

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION EDITORIAL BOARD

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

Statistiques 1995 - 1995 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 1995

Table I. 1995 cocoon and raw silk production

Pays Country	Cocons frais Fresh cocoons (tonnes)	Soie grège Raw silk (tonnes)
Bangladesh ⁽¹⁾	618	39.3
Brésil / <i>Brazil</i>	16 260 ⁽¹⁾	2 468
Cambodge / <i>Cambodia</i>	180	20
Chine / <i>China</i>	790 000 ⁽²⁾	67 113 ⁽³⁾
Colombie / <i>Colombia</i>	202.9	40.3
Corée du Sud / <i>South Korea</i>	552	643
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	3.7	0
France	1	0.2
Géorgie / <i>Georgia</i>	54	-
Grèce / <i>Greece</i>	26	-
Inde / <i>India</i> ⁽⁴⁾	128 349	15 045 ⁽⁵⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	938.9	134.8
Italie / <i>Italy</i>	17.5	0
Japon / <i>Japan</i>	5 351	3 228
Liban / <i>Lebanon</i>	3.7	0
Malaise / <i>Malaysia</i>	27.73	1.5
Maroc / <i>Morocco</i>	0.32	-
Ouganda / <i>Uganda</i>	8.50	0
Paraguay	300	5
Philippines	4.03	0
Roumanie / <i>Romania</i>	12.5	6
Sri Lanka	36	2.74
Syrie / <i>Syria</i>	179	-
Taiwan / <i>Taiwan</i>	0	0
Thaïlande / <i>Thailand</i>	3 788.5	1 074.8
Tunisie / <i>Tunisia</i>	-	-
Turquie / <i>Turkey</i>	272	40
Vietnam	12 000	1 550 ⁽⁶⁾

- Non disponible / *Not available.*

(1) 94/95.

(2) dont 30 000 tonnes non mûrier / *including 30,000 tonnes non mulberry.*

(3) dont 2 500 tonnes non mûrier / *including 2,500 tonnes non mulberry.*

(4) avril 1994-mars 1995 / *April 1994-March 1995.*

(5) dont 1 132 tonnes non mûrier / *including 1, 132 tonnes non mulberry.*

(6) dont 50 tonnes non mûrier / *including 50 tonnes non mulberry.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 1995

Table II. 1995 cocoon and raw silk imports and exports

Pays	Exportation de cocons secs (tonnes)	Exportation de soie grège (tonnes)	Importation de cocons secs (tonnes)	Importation de soie grège (tonnes)
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Bangladesh	0	0	0	-
Brésil / Brazil	101	2 320 ⁽¹⁾	82	0
Cambodge / Cambodia	0	400	0	540
Chine / China	2 362	12 926 ⁽²⁾	2 600	1 024 ⁽³⁾
Colombie / Colombia	7.4 ⁽⁴⁾	37.8	0	0
Corée du Sud / South Korea	0	487	685	2 414
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	0	0	0	0
France	0	42	2	451
Géorgie / Georgia	-	-	-	-
Grèce / Greece	0	0	0	-
Italie / Italy	6.5	0	-	3 252
Inde / India ⁽⁵⁾	n	n	460	3 869 ⁽⁶⁾
Indonésie / Indonesia	0	0	42.9	15.4
Japon / Japan	26	15	2 273	1 992
Liban / Lebanon	0	0	0	8
Malaise / Malaysia	3	1.5	-	-
Maroc / Morocco	-	0	-	25
Ouganda / Uganda	1.8	0	0	0
Paraguay	70	6	0	31
Philippines	-	0.44	-	257
Roumanie / Romania	0	0	-	2
Sri Lanka	0	0	0	0
Syrie / Syria	0	4	0	-
Taiwan / Taiwan	0	0	0	439.8
Thaïlande / Thailand	12.9	0.2	-	410.5
Tunisie / Tunisia	0	0	0	36.8
Turquie / Turkey	10.8	0	111	70
Vietnam	50	917	200	0

- Non disponible / Not available.

(1) dont 522 tonnes fil de soie / including 522 tonnes silk yarn.

(2) dont 3 251 tonnes non mûrier / including 3 251 tonnes non mulberry.

(3) dont 853 tonnes non mûrier / including 853 tonnes non mulberry.

(4) cocons doubles / double cocoons.

(5) avril 1994 à mars 1995 / April 1994-March 1995.

(6) dont 1 534 tonnes non mûrier / including 1,534 tonnes non mulberry.

n: négligeable / negligible.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 1995

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 1995

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
Country	Price paid to producers (fresh cocoons)	Export price (dry cocoons)	Import price (dry cocoons)
Bangladesh	1.59	xx	xx
Brésil / Brazil	2.65	10.86	9.60
Cambodge / Cambodia	-	xx	xx
Chine / China	1.77	10.34	2.20
Colombie / Colombia	3.03	3.80	xx
Corée du Sud / South Korea	13.50	xx	11.70
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	1.30	xx	xx
France	15.00	xx	14.00
Géorgie / Georgia	1.00	-	-
Grèce / Greece	4.00	xx	xx
Inde / India ⁽¹⁾	3.00	-	2.44
Indonésie / Indonesia	2.13	xx	10.19
Italie / Italy	9.00	5.00	-
Japon / Japan	15.62	-	11.97
Liban / Lebanon	8.00	xx	xx
Malaisie / Malaysia	3.14	9.50	xx
Maroc / Morocco	(2)	xx	xx
Ouganda / Uganda	3.00	8.25	xx
Paraguay	2.00	10.25	xx
Philippines	2.31	6.77	-
Roumanie / Romania	1.20	xx	-
Syrie / Syria	5.00	xx	xx
Sri Lanka	1.00	xx	xx
Thaïlande / Thailand	3.20	11.10	-
Turquie / Turkey	4.50	7.5	2.5
Vietnam	1.99	-	4.5

- Non disponible / Not available.

(1) avril 1994 à mars 1995 / April 1994-March 1995.

(2) Cocons non vendus mais transformés en soie / Cocoons not sold but processed to silk.

xx : Pas d'exportation/d'importation de cocons/ No cocoon exports/imports.

EGGSHELL STRUCTURE OF A SMALL-SIZED EGG MUTANT, MINIATURE EGG (*emi*), OF *BOMBYX MORI*

Y. KAWAGUCHI¹*, Y. NAGASATO¹, Y. BANNO¹, K. KOGA¹ & H. DOIRA²

1. Laboratory of Sericultural Science, 2. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

The surface and cross-sectional structures of eggshell were observed in the miniature egg mutant (emi) of Bombyx mori by differential interference contrast microscopy and scanning electron microscopy. The size of each petal comprising rosette-shaped cell imprints surrounding the micropyle in the anterior pole region of egg surface was anomalously larger and the number of petals per egg was significantly fewer in the mutant than in the normal eggs. The small knobs observed in the posterior pole, ventral and dorsal regions of the mutant egg were abnormally large and their shape was rough and irregular. The polygons imprinted on the lateral flat surfaces in the mutant were significantly smaller than observed in the normal. However, the sections of the mutant chorion were revealed to be normal in terms of thickness and other features. These results suggest that the mutant character mirrors the morphological and/or functional abnormality of follicular epithelial cells secreting the chorion proteins.

