saha *et al.*, 1983). Although the disease has been reported in different parts of India, there is no detailed information available on the distribution of the root-knot nematode on mulberry. Hence, a survey was undertaken in a few randomly selected villages of Bangalore, Mandya and Mysore Districts of Karnataka State (India) to determine the distribution and intensity of *M. incognita*.

MATERIALS AND METHODS

A total of forty villages in the above three districts were selected covering 15 villages from Bangalore, 11 from Mandya and 14 from Mysore. In each village, 12 gardens were surveyed during 1986-87 and the nematode disease incidence and severity were recorded.

The total number of healthy and nematode-infested gardens was recorded and the percentage of disease incidence was calculated. From each mulberry garden, 10 plants were randomly uprooted, washed thoroughly free of soil and the number of galls/plant was recorded. Based on the number of

* Present address: Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, India.

galls/plant, the disease intensity, expressed as the root-knot index, was calculated for each village using the following scale of 1-5:

- 1 = 0 galls: healthy,
 2 = 1-25 galls/plant: light,
 3 = 26-50 galls/plant: medium,
 4 = 51-75 galls/plant: high,
 5 = 75 and above galls/plant: very high.

Additional information, such as temperature, rainfall, type of farming (irrigated/rainfed) and area of mulberry cultivation, was recorded.

Table I. Distribution of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on mulberry in Bangalore District.

Tableau I. Répartition du nématode de la galle des racines (*Meloidogyne incognita*) sur le mûrier dans le district de Bangalore.

Sl no.	Name of the village	Soil type	Type of farming irrigated/rainfed	Number of gardens surveyed	Area (ha)	% disease incidence	Mean RKI
N° de série	Nom du village	Type de sol	Mode cultural avec/sans irrigation	Nombre de plantations étudiées	Surface (ha)	Pourcentage d'incidence de la maladie	RKI moyen
Ramanagaram Taluk							
1	Shanubhaganahalli	RS	IG	12	9.70	66.70	2.45
2	Mangadahalli	RS	IG	12	4.05	75.00	2.95
3	Gowdyana Doddi	RL	IG	12	3.30	83.34	3.08
4	Kailancha	RL	IG	12	0.95	75.00	3.00
5	Bannikuppe	RL	IG	12	11.90	91.60	3.41
6	Huchaladoddi	RS	IG	12	1.60	83.34	2.69
7	Krishnapura Doddi	RL	IG	12	0.80	75.00	2.95
8	Mottedoddi	RL	IG	12	4.90	96.60	3.10
9	Chikkamudavadi	RS	IG	12	7.20	83.34	3.17
10	Anjavadi	RS	IG	12	2.90	Nil	Nil
11	Chikkanahalli	RL	IG	12	1.80	50.00	2.22
Anekal Taluk							
12	Bidaraguppe	RS	IG	12	5.20	33.40	1.33
13	Gigala	RL	IG	12	2.90	16.70	1.19
14	Indalabale	RL	IG	12	3.20	Nil	Nil
15	Attibale	RS	IG	12	3.80	41.67	1.50
Total/mean / Total/moyenne				180	61.00	57.74	2.33

RS: Red sandy. RL: Red loamy. IG: Irrigated garden. RKI: Root-knot index.

RS : Sableux rouge. RL : Argileux rouge. IG : Plantation irriguée. RKI : Indice de galles des racines.

RESULTS AND DISCUSSION

The gardens surveyed in Bangalore and Mandya Districts were under irrigated conditions, while in Mysore District 64.3% was under rainfed conditions and 35.7% under irrigated conditions (Tables I, II and III). The soil of mulberry gardens varied from place to place. In Bangalore and Mandya Districts, most of the gardens had sandy type of soil, and in Mysore District they had clay types of soils. The annual average rainfall and temperature were 1123.6 mm, 1033.0 mm and 934.2 mm, and 24.8 °C, 25.8 °C and 26.4 °C, respectively, in Bangalore, Mandya and Mysore Districts during 1986-87. There was not much variation in the mean temperature recorded in all three Districts. However, rainfall was greater in Bangalore and Mandya Districts compared to Mysore District (Tables IV and V).

Table II. Distribution of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on mulberry in Mandya District.

Tableau II. Répartition du nématode de la galle des racines (Meloidogyne incognita) sur le mûrier dans le district de Mandya.

Sl no.	Name of the village	Soil type	Type of farming irrigated/rainfed	Number of gardens surveyed	Area (ha)	% disease incidence	Mean RKI
N° de série	Nom du village	Type de sol	Mode cultural avec/sans irrigation	Nombre de plantations étudiées	Surface (ha)	Pourcentage d'incidence de la maladie	RKI moyen
1	Thorebommanahalli	RS	IG	12	18.0	58.40	2.00
2	Madenahalli	RS	IG	12	12.0	66.70	2.57
3	Boppasamudra	RS	IG	12	15.2	50.00	1.82
4	Gudigere	RS	IG	12	8.0	66.70	2.40
5	Karakahalli	RL	IG	12	9.2	66.70	2.50
6	Doddarasinakere	RL	IG	12	8.2	75.00	2.53
7	Hosahalli	RL	IG	12	11.2	56.00	1.96
8	Honnalagere	RS	IG	12	18.3	58.40	1.87
9	Kagepura	RS	IG	12	9.0	75.00	2.76
10	Thalagavadi	RS	IG	12	11.0	83.40	2.87
11	Kalamuddana Doddi	RL	IG	12	8.3	33.40	1.41
Total/mean / Total/moyenne				132	128.4	61.86	2.24

RS: Red sandy. RL: Red loamy. IG: Irrigated garden. RKI: Root-knot index.

RS : Sableux rouge. RL : Argileux rouge. IG : Plantation irriguée. RKI : Indice de galles des racines.

The data indicate that the disease incidence was greater in Bangalore and Mandya Districts than in Mysore District and the average percentage disease incidence was 57.74, 61.80 and 13.00, respectively. In Bangalore District, the disease was prevalent in all 15 villages surveyed except in Indalabale and Anjavadi (Table I). The disease incidence ranged from 16.70% to 96.60% in this District. The incidence was very high in Mottedoddi (96.60%), followed by Bannikuppe (91.60%), Gowdyana Doddi, Huchaladoddi and Chikkamudavadi (83.34%) villages of the Ramanagaram area.

Most of the gardens were 5-10 years old and severe root-galling and decaying of roots were observed. Growth was not uniform and plants often showed stunting and yellowing of leaves. In the Anekal area, out of four villages surveyed the disease was prevalent in three villages, namely, Bidaraguppe, Gigala and Attibale. However, when compared to the Ramanagaram area, the disease incidence was much lower in the Anekal area. In Mandya District, the disease was observed in all 11 villages surveyed (Table II). The disease incidence ranged from 33.4 to 83.4%. In Mysore District, out of 14 villages surveyed the disease incidence was observed only in 5 villages, with 25-50% disease incidence.

Table III. Distribution of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on mulberry in Mysore District.

Tableau III. Répartition du nématode de la galle des racines (*Meloidogyne incognita*) sur le mûrier dans le district de Mysore.