Keywords: *Bombyx mori*, egg character mutant, miniature egg gene, eggshell structure.

INTRODUCTION

Bombyx mori has many mutants with respect to egg character (Doira, 1983, 1986). All mutant traits which affect the eggshell are inherited in a pseudo-maternal manner. We found a novel, spontaneous mutant wherein the egg size is clearly small in homozygotes (Kawaguchi *et al.*, 1993). The gene responsible for this recessive mutation was located at 9.5 cM of chromosome 12 and named the 'miniature egg' with the symbol, *emi*. In the present study, we observed morphologically the surface of the mutant eggs in comparison with the normal structures by differential interference contrast microscopy. The four partially differentiated surface regions, 1) anterior (micropyle region) plus posterior poles, 2) dorsal side, 3) ventral side and 4) lateral flat sides, were discriminated as has been done in previous studies (Akai, 1957; Sakaguchi *et al.*, 1973; Kanda *et al.*, 1974; Ohtsuki *et al.*, 1977a, 1977b; Ohtsuki and Kanda, 1978; Mazur *et al.*, 1980; Regier *et al.*, 1980; Katsuno, 1984a, 1984b). Also eggshell sections were observed by scanning electron microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Insect:

The *emi* strain d36 maintained at the Institute of Genetic Resources, Kyushu University, was used. This strain carries the yellow cocoon allele (symbol, *C*), as a marker, belonging to the same linkage group as *emi*. After mating *C* +/+ *emi* (females) × + *emi*/+ *emi* (males), *C* heterozygotes with yellow cocoons and + homozygotes with white cocoons were segregated within the same batch; the former produced normal eggs, while the latter *emi* eggs. Both types of larvae were raised on mulberry leaves at 25 °C.

* To whom correspondence should be addressed.

Morphological observations of eggshell surface:

Mature eggs were dissected from unmated female adults and washed with distilled water. To obtain specimens for differential interference contrast microscopy, the central parts of anterior, posterior, dorsal, ventral and lateral regions of eggshells were cut, and the chorion fragments were washed with distilled water, placed on glass slides and mounted under cover glasses. To obtain sections of the lateral regions of the chorion for scanning electron microscopy (SEM), eggshells were ripped in distilled water using fine watchmaker's forceps, dehydrated in a graded ethanol series, freeze-dried with *tert*-butyl alcohol, mounted on a stub with double-stick carbon tape and sputter-coated with gold. Interference microscopy was carried out using a Zeiss Axioplan microscope, and SEM using a JSM5200.

Measurement of area of surface structures:

The average areas of petals (a rosette of petal-shaped cells), network patterns (polygons) and lateral regions of the eggshell were measured as described previously (Kawamura and Nakada, 1981; Kawaguchi *et al.*, 1993). The total number of eggs observed to calculate the areas were as follows: for petals and polygons, 200 and 450, respectively, in the normal samples; 400 and 500, respectively, in the mutant; for lateral regions, 50 to 60 in both normal and mutant.

RESULTS**Size and shape of eggs:**

The side view of a normal, mature egg is known to be ellipsoidal and this was also the case in the *emi* egg (Fig. 1A and B), although its size was smaller than the normal. The lengths of the major and minor axes were 1.34 ± 0.04 and 1.07 ± 0.04 mm, respectively, in the normal, while they were 1.02 ± 0.10 and 0.69 ± 0.07 mm in the mutant.

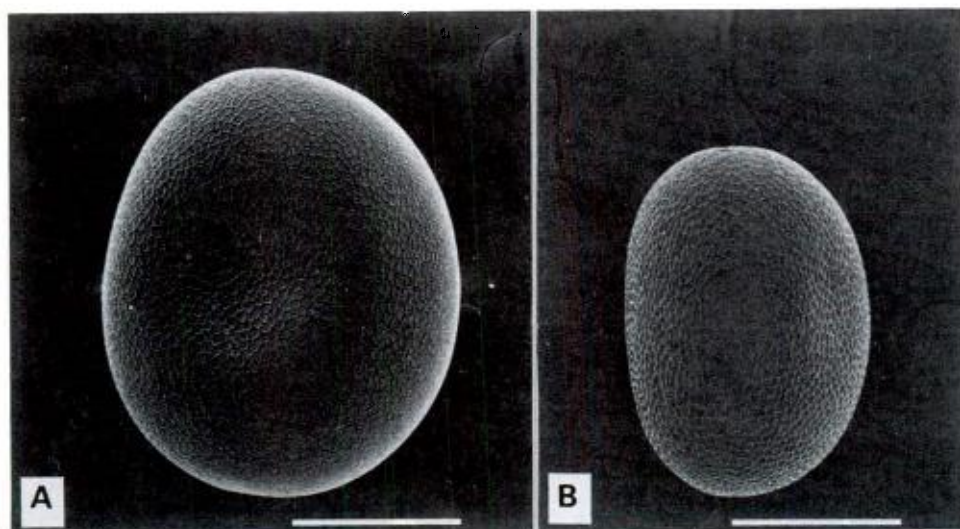


Fig. 1: Observation of normal and *emi* eggs by scanning electron microscopy.

A: normal egg; B: *emi* egg.

Top, anterior pole; bottom, posterior pole; right and left, dorsal and ventral regions, respectively. Scale bar = 0.5 mm.

Fig. 1 : Observation d'un oeuf normal et d'un oeuf *emi* au microscope électronique à balayage.

A : oeuf normal, B : oeuf *emi*.

Haut : pôle antérieur, Bas : pôle postérieur, Droite et gauche : régions dorsale et ventrale, respectivement. Echelle du trait : 0,5 mm.

Observation of anterior and posterior pole regions:

The anterior pole region of the normal eggshell has a micropyle with a single external opening surrounded by comparatively uniform, petal-shaped cell imprints which make a double-petaled rosette (Fig. 2A). In the mutant, however, the petals were irregular and the rosette was single (Fig. 2B). The petals directly surrounding the micropyle opening in the mutant were fewer in number (66%), while the area of each petal was abnormally larger (147%), when compared to the normal type (Fig. 3). The surface of the posterior region reveals an assemblage of numerous small granule-like knobs which are small and smooth (Fig. 2C). However, those of the mutant (Fig. 2D) were considerably larger and rougher and visibly marked with aeropyles. By contrast, the aeropyles in this region of normal eggs were very small and invisible at the level of magnification used. Moreover, some of the mutant knobs were connected to each other.