Sl no.	Name of the village	Soil type	Type of farming irrigated/rainfed	Number of gardens surveyed	Area (ha)	% disease incidence	Mean RKI
N° de série	Nom du village	Type de sol	Mode cultural avec/sans irrigation	Nombre de plantations étudiées	Surface (ha)	Pourcentage d'incidence	RKI moyen
1	Hykanur	BC	RG	12	9.4	Nil	Nil
2	Agara	BC	IG	12	9.9	41.60	1.40
3	Mamballi	BC	RG	12	2.8	Nil	Nil
4	Kinakalli	BC	IG	12	14.1	Nil	Nil
5	Uthamballi	BC	IG	12	10.3	Nil	Nil
6	Theramballi	BC	IG	12	6.0	25.00	1.20
7	Kunthur	BC	RG	12	4.0	Nil	Nil
8	Mugur	BC	IG	12	11.1	25.00	1.27
9	Hosahalli	RL	RG	12	5.0	0.00	Nil
10	Madarahalli	BC	RG	12	3.0	0.00	Nil
11	Thimmarayanapura	BC	IG	12	5.5	0.00	Nil
12	Kempanapalya	BC	IG	12	4.0	0.00	Nil
13	Srirampura	RL	IG	12	4.0	50.00	1.65
14	Jayapura	RL	IG	12	3.0	41.50	1.60
Total/mean / Total/moyenne				168	92.3	13.00	0.50

BC: Black clay / Argile noir. RS: Red sandy / Sableux rouge. RL: Red loamy / Argileux rouge. IG: Irrigated garden / Plantation irriguée. RG: Rainfed garden / Plantation non irriguée. RKI: Root-knot index / Indice de galle des racines.

The disease severity, expressed as the root-knot index (RKI) on a scale of 1-5, was maximum in Bangalore District followed by Mandya and Mysore Districts. In Bangalore District, it ranged from 1.19 to 3.41, and the maximum disease index was recorded in the Ramanagaram area. In Mandya

District, it ranged from 1.41 to 2.87, whereas, in Mysore District, the intensity was much less, ranging from 1.20 to 1.65.

Table IV. Monthly temperature in the places of survey conducted during 1986-87 in Bangalore, Mandya and Mysore Districts.

Tableau IV. Température mensuelle des sites étudiés entre 1986 et 1987 dans les districts de Bangalore, Mandya et Mysore.

Months Mois	Temperature (°C) / Température (°C)								
	Bangalore			Mandya			Mysore		
	1986	1987	Mean Moyenne	1986	1987	Mean Moyenne	1986	1987	Mean Moyenne
January / Janvier	23.0	23.5	23.5	24.1	22.8	23.4	24.3	22.5	23.4
February / Février	25.3	23.2	24.2	25.6	24.3	24.9	26.5	24.2	25.1
March / Mars	26.9	24.5	25.7	26.8	24.9	25.8	28.4	28.7	28.5
April / Avril	28.8	29.1	28.9	29.2	28.9	29.0	30.1	30.2	30.1
May / Mai	27.7	25.1	26.4	29.3	24.7	27.0	29.2	28.8	29.0
June / Juin	25.4	26.7	26.0	26.8	26.9	26.8	26.2	27.0	26.6
July / Juillet	24.2	25.0	24.8	24.6	25.8	25.2	25.7	27.1	26.4
August / Août	23.2	23.7	23.4	25.4	26.6	26.0	26.0	26.4	26.2
September / Septembre	24.5	25.6	25.0	27.0	26.0	26.0	26.5	26.6	26.3
October / Octobre	23.9	25.0	24.4	25.1	25.2	25.1	24.8	26.6	25.7
November / Novembre	22.9	24.3	23.6	25.4	24.2	24.8	25.5	24.8	25.1
December / Décembre	22.9	24.1	23.5	25.2	25.1	25.1	25.0	25.4	25.2
Mean / Moyenne	24.8	24.9	24.8	26.2	25.4	25.8	26.5	26.4	26.4

Maximum incidence and intensity of the disease were observed in sandy type of soil under irrigated conditions in Bangalore and Mandya Districts. This may be attributed to the favourable soil moisture and the sandy nature of soil, which favoured the establishment of a nematode population. Similar observations of high incidence of root-knot disease have been seen in tobacco (Martin, 1962), tomato (Wallace, 1963) and banana (Lakshmanmurthy, 1983). Further, disease severity was higher in older gardens than in new ones. The disease was not observed in Mysore District where mulberry was grown under rainfed conditions. This may be attributed to the clay type of soil with less rainfall and soil moisture. However, some incidence was recorded in clay and red loamy soils under irrigated conditions in this district. Similar results showing poor establishment of root-knot disease in clay soils under rainfed conditions were observed by Abu-Gharbieh (1982) and Sasser *et al.* (1983) in vegetable crops.

In India, unlike agriculture, in sericulture there are only limited mulberry varieties in the field. Most of the farmers' gardens surveyed were with Kanva-2 variety and very few were with local variety, especially under rainfed conditions. As per our evaluation both the varieties were moderately susceptible to the disease, having an index of 4.0 and 4.4 root-knot galls, respectively (Govindaiah, 1990).

Table V. Monthly rainfall in the places of survey conducted during 1986-87 in Bangalore, Mandya and Mysore Districts.

Tableau V. Précipitations mensuelles des sites étudiés entre 1986 et 1987 dans les districts de Bangalore, Mandya et Mysore.

Months Mois	Rainfall (mm) / Précipitations (mm)								
	Bangalore			Mandya			Mysore		
	1986	1987	Mean Moyenne	1986	1987	Mean Moyenne	1986	1987	Mean Moyenne
January / Janvier	23.5	-	11.7	15.4	-	7.7	12.4	-	6.2
February / Février	5.0	-	2.5	10.8	-	5.4	8.7	-	4.3
March / Mars	-	20.3	10.1	-	9.3	4.6	3.0	6.2	4.6
April / Avril	13.0	29.4	21.2	42.2	7.1	21.1	20.0	31.8	25.5
May / Mai	116.5	108.1	112.3	96.5	75.6	86.0	93.1	30.1	61.6
June / Juin	164.1	70.5	117.3	48.5	130.9	89.7	80.3	168.0	124.1
July / Juillet	146.1	22.5	84.3	42.1	40.8	32.4	21.0	44.3	65.3
August / Août	180.9	49.9	115.4	41.5	57.6	49.5	54.2	114.1	84.1
September / Septembre	267.6	166.7	217.1	305.5	228.5	276.0	223.2	212.2	217.8
October / Octobre	99.1	336.5	217.8	360.3	280.1	320.2	209.5	296.2	252.8
November / Novembre	100.0	211.2	155.6	114.1	110.0	112.0	77.1	103.1	90.1
December / Décembre	2.6	113.7	58.1	11.4	54.9	33.1	4.0	55.8	29.9
Total	1118.4	1128.8	1123.6	1070.3	995.8	1033.0	806.5	1062.0	934.2

Similarly, the planting density/spacing adopted by the farmers in the areas surveyed was 2' x 2' spacing in irrigated and 3' x 3' in rainfed gardens. In mulberry, a significant influence of planting density on the incidence of foliar fungal and bacterial diseases has been observed (Govindaiah *et al.*, 1990). However, in root-knot disease such studies have not been conducted.

Hence, the effect of different spacing and mulberry varieties on nematode multiplication were not considered in the present study.