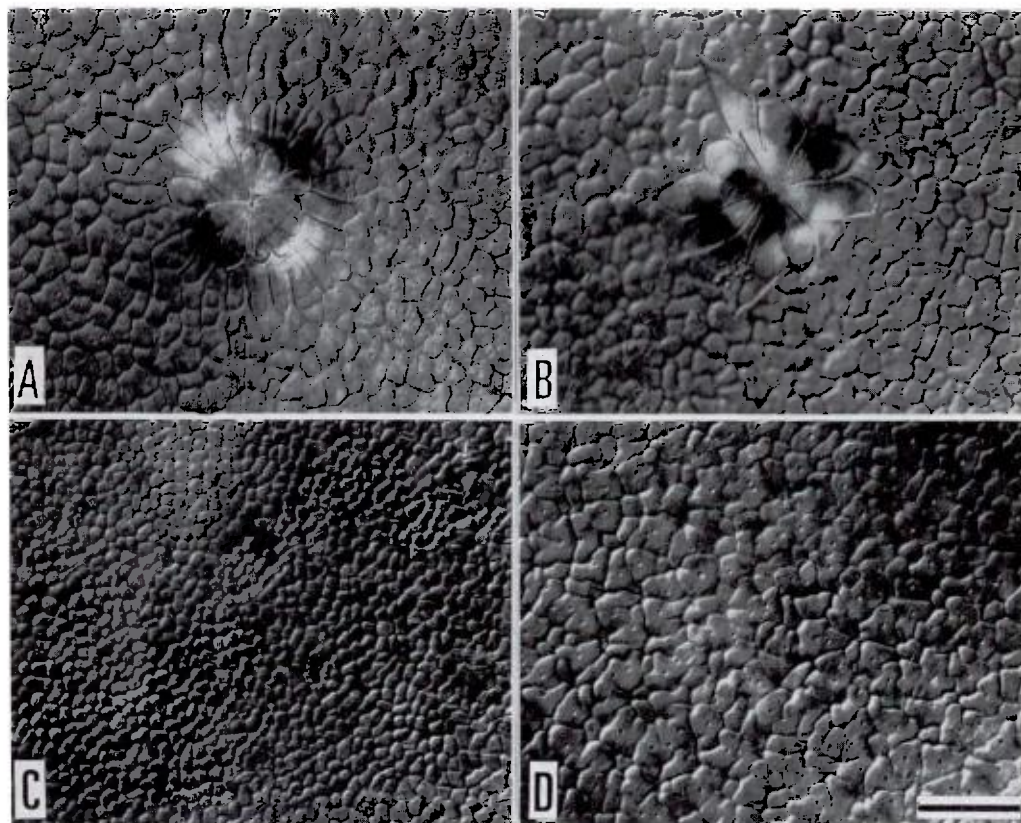


Fig. 2: Surface structures of anterior and posterior regions of the eggshell using a differential interference light microscope.

A and C: normal eggs; B and D: *emi* eggs.

A and B: anterior region; C and D: posterior region.

The anterior region contains the micropyle, the center of which resembles a petaled flower. Scale bar = 40 μ m.

Fig. 2 : Structures superficielles des régions antérieure et postérieure de la coquille vues au microscope optique à interférence différentielle.

A, C : oeufs normaux. B, D : oeufs *emi*.

A, B : région antérieure. C, D : région postérieure.

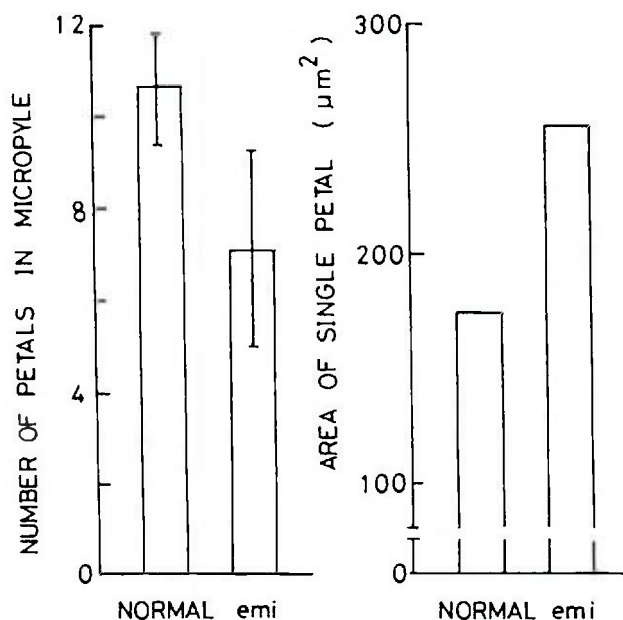
La région antérieure contient le micropyle dont le centre ressemble à une fleur à pétales. Echelle du trait = 40 μ m.

Fig. 3: The number of petals and the area of a single petal surrounding the micropyle.

NORMAL: normal eggs; **emi:** *emi* eggs. Photographs of Fig. 2 were used for calculation. Vertical bar: standard deviation.

Fig. 3 : Nombre de pétales et surface d'un pétale autour du micropyle.

NORMAL : oeufs normaux. **emi :** oeufs *emi*. Le calcul a été réalisé à partir des clichés de la fig. 2. Trait vertical : écart type.



Observation of the dorsal and ventral regions:

The knobs are also distributed in the dorsal and ventral regions of the eggshell. In the normal eggs, the knobs are relatively uniform and smooth, each having a small aeropyle on the surface; these features were similar between the dorsal and ventral regions (Fig. 4A and C). Again the knobs in the mutant were irregular in both regions (Fig. 4B and D); many knobs were connected to each other and their aeropyles were fairly large. The numbers of knobs per unit area, counted separately for the dorsal, ventral and posterior regions (Fig. 5), were small in the mutant, at 69, 56 and 59%, respectively, of the normal values.

Observation of the lateral region:

The surface structure in the lateral regions, i.e., the two flat surfaces, of the eggshell consists fundamentally of a regular (or sometimes irregular) network pattern called the polygons, each of which corresponds to the area of a single follicle cell and in which small knobs are observable (see Fig. 6A for a normal egg). In the mutant (Fig. 6B) the area of each polygon was 76% of the normal type (Fig. 7A); probably because of this the number of knobs per polygon was reduced to 40% of the normal value (Fig. 7B). Since the area of a whole lateral region in the mutant was 46% of the normal (Fig. 7C), the average number of polygons per whole lateral region fell to 56% level (Fig. 7D).

Observation of cross-sectional structure of the chorion:

The internal structure of the chorion in the lateral region was visualized by scanning electron microscopy of ripped specimens. Three layers, outer, middle and inner, were seen both in the normal and mutant (Fig.'s 8A and B). The inner layer (I) consists of columns oriented perpendicular to the oocyte surface, while the middle and outer layers (M and O) consist of lamellae. No difference was found between the normal and the mutant in the laminal structure of the chorion, whose thickness was $15.19 \pm 1.56 \mu\text{m}$ in the normal and $16.06 \pm 1.34 \mu\text{m}$ in the *emi* mutant.

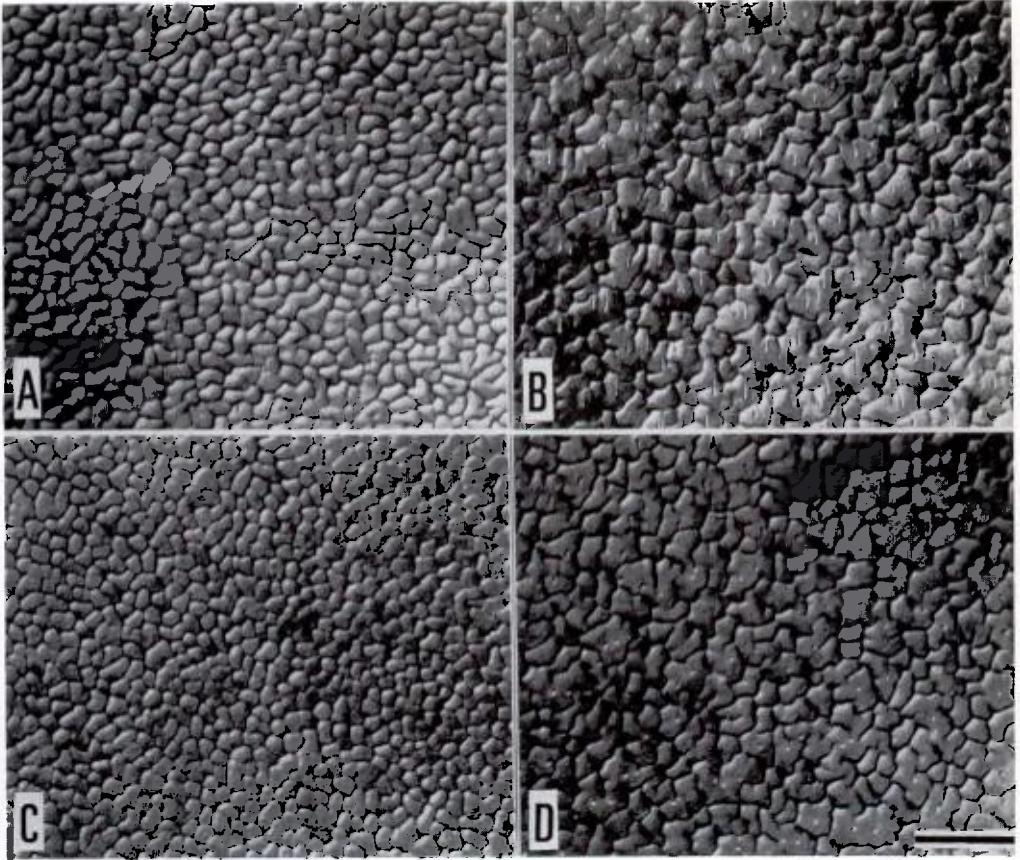


Fig. 4: Surface structures of ventral and dorsal regions of the eggshell using a differential interference light microscope.

A and C: normal eggs; B and D: *emi* eggs.

A and B: ventral region; C and D: dorsal region.

The ventral region is the area where the germ band is formed.

Scale bar = 40 μ m.

Fig. 4 : Structures superficielles des régions ventrale et dorsale de la coquille vues au microscope optique à interférence différentielle.

A, C : oeufs normaux. B, D : oeufs *emi*.

A, B : région ventrale. C, D : région dorsale.

La région ventrale correspond à la zone dans laquelle est formée la bandelette germinative.

Echelle du trait : 40 μ m.

DISCUSSION

The eggshell is constructed of chorion proteins secreted by the follicular epithelial cells (Matsuzaki, 1968; Bock *et al.*, 1986), and the surface characteristics of eggs including the polygonal imprints are ascribed to the secretory activities of these cells (Omura and Kataoka, 1943). The finding that the micropyle regions of the surface with a rosette of petal-shaped cell imprints differed

Fig. 5: The number of knobs on the eggshell surface.

NORMAL: normal eggs; *emi*: *emi* eggs.

V: ventral region; **D:** dorsal region; **P:** posterior region.

Vertical bar: standard deviation.

Fig. 5 : Nombre de bosses sur la surface de la coquille.

NORMAL : oeufs normaux. *emi* : oeufs *emi*.

V : région ventrale. **D :** région dorsale. **P :** région postérieure.

Trait vertical : écart type.

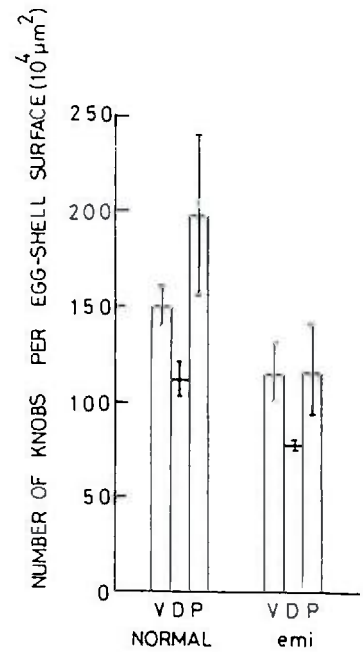


Fig. 6 : Surface structure in the lateral region.

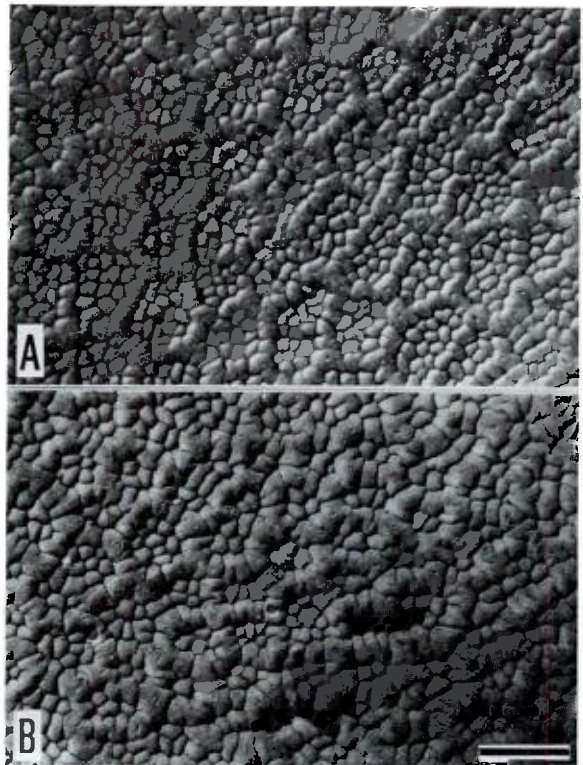
A: normal eggs; **B:** *emi* eggs.