REFERENCES

- ABU-GHARBIIECH W.I. (1982) Distribution of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* in Jordan. *Nematologica*, 28, 34-37.
- ADYLOV F.K. (1979) Nematode pests of mulberry. Sheik, Tashkent, No. 1, 10-11. Central Asian Res. Inst. Sericulture, Tashkent, USSR. From Rafe Rativnyl Zhurnal, Fitopatologica, 6, 79-176.
- BESSEY E.A. (1911) Root-knot and its control. US Dep. Agric. Bur. Pl. Indi., Bull. No. 217, 89 pp.
- COLBRAN R.C. (1958) Studies of plant and soil nematodes. II Queensland host records of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). The Queensland J. Agricult. Sci., 15, 101-136.
- CAMPOS A.R., LORDELLO L.G.E., ABREU O.C., OLIVIRA D.A. (1974) Incidence of *Meloidogyne* on mulberry varieties. In *Trabalhos apresentados de Seuriao de Nematologia*. Ed. L.G.B. Dordello, Piracicaba, Brazil.
- GOVINDAIAH (1990) Studies on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry. Ph.D. Thesis. Univ. of Mysore, India.

- GOVINDAIAH, SHARMA D.D., CHOUDHURY P.C., MALLIKARJUNA B., MADHAVA RAO Y.R. (1990) Incidence of fungal diseases of mulberry under different agronomical practices. *Sericologia*, 30(2), 237-242.
- LAKSHMANMURTHY (1983) Studies on burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1983) Thorne, 1949, on banana in Karnataka. M.Sc. (Agric.) Thesis, Univ. Agricult. Sci., 148 pp.
- MARTIN G.C. (1962) Population levels of nematodes in roots and soil around root-zones of tea, sugar cane, tobacco and wheat grown in the Federation of Rhodesia and Nyasaland. *Rhod. Agric. J.*, 59, 28-35.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1966) A note on the occurrence of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood in local mulberry. *Indian J. Seric.*, 5, 33-34.
- NOZU Y. (1940) Experiments relating to the prevention and protection from nematodes. Shimane Senshi Tokuho, 95 pp.
- SAHA S.S., SINHABABU S.P., SUKUL M.C. (1983) The effect of nematode infestation on mulberry plants and their effect on feeding silkworm (*Bombyx mori* L.). *Nematologica*, 29, 463-467.
- SASSER J.M., EISENBECK T.O., CARTER C.C. (1983) The international *Meloidogyne* project; its goals and accomplishments. *Ann. Rev. Phytopath.*, 21, 271-278.
- WALLACE H.R. (1963) The biology of plant parasitic nematodes. Edward Arnold Ltd., London, 280 pp.
- ZHOU S. (1982) Identification of root-knot nematodes of mulberry. *J. Sericult. Sci. China*, 8, 1-5.

ETUDE DE LA REPARTITION DU NEMATODE DE LA GALLE DES RACINES (*MELOIDOGYNE INCOGNITA*) DANS CERTAINES ZONES DE CULTURE DE MURIER DU KARNATAKA (INDE)

GOVINDAIAH, S.B. DANDIN*, V. GUNASEKHAR, CHIKKANNA & R.K. DATTA

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

*Une étude a été réalisée dans les zones de culture du mûrier des districts de Bangalore, Mandya et Mysore de l'Etat du Karnataka afin de déterminer la répartition et l'intensité du nématode de la galle des racines (*Meloidogyne incognita*). Les pourcentages d'intensité de la maladie sont de 57,74, 61,86 et 13,00 respectivement dans les districts de Bangalore, Mandya et Mysore. Dans le district de Bangalore, l'incidence est plus forte dans la région de Ramanagaram (50,00-96,60 %) que dans la région d'Anekal, avec un indice de galle des racines de 1,19-3,41. Dans le district de Mandya, l'incidence de la maladie varie de 33,4 % à 83,4 %, avec un indice de galle des racines de 1,41 à 2,87. Dans le district de Mysore, l'incidence et la sévérité de la maladie sont nettement plus faibles. L'intensité maximale a été relevée dans les zones irriguées à terre sableuse des districts de Bangalore et de Mandya et l'intensité minimale dans les zones non irriguées à terre argileuse du district de Mysore.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est affecté par un certain nombre de maladies ; parmi celles-ci, la galle des racines, provoquée par *Meloidogyne incognita*, est une maladie grave du fait de la nature pérenne du mûrier et du caractère endoparasite du nématode. Elle a été observée pour la première fois aux Etats-Unis par Bessey en 1911. Par la suite, elle a été observée dans d'autres pays : le Japon (Nozu, 1940), l'Australie (Colbran, 1958), l'Inde (Narayanan et coll., 1966), le Brésil (Campos et coll., 1974), l'URSS (Adylov, 1979) et la Chine (Zhou et coll., 1982). Outre le fait qu'elle entraîne une réduction de 10 à 12 % du rendement en feuilles, cette maladie affecte également la qualité des feuilles (Govindaiah, 1990; Campos et coll., 1974; Saha et coll., 1983). Bien que cette maladie ait été observée dans plusieurs régions de l'Inde, on ne dispose d'aucune information sur la répartition du nématode de la galle des racines chez le mûrier. Une étude a donc été réalisée dans quelques villages pris au hasard des districts de Bangalore, Mandya et Mysore dans l'Etat du Karnataka (Inde) afin de déterminer la répartition et l'intensité de *M. incognita*.

MATERIELS ET METHODES

On a choisi au hasard quarante villages dans ces trois districts, soit 15 villages pour le district de Bangalore, 11 pour le district de Mandya et 14 pour le district de Mysore. Dans chaque village, 12 plantations ont été observées de 1986 à 1987 et l'incidence et la sévérité du nématode ont été enregistrées.

Les nombres totaux de plantations saines et de plantations infestées ont été enregistrés et le pourcentage d'incidence de la maladie a été calculé. Dix plants sélectionnés au hasard ont été prélevés

dans chaque plantation, lavés soigneusement pour éliminer la terre, et le nombre de galles/plant a été enregistré. Sur la base du nombre de galles/plant, l'intensité de la maladie, exprimée en indice de galle des racines, a été calculée pour chaque village en utilisant l'échelle suivante :

- 1 = 0 galle par plant : sain,
- 2 = 1 à 25 galles par plant : légèrement infesté,
- 3 = 26 à 50 galles par plant : moyennement infesté,
- 4 = 51 à 75 galles par plant : fortement infesté,
- 5 = ≥ 75 galles par plant : très fortement infesté.

On a également relevé des informations concernant la température, les précipitations, le mode cultural (avec/sans irrigation) et la zone de culture du mûrier.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les plantations observées dans les districts de Bangalore et de Mandya sont irriguées, tandis que, dans le district de Mysore, 64,3 % sont sous régime pluvial et 35,7 % sont irriguées (Tableaux I, II et III). Le type de terrain des plantations varie selon l'endroit. La plupart des plantations ont un terrain de type sableux dans les districts de Bangalore et de Mandya et un terrain de type argileux dans le district de Mysore. Les précipitations et la température annuelles moyennes en 1986-1987 sont de 1123,6 mm, 1033,0 mm et 934,2 mm et de 24,8 °C, 25,8 °C et 26,4 °C respectivement dans les districts de Bangalore, Mandya et Mysore. La température moyenne enregistrée varie peu entre les trois districts. En revanche, les précipitations sont plus importantes dans les districts de Bangalore et de Mandya que dans le district de Mysore (Tableaux IV et V).