The network of hexagonal or pentagonal polygons can be seen as imprints, each of which is the boundary of a follicular epithelial cell. Several knobs can be seen in each polygon. Scale bar: 40 μm.

Fig. 6 : Structure superficielle de la région latérale.

A : oeufs normaux. **B :** oeufs *emi*.

Le réseau de polygones hexagonaux ou pentagonaux correspond à une série d'empreintes dont chacune forme la frontière d'une cellule épithéliale folliculaire. On distingue plusieurs bosses dans chaque polygone. Echelle du trait : 40 μm.



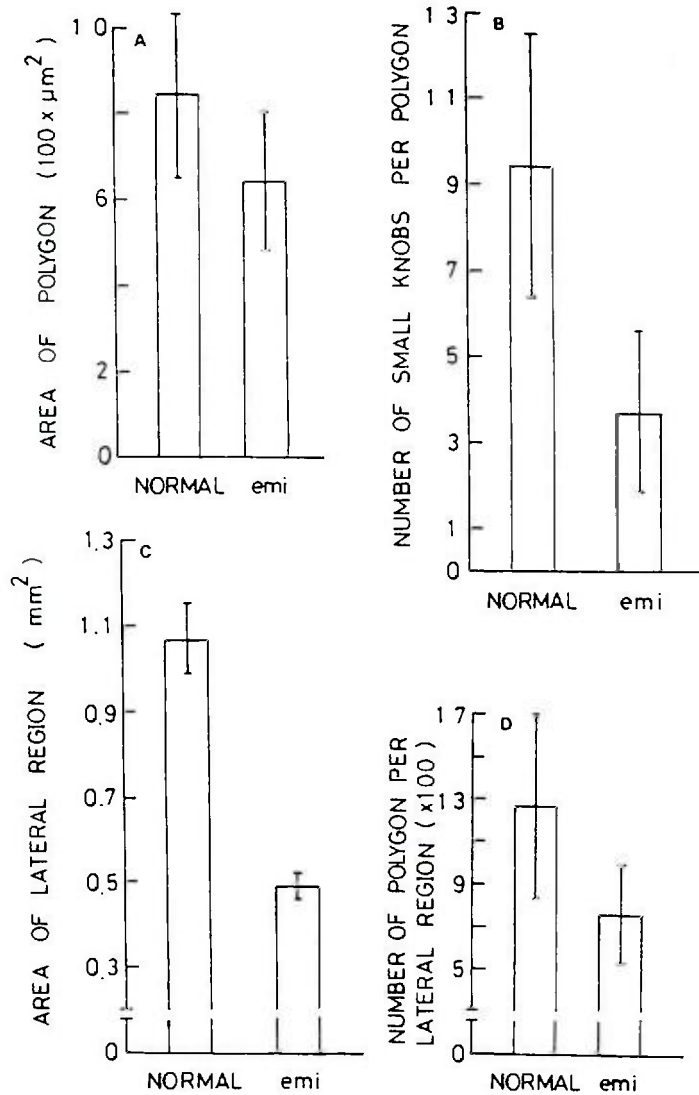


Fig. 7: The areas of polygon and lateral flat regions, and the number of knobs and polygons.

NORMAL: normal eggs; **emi:** emi eggs.

A: the area of each polygon; **B:** the number of small knobs per polygon; **C:** the area of the lateral flat region (one side); **D:** the number of polygons per side of lateral region.

Photographs of Fig. 6 were used for calculation.

Vertical bar: standard deviation.

Fig. 7 : Surface de la région polygonale et de la région plate latérale, nombre de bosses et de polygones.

NORMAL : oeufs normaux. **emi :** oeufs emi.

A : surface des polygones. **B :** nombre de bosses par polygone. **C :** surface de la région plate latérale (un côté). **D :** nombre de polygones par côté dans la région latérale.

Les calculs ont été réalisés d'après les clichés de la fig. 6.

Trait vertical : écart type.

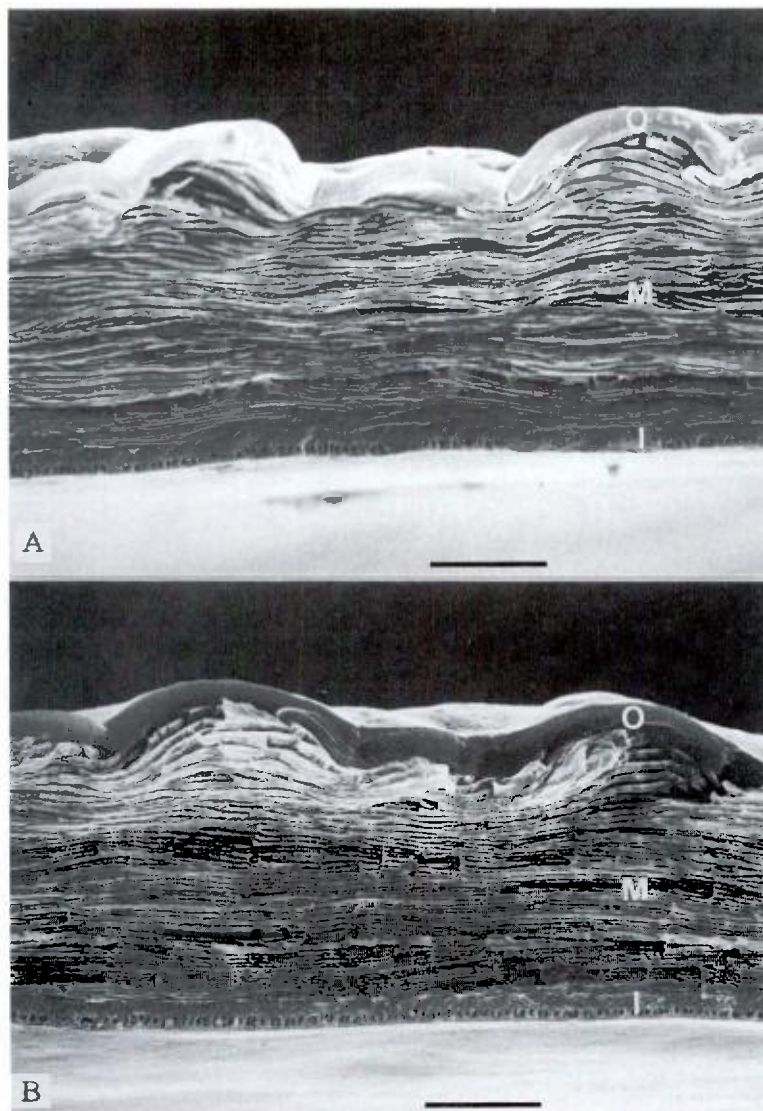


Fig. 8: Scanning electron micrographs of cross-section of the lateral region of the eggshell.

A: normal egg; B: *emi* egg.

O: outer layer; M: middle layer; I: inner layer.

Scale bar = 5 μ m.

Fig. 8 : Vues au microscope électronique à balayage de coupes transversales de la région latérale de la coquille.

A : oeufs normaux. B : oeufs *emi*.

O : couche externe. M : couche intermédiaire. I : couche interne.

Echelle du trait = 5 μ m.

remarkably between the normal and the *emi* mutant suggests that the function of micropyle-forming follicle cells (Yamauchi and Yoshitake, 1984) was abnormal in the mutant. Moreover, the knobs of the dorsal, ventral and posterior regions, and the polygons of the lateral flat regions in the mutant egg surface were atypical, indicating that morphological modulation due to the *emi* mutation seems to be made evident on the secretory surface of the follicular epithelial cells. On the basis of the smaller area of each polygon and also the fewer number of polygons per whole lateral region, the mutant follicle cells are considered to be inferior in size and number. In addition, the mutation seemed to change the epithelial function to make abnormally large aeropyles. Nevertheless, the laminal structures including lamellae seen in chorion cross-sections were normal in this mutant.

As a whole, we suggest that the *emi* gene is involved in the determination of size and number of the follicular epithelial cells, which is manifest by changes in the surface imprinting of the eggs, but not in their lamellar structures. This mutant will serve as a useful tool for elucidating the genetic control of egg architecture.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 07406004) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

- AKAI H. (1957) Studies on the electron microscopic structure of the egg shell in *Bombyx mori* L. (1). J. Sericult. Sci. Japan, 26, 335-340.
- BOCK S.C., CAMPO K., GOLDSMITH M.R. (1986) Specific protein synthesis in cellular differentiation. VI. Temporal expression of chorion gene families in *Bombyx mori* strain C101. Devel. Biol., 117, 215-225.
- DOIRA H. (1983) Linkage maps of *Bombyx mori*: Status quo in 1983. Sericologia, 23, 254-269.
- DOIRA H. (1986) Linkage maps of *Bombyx mori*: Revised in 1986. Sericologia, 26, 485-488.
- KANDA T., MATSUMURA H., OHTSUKI Y. (1974) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) egg. I. Fine structure of micropylar apparatus. J. Sericult. Sci. Japan, 43, 379-383.
- KATSUNO S. (1984a) Size of polygonal patterns of the egg-shell and facets of the compound eye in the tetraploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 53, 1-6.
- KATSUNO S. (1984b) Surface structure of the egg-shell in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 53, 97-107.
- KAWAGUCHI Y., DOIRA H., KIHARA H. (1991) Genetical studies on the 'miniature egg' mutant in *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 60, 346-349.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUJII H. (1993) Polygonal patterns on eggshells of giant egg mutant and large eggs induced by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 39, 437-443.
- KAWAMURA N., NAKADA T. (1981) Studies on the increase in egg size in tetraploid silkworms induced from a normal and a giant egg strains. Japan J. Genet., 56, 249-256.
- MATSUZAKI M. (1968) Electron microscopic observation on chorion formation of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 37, 483-490.
- MAZUR G.D., REGIER J.C., KAFATOS F.C. (1980) The silkworm chorion: Morphogenesis of surface structures and its relation to synthesis of specific proteins. Devel. Biol., 76, 305-321.
- OHTSUKI Y., KANDA T., MATSUMURA H. (1977a) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) egg. II. Characteristics of different of egg surface. J. Sericult. Sci. Japan, 46, 45-50.
- OHTSUKI Y., KITAZAWA T., KANDA T. (1977b) *In vitro* formation of egg shell in the silkworm (*Bombyx mori*). Zool. Mag., 86, 168-173.
- OHTSUKI Y., KANDA T. (1978) Characteristic structure of egg shell in the collapsing egg strain of the silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 47, 215-220.
- OMURA S., KATAOKA T. (1943) Shapes, sizes and their formation of the surface pattern of the egg-shell in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*. J. Sericult. Sci. Japan, 14, 263-275.

- REGIER J.C., MAZUR G.D., KAFATOS F.C. (1980) The silkmoth chorion: Morphological and biochemical characterization of four surface regions. *Devel. Biol.*, 76, 286-304.
- SAKAGUCHI B., CHIKUSHI H., DOIRA H. (1973) Observation of the eggshell structures controlled by gene action in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 18, 53-62.
- YAMAUCHI M., YOSHITAKE N. (1984) Developmental stages of ovarian follicles of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Morphol.*, 179, 21-31.

STRUCTURE DU CHORION DE L'OEUF MUTANT MINIATURE (*emi*) DE *BOMBYX MORI*

Y. KAWAGUCHI^{1*}, Y. NAGASATO¹, Y. BANNO¹, K. KOGA¹ & H. DOIRA²

1. Laboratory of Sericultural Science, 2. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japon.

*Les structures superficielle et transversale du chorion ont été observées chez l'oeuf mutant miniature (*emi*) de *Bombyx mori* au microscope à contraste d'interférence différentielle et au microscope électronique à balayage. Chaque pétale, composant des empreintes cellulaires en rosace entourant le micropyle au niveau de la région du pôle antérieur, est anormalement grand et le nombre de pétales par oeuf est nettement plus faible chez le mutant que chez l'oeuf normal. Les petites bosses observées sur le pôle postérieur et sur les régions ventrale et dorsale de l'oeuf mutant sont anormalement grandes et d'aspect rugueux et irrégulier. Les polygones dessinés sur les surfaces plates latérales du mutant sont nettement plus petits que ceux observés chez les oeufs normaux. Cependant, les coupes du chorion mutant s'avèrent normales pour ce qui concerne l'épaisseur et les autres caractères. Ces résultats suggèrent que le caractère mutant reflète les anomalies morphologiques et/ou fonctionnelles des cellules épithéliales folliculaires qui sécrètent les protéines du chorion.*

INTRODUCTION

Bombyx mori donne de nombreux mutants pour ce qui concerne les caractères de l'oeuf (Doira, 1983, 1986). Tous les caractères de mutation affectant le chorion sont hérités de manière pseudo-maternelle. Nous avons mis en évidence un nouveau mutant spontané chez lequel la taille de l'oeuf est nettement plus faible chez les homozygotes (Kawaguchi et coll., 1993). Le gène responsable de cette mutation récessive a été localisé à 9.5 cM sur le chromosome 12 et nommé « oeuf miniature », symbole : *emi*. Dans cette étude, nous avons observé la structure morphologique des oeufs mutants par rapport aux structures des oeufs normaux en utilisant un microscope à contraste d'interférence différentielle. Les quatre régions superficielles partiellement différenciées – 1) les pôles antérieur (région du micropyle) et postérieur, 2) la face dorsale, 3) la face ventrale et 4) les côtés plats latéraux – ont été repérées suivant la méthode utilisée dans des études antérieures (Akai, 1957 ; Sakaguchi et coll., 1973 ; Kanda et coll., 1974 ; Ohtsuki et coll., 1977a, 1977b ; Ohtsuki et Kanda, 1978 ; Mazur et coll., 1980 ; Regier et coll., 1980 ; Katsuno, 1984a, 1984b). Des coupes du chorion ont également été observées au microscope électronique à balayage.