Les données indiquent que l'incidence de la maladie est plus forte dans les districts de Bangalore et de Mandya que dans le district de Mysore. Les pourcentages moyens d'incidence de la maladie sont respectivement de 57,74, 61,80 et 13,00. Dans le district de Bangalore, l'incidence de la maladie est élevée dans les 15 villages étudiés, sauf Indalabale et Anjavadi (Tableau I) avec des pourcentage de 16,70 % à 96,60 pour ce district. L'incidence est très forte dans les villages de Mottedoddi (96,60 %), de Bannikuppe (91,60 %), de Gowdyana Doddi, de Huchaladoddi et de Chikkamudavadi (83,34 %) de la région de Ramanagaram. La plupart des plantations ont entre 10 et 15 ans d'âge et présentent un taux élevé d'infestation par la galle et de dépérissement des racines. La croissance n'est pas uniforme et les plants présentent souvent des feuilles étiolées et jaunies. Dans la région d'Anekal, la maladie est présente dans trois des quatre villages étudiés : Bidaraguppe, Gigala et Attibale. Cependant, l'incidence de la maladie est beaucoup plus faible dans cette région que dans la région de Ramanagaram. Dans le district de Mandya, la maladie a été observée dans les 11 villages étudiés (Tableau II). L'incidence de la maladie varie de 33,4 à 83,4 %. Pour ce qui concerne le district de Mysore, la maladie est présente dans 5 des 14 villages étudiés, avec une incidence de 25 à 50 %.

La sévérité de la maladie, exprimée en indice de galle des racines (RKI) sur une échelle de 1 à 5, est maximale dans le district de Bangalore par rapport aux districts de Mandya et de Mysore. Dans le district de Bangalore, il varie de 1,19 à 3,41 et l'indice est maximal dans la région de Ramanagaram. Dans le district de Mandya, il varie de 1,41 à 2,87 mais il est beaucoup plus faible dans le district de Mysore et se situe entre 1,20 et 1,65.

L'incidence et l'intensité maximales de la maladie ont été observées dans les zones irriguées de type sableux des districts de Bangalore et de Mandya. Ceci pourrait être dû à l'humidité et à la nature sableuse du sol qui favorisent l'établissement d'une population de nématodes. Une incidence élevée de la maladie a également été observée chez le tabac (Martin, 1962), la tomate (Wallace, 1963) et la banane (Lakshanmurthy, 1983). De plus, la sévérité de la maladie est plus forte dans les plantations âgées que dans les plantations jeunes. La maladie n'a pas été observée dans le district de Mysore où le mûrier est cultivé sans irrigation. Ceci pourrait être attribué au caractère argileux du sol et au faible taux de précipitations et d'humidité. Cependant, une incidence a également été observée dans les sols argileux et argileux rouge irrigués dans ce district. Des résultats similaires montrant que la galle des racines s'établissait peu dans les zones argileuses non irriguées ont été obtenus par Abu-Gharbieh (1982) et Sasser et coll. (1983) chez les cultures légumières.

En Inde, contrairement à l'agriculture, on utilise en sériciculture un nombre limité de variétés de mûrier. La plupart des plantations étudiées utilisent la variété Kanva-2 et très peu la variété locale, particulièrement en régime pluvial. D'après notre évaluation, ces deux variétés sont moyennement sensibles à la maladie, avec des indices respectifs de 4,0 à 4,4 galles des racines (Govindaiah, 1990).

De même, la densité/l'espacement de plantation adoptée par les fermiers dans les zones étudiées est de 2' x 2' en terrain irrigué et de 3' x 3' en terrain non irrigué. Chez le mûrier, l'influence de la densité de plantation sur l'incidence des maladies foliaires fongiques et bactériennes est significative (Govindaiah et coll., 1990). Cependant, cet aspect n'a pas été étudié pour ce qui concerne la galle des racines.

L'effet d'espacements et de variétés de mûrier différents n'a donc pas été prise en compte dans cette étude.

ROLE OF N, P AND K NUTRIENTS ON *IN VIVO* NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN LEAVES OF *QUERCUS SERRATA* THUN.

M.K. GHOSH*, M.K.R. NOAMANI*, P.K. DAS* & R.C. SRIVASTAVA**

* Regional Tasar Research Station (CSB), Imphal - 795002, Manipur, India.

** Life Science Department, Manipur University, Canchipur, Imphal - 795003, Manipur, India.

*Leaf spray treatment of different concentrations of mineral nutrients (KH_2PO_4 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$ and H_2NCONH_2) were given to *Quercus serrata* seedlings. The seedlings were raised in polythene bags containing soil. The *in vivo* nitrate reductase activity (NRA) was determined in leaves at different ages, and the optimum concentration of each nutrient was established. With optimum doses of all nutrients high levels of NRA were maintained up to 21 days of spraying. Observations on NRA were further confirmed by direct treatment and translocation experiments. These observations are of use in prescribing the optimum doses and thus combating the loss due to supra-optimal doses.*

Keywords: Mineral nutrients, nitrate reductase activity, *Quercus serrata*.

INTRODUCTION

In India about 58 species of oak (*Quercus* sp.) are distributed from Jammu and Kashmir in the west to Manipur in the north-east all along the temperate and sub-Himalayan belt. Because of the lack of quality foliage, the expected level of cocoon production could not be achieved. Hence, improvement of foliage quality with respect to chemical constituents of leaves seems to be an essential part of present-day needs. In this respect, some work with fertilizer application has been carried out by a number of workers but these studies are mostly confined to parameters related to the plant growth and yield. For example, improvement in shoot and root growth of oak seedlings have been achieved by foliar application of fertilizers (Dixon *et al.*, 1981a, 1984). Inoculation of oak seedlings with mycorrhizal fungi has also been reported to improve seedling growth in greenhouse and nursery trials (Dixon *et al.*, 1981a, 1981b; Maronek and Hendrix, 1979). Most of the studies with fertilizers use NH_4NO_3 , H_2NCONH_2 , P_2O_5 and KCl in different concentrations.

In the present paper *in vivo* activity of the first enzyme of nitrogen metabolism—the nitrate reductase—has been thoroughly studied with respect to foliar application of a number of mineral nutrients, including N, P, K and S.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and chemicals:

Seeds of *Quercus serrata* were collected from the natural forest of Imphal during the month of October-November, 1990. Analytical grade chemicals were used for foliar spray and biochemical estimations.

Seed germination and seedling growth:

Surface-sterilized seeds (with 2% bleaching powder for 5 min.) were soaked in tap water for 72 h. The seeds were heaped and covered with a clean wet gunny bag. Germination started after 18 days of soaking. The germinated seeds were transferred to a polythene bag filled with soil medium

(FYM:sand:soil: 1:1:1). Watering was carried out on alternate days. The seedlings were raised in natural conditions.

Foliar treatment of mineral nutrients:

Solutions of different concentrations (1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mM) of four nutrients (potassium dihydrogen orthophosphate, potassium chloride, ammonium sulphate and urea) were prepared in distilled water. Equal volumes of each nutrient (5 ml/plant) were sprayed on the foliage of 2-month-old plants using a microsprayer. Three replicates were used for each treatment. The plants were allowed to grow under natural conditions. The experiments were conducted during May, 1991.

***In vivo* nitrate reductase activity (NRA):**

The *in vivo* NRA was determined in fresh leaves on day zero, i.e., just before spray treatment, and continued at weekly intervals for three weeks. The NRA was determined by the method of Hageman and Hucklesby (1971) with slight modification by Srivastava *et al.* (1980). The assay mixture contained 0.25 ml KNO₃ (100 mM), 0.25 ml N-propanol (5%, v/v) and 2 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 250 mg fresh leaves. After 30 min. of incubation at 32 ± 1 °C, 1 ml of the assay mixture was tested for the NO₂ formed using 1 ml of suphanilamide (1% in 1.5 N HCl) and 1 ml of N-(1-naphthyl)ethylene diamine dihydrochloride (0.02%, w/v in distilled water). This step leads to the formation of a purple complex of azo dye (λ -max 540 nm). NaNO₂ was used as a standard.

Specific studies on *in vivo* NRA:

To determine the optimum concentrations of various mineral nutrients on *in vivo* NRA, two additional experiments were conducted. These were:

(i) Direct treatment of nutrients in the assay mixture for NR:

In this, determination of *in vivo* NRA in leaves was carried out in the presence of different concentrations of nutrients in the assay mixture for an incubation period of 30 min. The final concentrations of salts maintained in the assay mixture were 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mM. In all cases, the control was supplied with distilled water.

(ii) Translocation experiment:

In this, shoots were cut from the basal portion of two-month-old plants and immersed in 20 ml solutions of different concentrations of the four nutrients which were kept in brown vials for translocation through the shoots for 20 h. The concentrations for this experiment were the same as for the direct treatment. The sets were kept under a 100 W tungsten lamp at a distance of 1 metre. After the translocation period was over, *in vivo* NRA was measured in leaves as was done earlier.

All of the experiments were conducted in triplicate and were repeated twice. All of the colorimetric determinations were carried out on a Bausch and Lomb Spectronic 20. Statistical analyses were carried out as necessary.

RESULTS

Nitrate reductase activity (NRA) in sprayed leaves:

The *in vivo* NRA increased in control plants with age up to 14 days of spraying, followed by a tendency to level off on day 21. With all of the mineral nutrients, the NRA was enhanced by an increase in the concentrations to a certain level (Table I). However, in the case of 10.0 mM urea inhibition was observed, as shown in Table I. The optimum concentrations for three nutrients (KCl, KH₂PO₄, and (NH₄)₂SO₄) were observed at 5.0 mM, while for urea it was obtained at 2.5 mM (Table I). Thus, the NRA was dose-dependent with all minerals. Among the NPK fertilizers, KCl and (NH₄)₂SO₄ proved equally effective, followed by KH₂PO₄. Urea was least effective.

NRA versus direct treatment of mineral nutrients with the assay mixture:

All mineral nutrients, except urea and ammonium sulphate, increased the NRA with increasing doses up to a certain level; moreover, the response was dose-dependent. The optimum doses were:

0.25 mM KCl, 0.1 mM KH_2PO_4 , as shown in Table II. Urea and ammonium were inhibitory at all concentrations (0.01 to 10.0 mM).

Table I. *In vivo* nitrate reductase activity (NRA) at different ages in fresh leaves sprayed with different concentrations of nutrients.

Tableau I. *Activité nitrate réductase (NRA) à différents âges chez des feuilles fraîches vaporisées avec des éléments nutritifs à différentes concentrations.*

Concentration of nutrients (mM)	NRA ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ leaf fresh weight)		
	Plant age (days after spraying)		
	7	14	21
Concentration en éléments nutritifs (mM)	NRA ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h/g}$ feuille poids sec)		
	Age de la plante (en jours après traitement)		
	7	14	21
0 (control / témoin)	$2.13 \pm 0.02^*$	2.55 ± 0.05	2.55 ± 0.03
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
1.0	2.98 ± 0.09	3.40 ± 0.05	2.84 ± 0.25
2.5	3.69 ± 0.12	3.96 ± 0.17	3.40 ± 0.41
5.0	4.26 ± 0.21	5.11 ± 0.16	4.68 ± 0.35
10.0	3.69 ± 0.22	3.97 ± 0.18	3.55 ± 0.38
CD at 5% level	0.012	0.025	0.108
H_2NCONH_2			
1.0	2.27 ± 0.03	2.69 ± 0.21	3.05 ± 0.16
2.5	3.12 ± 0.08	3.69 ± 0.07	3.90 ± 0.17
5.0	2.55 ± 0.11	3.12 ± 0.01	3.19 ± 0.13
10.0	1.56 ± 0.15	1.84 ± 0.15	2.27 ± 0.15
CD at 5% level	0.035	0.079	0.095
KH_2PO_4			
1.0	2.69 ± 0.23	3.12 ± 0.22	2.84 ± 0.21
2.5	3.12 ± 0.35	3.97 ± 0.05	3.55 ± 0.25
5.0	4.11 ± 0.17	4.68 ± 0.08	4.26 ± 0.24
10.0	3.26 ± 0.27	3.69 ± 0.16	3.26 ± 0.29
CD at 5% level	0.036	0.057	0.072
KCl			
1.0	2.98 ± 0.12	3.69 ± 0.03	3.26 ± 0.01
2.5	3.69 ± 0.06	4.26 ± 0.21	3.83 ± 0.06
5.0	4.11 ± 0.08	5.11 ± 0.31	4.40 ± 0.15
10.0	3.12 ± 0.15	3.40 ± 0.25	3.14 ± 0.22
CD at 5% level	0.012	0.085	0.098

* Standard error of the mean / *Ecart type de la moyenne* ($N = 3$).

Table II. *In vivo* nitrate reductase activity (NRA) in fresh leaves in the direct treatment experiments with different concentrations of mineral nutrients.

Tableau II. *Activité nitrate réductase (NRA) chez des feuilles fraîches traitées directement avec des éléments nutritifs minéraux à différentes concentrations.*

Concentration of nutrients (mM)	NRA (u mol NO ₂ ⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ leaf fresh weight)			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Mineral nutrients H ₂ NCONH ₂	KH ₂ PO ₄	KCl
Concentration en éléments nutritifs (mM)	NRA (u mol NO ₂ ⁻ /h/g feuille poids sec)			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Eléments nutritifs minéraux H ₂ NCONH ₂	KH ₂ PO ₄	KCl
0 (control / témoin)	2.13 ± 0.15*	1.98 ± 0.11	2.13 ± 0.17	1.91 ± 0.21
0.01	1.98 ± 0.04	1.77 ± 0.33	2.27 ± 0.25	1.98 ± 0.21
0.05	1.84 ± 0.23	1.34 ± 0.18	2.34 ± 0.31	2.05 ± 0.31
0.10	1.77 ± 0.12	1.31 ± 0.32	2.48 ± 0.43	2.20 ± 0.24
0.25	1.70 ± 0.04	1.27 ± 0.14	2.34 ± 0.21	2.41 ± 0.08
0.50	1.63 ± 0.03	1.24 ± 0.05	2.13 ± 0.05	2.20 ± 0.11
1.00	1.42 ± 0.34	1.20 ± 0.13	1.91 ± 0.02	1.91 ± 0.17
2.50	1.27 ± 0.42	1.13 ± 0.23	1.77 ± 0.15	1.77 ± 0.32
5.00	1.20 ± 0.17	1.06 ± 0.16	1.63 ± 0.21	1.56 ± 0.16
10.00	1.06 ± 0.01	0.71 ± 0.07	1.56 ± 0.08	1.27 ± 0.18
CD at 5% level	0.002	0.012	0.007	0.006

* Standard error of the mean / *Ecart type de la moyenne* (N = 3).