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

On a utilisé la souche *emi* D36 conservée à l'*Institute of Genetic Resources* de l'Université de Kyushu. Cette souche porte l'allèle du cocon jaune (symbole : *C*) comme marqueur, lequel appartient au même groupe de liaison que *emi*. Après croisement *C* +/+ *emi* (femelles) × + *emi*/+ *emi* (mâles), les hétérozygotes *C* à cocons jaunes et les homozygotes + à cocons blancs ont été ségrégués à l'intérieur d'un même lot ; les premiers produisant des oeufs normaux et les seconds des oeufs *emi*. Des larves des deux types ont été élevées à 25 °C sur des feuilles de mûrier.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

Observations morphologiques de la surface de la coquille :

Des oeufs matures issus de femelles non accouplées ont été disséqués et lavés dans de l'eau distillée. Pour l'obtention des spécimens destinés à l'observation au microscope à contraste d'interférence différentielle, les parties centrales des régions antérieure, postérieure, dorsale, ventrale et latérale des chorions ont été découpées et les fragments de chorion ont été lavés dans de l'eau distillée, déposés sur des lames en verre et montés sur des lames couvre-objets. Pour l'obtention de sections des régions latérales du chorion destinées à l'observation au microscope électronique à balayage, les chorions ont été ouverts dans l'eau distillée à l'aide d'une pince d'horloger, déshydratés dans une série d'éthanol graduée, lyophilisés dans de l'alcool *tert*-butyl, montés à l'aide d'un ruban adhésif double face et enduits d'or. On a utilisé un microscope Zeiss Axioplan pour les observations au microscope à interférence et un JSM5200 pour les observations au microscope à balayage.

Mesure des structures de la zone superficielle :

Les zones moyennes des pétales (rosace de cellules), le dessin en réseau (polygone) et les régions latérales de la coquille ont été mesurés selon la méthode décrite précédemment (Kawamura et Nakada, 1981 ; Kawaguchi et coll., 1993). Les nombres totaux d'oeufs observés pour le calcul des surfaces sont les suivants : 200 et 450 respectivement pour les pétales et les polygones chez les échantillons normaux, 400 et 500 respectivement chez les mutants, 50 à 60 pour les régions latérales chez les échantillons normaux et chez les mutants.

RESULTATS**Taille et forme des oeufs :**

Latéralement, l'oeuf normal mature est de forme ellipsoïde, c'est également le cas de l'oeuf *emi* (Fig. 1A et B), bien que la taille de ce dernier soit inférieure à la normale. Les longueurs des axes majeur et mineur sont respectivement de $1,34 \pm 0,04$ et de $1,07 \pm 0,4$ mm chez l'oeuf normal mais de $1,02 \pm 0,10$ et de $0,69 \pm 0,07$ chez le mutant.

Observation des pôles antérieur et postérieur :

Chez l'oeuf normal, la région du pôle antérieur possède un micropyle présentant une seule ouverture externe entourée par des empreintes cellulaires en pétales comparativement uniformes formant une rosace à double rangée de pétales (Fig. 2A). Cependant, chez le mutant, les pétales sont irréguliers et sont disposés en rosace d'une seule rangée (Fig. 2B). Les pétales qui entourent l'ouverture du micropyle chez le mutant sont moins nombreux (66 %) et la surface de chaque pétale est anormalement plus grande (147 %) que chez le type normal (Fig. 3). La surface de la région postérieure est constituée d'un assemblage de nombreuses bosses d'aspect granuleux qui sont petites et lisses (Fig. 2C). Cependant, celles du mutant sont nettement plus grandes et plus rugueuses et présentent des aéroyles visiblement marqués. A l'inverse, chez les oeufs normaux, les aéroyles de cette région sont minuscules et invisibles au niveau d'agrandissement utilisé. De plus, certaines des bosses du mutant sont reliées entre elles.

Observation des régions dorsale et ventrale :

Les bosses sont également réparties sur les régions dorsale et ventrale du chorion. Chez les oeufs normaux, les bosses sont relativement uniformes et lisses, chacune comportant un petit aéroyle à la surface ; ces caractères sont identiques sur la région dorsale et sur la région ventrale (Fig. 4A et C). Là encore, chez le mutant, les bosses sont irrégulières dans les deux régions (Fig. 4B et D) : de nombreuses bosses sont reliées entre elles et leur aéroyle est assez grand. Le nombre de bosses par unité de surface, déterminé séparément pour chacune des régions dorsale, ventrale et postérieure (Fig. 5) est faible chez le mutant et correspond respectivement à 69, 56 et 59 % des valeurs normales.

Observation de la région latérale :

La structure superficielle des régions latérales du chorion, c'est-à-dire des deux surfaces plates, consiste essentiellement en un dessin en réseau régulier (ou parfois irrégulier) appelé « polygones », chacun correspondant à la surface d'une seule cellule folliculaire et chez lesquels on peut observer

de petites bosses (voir Fig. 6A pour les oeufs normaux). Chez le mutant (Fig. 6B), la surface de chaque polygone correspond à 76 % de celle du type normal (Fig. 7A), c'est probablement la raison pour laquelle le nombre de bosses par polygone est inférieur de 40 % à la valeur normale (Fig. 7B). La surface de la région latérale chez le mutant correspondant à 46 % de la normale (Fig. 7C), le nombre moyen de polygones par région latérale tombe à 56 % (Fig. 7D).

Observation de la structure transversale du chorion :

La structure interne du chorion dans la région latérale a été visualisée par observation au microscope électronique à balayage des spécimens ouverts. Trois couches (externe, moyenne et interne) ont été observées chez l'oeuf normal et chez le mutant. La couche interne (I) est composée de colonnes orientées perpendiculairement à la surface de l'ovocyte, tandis que les couches moyenne et externe (M et O) sont composées de lamelles. Aucune différence n'a été observée entre l'oeuf normal et le mutant pour ce qui concerne la structure lamellaire du chorion, dont l'épaisseur est de $15,19 \pm 1,56 \mu\text{m}$ chez l'oeuf normal et de $16,06 \pm 1,34 \mu\text{m}$ chez le mutant *emi*.