NRA versus translocation of nutrients:

The observations recorded in this experiment were similar to those of the direct treatment experiments for most of the nutrients. The NRA increased with increasing dose of nutrients up to a certain concentration—the optimum one. The optimum concentrations for KH₂PO₄ and KCl coincided with the optima observed for direct treatments. But in the case of (NH₄)₂SO₄, the NRA was enhanced with an increase in concentration to a certain level (Table III), and the results obtained for (NH₄)₂SO₄ were dissimilar to those of the direct treatment experiments where inhibition was observed throughout all concentrations. Urea revealed a similar inhibitory role at all concentrations (Table III). On comparing the NRA from these two types of experiments, it was observed that the NRA was higher in translocation experiments and lower in the direct treatment experiments.

DISCUSSION

The observed stimulation/enhancement on NRA in leaves of oak plants sprayed with different doses of various nutrients can be of interest from the standpoint of their physiological significance as well as for their utilitarian value. The importance of ions like K⁺, NH₄⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, and PO₄³⁻ for general cell physiology—ranging from enzyme activation to membrane phenomena—is well recognized (Broyer and Stout, 1959; Steward and Sutcliffe, 1959; Steward, 1963; Evans and Sorger, 1966;

Epstein, 1972; Hewitt, 1975; Hewitt *et al.*, 1976; Rains, 1976). Therefore, the stimulation observed would have been caused through a general stimulatory effect of these ions on the cells.

The results presented here clearly indicate that leaf-spray treatment of KCl and KH_2PO_4 is equally effective at a 5.0 mM dose. Among the N-containing fertilizers, the optimum dose of ammonium sulphate was more effective in enhancing the NRA level than the optimum dose of urea (2.5 mM). But further verification of these results by two additional experiments, viz., (i) direct treatment of the nutrients into the assay mixture for NRA during the incubation period, and (ii) translocation of these minerals through shoots for 20 h followed by the NRA assay, revealed that the two nitrogenous fertilizers (urea and ammonium sulphate) inhibited NRA even at very low concentrations (0.01 mM). This inhibition may be due to the inhibitory effect of the ammonium ions released from these N-fertilizers during treatment. A similar inhibitory response by NH_4^+ has been observed by other workers (Hewitt, 1975; Oaks *et al.*, 1977). On the other hand, in the spray treatment experiments both of these N-fertilizers increased NRA to a greater extent, which could be due to the synthesis of new amino acids in the leaves in the *in situ* system (on spraying of N-fertilizers) which are used to synthesize new copies of nitrate reductase to be used for the enzymatic reduction of NO_3^- obtained from the soil. In a similar type of experiment with other salts (KCl, KH_2PO_4) the enhancement in NRA revealed that these nutrients induce the synthesis of the enzyme and also to some extent alter its catalytic properties.

Table III. *In vivo* nitrate reductase activity (NRA) in leaves in the translocation experiments with different concentrations of nutrients.

Tableau III. *Activité nitrate réductase (NRA) in vivo chez des feuilles traitées par translocation avec des éléments nutritifs à différentes concentrations.*

Concentration of nutrients (mM)	NRA ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ leaf fresh weight)			
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Mineral nutrients		KCl
		H_2NCONH_2	KH_2PO_4	
Concentration en éléments nutritifs (mM)	NRA ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h/g}$ feuille poids sec)			
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Éléments nutritifs minéraux		KCl
		H_2NCONH_2	KH_2PO_4	
0 (control / témoin)	$2.27 \pm 0.23^*$	2.48 ± 0.23	3.12 ± 0.05	3.19 ± 0.32
0.01	2.48 ± 0.41	2.27 ± 0.17	3.55 ± 0.23	3.62 ± 0.35
0.05	2.91 ± 0.32	2.20 ± 0.23	4.47 ± 0.41	3.83 ± 0.12
0.10	4.47 ± 0.19	1.98 ± 0.17	4.97 ± 0.32	4.11 ± 0.17
0.25	3.40 ± 0.08	1.95 ± 0.14	4.47 ± 0.39	4.97 ± 0.24
0.50	2.84 ± 0.03	1.82 ± 0.21	4.26 ± 0.15	4.47 ± 0.22
1.00	2.48 ± 0.21	1.68 ± 0.23	4.11 ± 0.03	3.97 ± 0.05
2.50	2.13 ± 0.15	1.56 ± 0.07	3.69 ± 0.01	3.40 ± 0.04
5.00	1.66 ± 0.22	1.40 ± 0.18	3.05 ± 0.11	2.55 ± 0.18
10.00	1.25 ± 0.04	1.15 ± 0.23	2.34 ± 0.15	1.84 ± 0.42
CD at 5% level	0.018	0.016	0.009	0.019

* Standard error of the mean / *Ecart type de la moyenne* (N = 3).

NRA is maximum in most of the plants during early periods of growth and later on decreases or remains unaltered, as can be seen from the data on control plants. NRA is the kind of parameter that ultimately determines the future of the actively growing plant, particularly in terms of yield (Johnson *et al.*, 1976).

By spraying optimum doses of these nutrients NRA of *Q. serrata* plants increased considerably; thus, another advantage of this work is that of avoiding waste of a large quantity of nutrients applied in supra-optimal doses. That doses above optimum showed insignificant increases in the levels of NRA and even occasionally proved to be counterproductive strongly argues against using supra-optimal doses of these nutrients.

Further work on the estimation of other leaf constituents such as protein and free amino acids is proposed to observe the effect of these nutrients. Ultimately the quality of the leaves will be assessed by rearing of oak tasar silkworms.

REFERENCES

- BROYER T.C., STOUT P.R. (1959) The micronutrient elements. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 10, 277-300.
- DIXON R.K., GARRETT H.E., BIXBY J.A., COX G.S., TOMPSON J.G. (1981a) Growth, ectomycorrhizal development and root soluble carbohydrates of black oak seedlings fertilized by two methods. *For. Sci.*, 27, 617-624.
- DIXON R.K., WRIGHT G.M., GARRETT H.E., COX G.S., JOHNSON P.S., SANDER I.L. (1981b) Container and nursery-grown black oak seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius*: growth and ectomycorrhizal development during production period. *Can. J. For. Res.*, 11, 487-491.
- DIXON R.K., GARRETT H.E., COX G.S. (1984) Response of white oak seedlings to foliar application of fertilizers and plant growth regulators. *Hort. Sci.*, 19(4), 523-524.
- EPSTEIN E. (1972) *In Mineral nutrition of plants: principles and perspective*. Wiley, New York.
- EVANS H.J., SORGER G.J. (1966) Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17, 47-76.
- HAGEMAN R.H., HUCKLESBY D.P. (1971) Nitrate reductase from higher plants. *In Methods in Enzymology*. Ed. A. San Pietro, Academic Press, London, Vol. 23A, 491-503.
- HEWITT E.J. (1975) Assimilatory nitrate nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 73-100.
- HEWITT E.J., HUCKLESBY D.P., NOTTON B.A. (1976) Nitrate metabolism. *In Plant Biochemistry*. 3rd ed., Ed. J. Bonner and J.E. Varner, Academic Press, London, pp. 663-681.
- JOHNSON C.B., WHITTINGTON W.J., BLACKWOOD G.C. (1976) Nitrate reductase as a possible predictive test for crop yield. *Nature*, 262, 133-134.
- MARONEK D.M., HENDRIX J.W. (1979) Growth acceleration of pin oak seedling with a mycorrhizal fungus. *Hort. Sci.*, 14, 627-628.
- OAKS A., ASLAM M., BOESEL I. (1977) Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 59, 391-394.
- RAINS D.W. (1976) Mineral metabolism. *In Plant biochemistry*. 3rd ed., Ed. J. Bonner and J.E. Varner, Academic Press, London, pp. 561-596.
- SRIVASTAVA R.C., MUKHERJI D., MATHUR S.N. (1980) *In vivo* assay of nitrate reductase in *Vigna mungo*: an assessment of the underestimation due to the presence of nitrite reductase. *Ann. Bot. (London)*, 45, 717-718.
- STEWART F.C., SUTCLIFFE J.F. (1959) Plants in relation to inorganic salts. *In Treaties in Plant Physiology*. Vol. II, Ed. F.C. Stewart, Academic Press, New York, pp. 253-478.
- STEWART F.C. (1963) Inorganic nutrition of plants. *In Treaties in Plant Physiology*. Vol. III, Ed. F.C. Stewart, Academic Press, New York.

ROLE DES ELEMENTS NUTRITIFS N, P ET K SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE *IN VIVO* CHEZ LES FEUILLES DE *QUERCUS SERRATA* THUN.

M.K. GHOSH*, M.K.R. NOAMANI*, P.K. DAS* & R.C. SRIVASTAVA**

* Regional Tasar Research Station (CSB), Imphal - 795002, Manipur, Inde.

** Life Science Department, Manipur University, Canchipur, Imphal - 795003, Manipur, Inde.

*Un mélange composé de différentes concentrations d'éléments nutritifs (KH_2PO_4 , KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et H_2NCONH_2) a été vaporisé sur des plantules de *Quercus serrata*. Les plantules ont été cultivées dans des sacs en polyéthylène contenant de la terre. L'activité nitrate réductase *in vivo* (NRA) a été déterminée chez les feuilles à différents âges et la concentration optimale a été établie pour chaque élément nutritif. Les doses optimales pour tous les éléments nutritifs permettent de maintenir des niveaux d'activité nitrate réductase élevés jusqu'à 21 jours après la vaporisation. Ces observations ont été corroborées par traitement direct *in vitro* et par translocation. Ces observations nous permettent de prescrire les doses optimales et de réduire ainsi les pertes dues aux doses supérieures à l'optimal.*

INTRODUCTION

Il existe en Inde environ 58 espèces de chêne (*Quercus* sp.) réparties de l'Etat du Jammu et Cachemire à l'ouest à l'Etat de Manipur dans le nord-est sur toute la ceinture tempérée et sub-himalayenne. En raison de l'absence de feuilles de qualité, il n'a pas été possible d'atteindre la quantité souhaitée de production de cocons. L'amélioration de la qualité des feuilles semble donc constituer une condition essentielle à l'heure actuelle. A cette fin, certains travaux sur l'application d'engrais ont été réalisés par un certain nombre de chercheurs mais ces études se restreignent dans l'ensemble aux paramètres relatifs à la croissance et au rendement de la plante. Par exemple, l'amélioration de la croissance de la racine et de la pousse chez les plantules du chêne a été obtenue par application foliaire d'engrais (Dixon et coll., 1981a, 1984). Il a également été observé que l'inoculation de champignons mycorrhizes chez des plantules de chênes améliorerait la croissance de la plantule après tests en serre et en pépinière (Dixon et coll., 1981a, 1981b ; Maronek et Hendrix, 1979). La plupart des études sur les engrais portent sur le NH_4NO_3 , le H_2NCONH_2 , P_2O_5 et le KCl à différentes concentrations.

MATERIELS ET METHODES

Plantes et substances chimiques utilisées :

Des graines de *Quercus serrata* ont été prélevées dans la forêt naturelle d'Imphal au mois d'octobre-novembre 1990. Des substances chimiques de grade analytique ont été utilisées pour la vaporisation foliaire et les estimations biochimiques.

Germination des graines et croissance des plantules :

Des graines stérilisées en surface (avec du chlorure de chaux à 2 % pendant 5 minutes) ont été immergées dans de l'eau du robinet pendant 72 heures. Les graines ont été mises en tas et recouvertes

d'un sac en toile de jute humide et propre. La germination a commencé 18 jours après l'immersion. Les graines germées ont été transférées dans un sac en polyéthylène rempli d'un mélange de fumier:sable:terre (1:1:1). Elles ont été arrosées tous les deux jours. Les plantules ont été cultivées en conditions naturelles.

Application foliaire des éléments nutritifs :

Des solutions de quatre éléments nutritifs (orthophosphate de potassium dihydrogène, chlorure de potassium, sulfate d'ammonium et urée) à différentes concentrations (1,0, 2,5, 5,0 et 10,0 mM) ont été préparées dans de l'eau distillée. Des volumes égaux de chacun des éléments nutritifs (5 ml/plant) ont été vaporisés sur les feuilles de plants âgés de 2 mois à l'aide d'un micro-vaporisateur. Trois réplicats ont été utilisés pour chaque traitement. Les plants ont été cultivés en conditions naturelles. Les expériences ont été réalisées en mai 1991.

Activité nitrate réductase *in vivo* (NRA) :

La NRA *in vivo* a été déterminée sur des feuilles fraîches au jour 0, c'est-à-dire juste avant le traitement par vaporisation, et poursuivie à intervalles hebdomadaires pendant 3 semaines. La NRA a été déterminée par la méthode de Hageman et Hucklesby (1971) légèrement modifiée par Srivastava et coll. (1980). Le mélange réactionnel contient 0,25 ml NKO_3 (100 mM), 0,25 ml N-propanol (5 % v/v) et 2 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) pour 250 mg de feuilles fraîches. Après 30 minutes d'incubation à 32 ± 1 °C, la présence du NO_2 formé a été testée dans 1 ml du mélange de dosage en utilisant 1 ml de suphanilamide (1 % dans 1,5 N HCl) et 1 ml de N-(1-naphthyl)éthylène diamine dihydrochlorure (0,02 %, p/v dans l'eau distillée). Cette étape conduit à la formation d'un complexe pourpre de colorant azoïque (I-max. 540 nm). Le NaNO_2 a été utilisé comme standard.

Etudes spécifiques sur la NRA *in vivo* :

Deux expériences supplémentaires ont été réalisées afin de déterminer les concentrations optimales des différents minéraux sur la NRA. Celles-ci sont :

(1) Traitement par les éléments nutritifs dans le mélange réactionnel de dosage de la NR :

Dans cette expérience, la NRA des feuilles a été déterminée en présence de différentes concentrations d'éléments nutritifs dans le mélange réactionnel pendant une période d'incubation de 30 minutes. Les concentrations finales de sels contenus dans le milieu réactionnel sont de 0, 0,01, 0,05, 0,25, 0,50, 1,0, 2,5, 5,0 et 10,0 mM. Dans tous les cas, le témoin a été traité à l'eau distillée.

(2) Expérience de translocation :

Dans cette expérience, les pousses ont été coupées à la partie basale des plants âgés de deux mois, immergées dans 20 ml de solutions des quatre éléments nutritifs à différentes concentrations et conservées dans des flacons marron pour permettre la translocation à travers les pousses pendant 20 heures. Les concentrations pour cette expérience sont les mêmes que pour le traitement direct. Les lots ont été maintenus sous une lampe au tungstène de 100 W placée à 1 mètre de distance. Une fois la période de translocation terminée, la NRA des feuilles a été mesurée comme indiqué précédemment.

Toutes les expériences ont été réalisées en trois réplicats et répétées deux fois. Toutes les mesures colorimétriques ont été réalisées avec un Spectronic 20 Bausch et Lomb. Les analyses statistiques ont été réalisées le cas échéant.

RESULTATS

Activité nitrate réductase (NRA) chez les feuilles traitées :

La NRA *in vivo* augmente avec l'âge chez les plants témoins jusqu'à 14 jours après la vaporisation, puis tend à se stabiliser le 21^e jour. Quel que soit le minéral, la NRA croît lorsque les concentrations augmentent jusqu'à un certain niveau (Tableau I). Cependant, l'urée à 10,0 mM entraîne une inhibition, comme le montre le tableau I. La concentration optimale est de 5,0 mM pour le KCl, le KH_2PO_4 et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de 2,5 mM pour l'urée (Tableau I). La NRA est donc fonction de la concentration pour tous les minéraux. Parmi les engrais N, P et K, le KCl et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ s'avèrent également efficaces et meilleurs que le KH_2PO_4 . L'urée est l'engrais le moins efficace.

NRA et traitement direct avec les minéraux dans le mélange de dosage :

Pour tous les minéraux, excepté l'urée et le sulfate d'ammonium, l'augmentation des doses jusqu'à un certain niveau entraîne un accroissement de la NRA ; de plus, la réaction est fonction de la concentration. Les doses optimales sont : 0,25 mM KCl et 0,1 mM KH_2PO_4 , comme le montre le tableau II. L'urée et l'ammonium sont inhibiteurs à toutes les concentrations (de 0,01 à 10,0 mM).

NRA et translocation des éléments nutritifs :

Les observations faites au cours de cette expérience sont similaires à celles obtenues pour le traitement direct pour la plupart des éléments nutritifs. La NRA augmente lorsque les doses d'éléments nutritifs augmentent jusqu'à une certaine concentration, qui est la concentration optimale. Les concentrations optimales pour le KH_2PO_4 et le KCl coïncident avec les optima observées avec le traitement direct. Toutefois, dans le cas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la NRA est plus importante lorsque la concentration augmente jusqu'à un certain niveau (Tableau III) ; les résultats obtenus pour le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ diffèrent de ceux obtenus par le traitement direct, pour lequel on constate une inhibition pour toutes les concentrations. L'urée présente ce même rôle inhibiteur à toutes les concentrations (Tableau III). La comparaison des NRA obtenues dans ces deux séries d'expériences montre que la NRA est plus importante dans les expériences de translocation que dans les expériences de traitement direct.

DISCUSSION

La stimulation et/ou l'augmentation de la NRA observée dans les feuilles de plants de chênes vaporisées avec des éléments nutritifs à différentes doses est intéressante tant sur le plan de leur signification physiologique que sur le plan de leur valeur utilitaire. L'importance d'ions comme le K^+ , le NH_4^+ , le Cl^- , le SO_4^{2-} et le PO_4^{3-} dans la physiologie générale des cellules — qui va de l'activation des enzymes aux phénomènes des membranes — est reconnue (Broyer et Stout, 1959 ; Stewart et Sutcliffe, 1959 ; Steward, 1963 ; Evans et Sorger, 1966 ; Epstein, 1972 ; Hewitt, 1975 ; Hewitt et coll., 1976 ; Rains, 1976). La stimulation observée ici aurait donc été provoquée par un effet stimulant général de ces ions sur les cellules.

Les résultats présentés ici indiquent clairement que la vaporisation foliaire de KCl et de KH_2PO_4 est efficace à la concentration de 5,0 mM. Parmi les engrais contenant de l'azote, la dose optimale de sulfate d'ammonium entraîne une augmentation plus importante de la NRA que la dose optimale d'urée (2,5 mM). Toutefois, la vérification de ces résultats par deux expériences supplémentaires, c'est-à-dire (1) application directe des éléments nutritifs dans le mélange de dosage au cours de l'incubation et (2) translocation de ces minéraux par les pousses pendant 20 heures puis dosage de la NRA, révèle que les deux engrais azotés (urée et sulfate d'ammonium) inhibe la NRA même à des concentrations très faibles (0,01 mM). Cette inhibition pourrait être due à l'effet inhibiteur des ions ammonium libérés de ces engrais N au cours du traitement. Une réponse inhibitrice similaire par NH_4^+ a été observée par d'autres chercheurs (Hewitt, 1975 ; Oaks et coll., 1977). Par ailleurs, les expériences par vaporisation montrent que ces deux engrais N entraînent une augmentation importante de la NRA qui pourrait être due à la synthèse de nouveaux acides aminés dans les feuilles dans le système *in situ* (au moment de la vaporisation des engrais N), ces acides aminés pouvant servir à synthétiser de nouvelles copies de nitratre réductase utilisées pour la réduction enzymatique de NO_3^- . Dans une série d'expériences similaires sur d'autres sels (KCl, KH_2PO_4), l'augmentation de la NRA révèle que ces éléments nutritifs induisent la synthèse de l'enzyme et, dans une certaine mesure, modifie ses propriétés catalytiques.

La NRA est maximale chez la plupart des végétaux en début de croissance et diminue ensuite ou reste inchangée, comme le montrent les données obtenues chez les plants témoins. La NRA est un type de paramètre qui détermine, en fin de compte, le futur de la plante dès sa période de croissance, en particulier en termes de rendement (Johnson et coll., 1976).

L'application de doses optimales de ces éléments nutritifs entraîne une augmentation importante de la NRA chez les plants de *Q. serrata* ; cette méthode permet également d'éviter le gaspillage de grandes quantités d'éléments nutritifs appliqués à des concentrations supérieures à l'optimale. Le fait que l'application de doses supérieures à l'optimale entraîne une augmentation non significative, voire une diminution des niveaux de la NRA démontre qu'il est déconseillé d'utiliser ce type de doses.

On envisage des travaux complémentaires sur l'estimation d'autres composants des feuilles, comme les protéines et les acides aminés libres, afin d'observer l'effet de ces éléments nutritifs. La qualité des feuilles sera en dernier lieu évaluée par nourrissage des vers à soie tassar du chêne.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés-à-part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés-à-part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés-à-part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.
- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.
- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

Directeur gérant : Dr H. BOUVIER

Dépôt légal : 4e trimestre 1994