DISCUSSION

La coquille est composée de protéines de chorion sécrétées par les cellules de l'épithélium folliculaire (Matsuzaki, 1968 ; Bock et coll., 1986) et les caractéristiques de la surface des oeufs, y compris les empreintes polygonales, sont attribuées à l'activité sécrétoire de ces cellules (Omura et Kataoka, 1943). Le fait que les régions du micropyle de la surface dont les empreintes cellulaires en rosace diffèrent fortement entre les oeufs normaux et les mutants *emi* suggère que la fonction des cellules folliculaire formant les micropyles (Yamauchi et Yoshitake, 1984) est anormale chez le mutant. De plus, les bosses des régions dorsale, ventrale et postérieure et les polygones des régions plates latérales de la surface de l'oeuf mutant sont atypiques ; ce qui indique que la modulation morphologique due à la mutation *emi* est évidente sur la surface sécrétrice des cellules de l'épithélium folliculaire. Etant donné que la surface des polygones est plus petite et que le nombre de polygones par région latérale est plus faible, on pense que les cellules folliculaires du mutant sont inférieures en taille et en nombre. De plus, il semble que la mutation modifie le fonctionnement de l'épithélium et entraîne la formation d'aéropyles anormalement grands. Néanmoins, les structures lamellaires, y compris les lamelles observées dans les coupes transversales du chorion, sont normales chez ce mutant.

Dans l'ensemble, nous suggérons que le gène *emi* joue un rôle dans la détermination de la taille et du nombre de cellules de l'épithélium folliculaire, ce qui est évident pour ce qui concerne les modifications des empreintes de la surface des oeufs mais pas pour les structures des lamelles. Ce mutant constituera un outil intéressant lors de l'élucidation du contrôle génétique de l'architecture de l'oeuf.

RELATIONSHIP BETWEEN THE DEGREE OF HETEROSIS AND GENETIC DIVERGENCE IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S.K. SEN, B.P. NAIR*, S.K. DAS, G.C. ROY**, B. GHOSH**, P.R.T. RAO & S.S. SINHA**

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

The present experiment was carried out to predict the distribution frequency of hybrids and magnitude of heterosis by crossing various genetically divergent parents. The multivoltine and bivoltine parental stocks were grouped into five clusters each. Five multivoltine breeds, i.e., N (Nistari), Raj, CB5, G and B, and five multivoltine breeds, i.e., P5, NB18, JD6, SF19 and KSO, were selected for this study, one from each cluster. The selected parents were crossed in a diallel fashion separately and reared during two favourable (autumn and spring) and two unfavourable (dry summer and late monsoon) seasons. The genetically divergent parents were grouped into four classes, i.e., DC₁ ($> m + s$), DC₂ (m to $m + s$), DC₃ ($m - s$ to m) and DC₄ ($> m - s$), where m and s are mean and standard deviation of the divergence, respectively (Arunachalam and Bandyopadhyay, 1984). Heterosis was calculated in per cent improvement over mid-parent for six important characters, i.e., larval duration, larval weight, survival percentage, single cocoon weight, single shell weight and filament length. The analysis revealed that crosses involving the divergent group falling in DC₃ had a higher probability of producing more heterosis as compared to other classes in both multivoltine and bivoltine silkworm breeds.

Keywords: *Bombyx mori* L., multivoltine, bivoltine, genetic divergence, heterosis.

INTRODUCTION

The silkworm provides one of the earliest and best example of hybrid vigour. F₁ silkworm hybrids are in many respects superior to their parents (Toyama, 1906; Hirobe, 1956; Sengupta *et al.*, 1971, 1974; Jolly, 1983; Subba Rao *et al.*, 1989, 1990; Das *et al.*, 1994). Evaluation and choice of the parents is an important part of heterosis breeding programmes for any crop improvement. Where the germplasm collection is large it becomes difficult to identify parental stocks (Holden, 1984) and it is difficult to compare all possible breeds and crosses in the laboratory or at field level. Hence, it would be useful for the breeders to predict the heterosis that may occur in different hybrids. Provided there is no epistasis, heterosis generally depends on the difference in gene frequency between the populations or equivalently, the increase in heterozygosity in the F₁ (Ehiobu and Goddard, 1990) hybrids. Goddard and Ahmed (1982) defined a statistic F' to measure this, where

$$F' = (HF_1 - H_p)/H_p$$

H_p = Heterozygosity of the parent

HF_1 = Heterozygosity in the F₁ hybrid

Heterosis and specific combining ability are most important parameters of selection in F₁ hybrids. Ramanujam *et al.* (1984), Singh and Ramanujam (1981), Arunachalam and Bandyopadhyay (1984),

* Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram Post, Kodathi, Bangalore 560 035, India.

** Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, P.O. Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

Arunachalam *et al.* (1984), Gallias (1988), Troyer *et al.* (1988), Main and Bahl (1989) and Thakur and Zarger (1989) have reported different aspects of relationship between genetic divergence and heterosis in different agricultural crops.

Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) reported that two parents whose genetic divergence falls between $(m + s)$ and $(m - s)$, when crossed, will have higher chances of high frequency and magnitude of heterosis when compared to a cross whose parental divergence falls outside the limit $(m + s, m - s)$ where m and s are mean and standard deviation, respectively. The concept of limit to parental divergence for optimum expression of heterosis was studied in hybrids of geographically divergent parents in maize (Moll *et al.*, 1965).

The object of this paper is to determine and predict the frequency and magnitude of heterosis in F_1 hybrids raised from genetically divergent parents in the silkworm, *Bombyx mori* L.

MATERIALS AND METHODS

The genetic divergence among 15 multivoltine and 17 bivoltine silkworm breeds was measured by using D^2 statistics (Subba Rao *et al.*, 1991; Sen, 1993) separately. The multivoltine and bivoltine silkworms from the germplasm collection were grouped separately into five clusters. Five multivoltine breeds, i.e., Nistari (N), Raj, CB5, G and B, and five bivoltine breeds, i.e., P5, NB18, JD6, SF19 and KSO, were selected from each cluster, separately. The breeder's choice was also considered while selecting parents from each cluster. The selected parents of multivoltine and bivoltine silkworms were crossed in a diallel fashion separately. All the possible hybrids of multivoltine and bivoltine were reared during four commercial rearing seasons of West Bengal, i.e., two favourable seasons (autumn and spring) and two unfavourable seasons (dry summer and late monsoon). A standard schedule of silkworm rearing was followed with three replications for each hybrid and parent. The performance data on six important quantitative traits, i.e., larval duration (LD), larval weight (LW), survival percentage (SURV %), single cocoon weight (SCW), single shell weight (SSW) and filament length (FILL), were recorded. The heterosis was calculated over mid-parental values season-wise for multivoltine and bivoltine silkworms, separately.

The D^2 values were grouped into four classes, i.e., DC₁, DC₂, DC₃ and DC₄, as suggested by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984). The four divergence classes are defined as follows:

$$\begin{aligned} \text{DC}_1: D^2 &\geq (m + s) \\ \text{DC}_2: D^2 &< (m + s) \text{ and } < m \\ \text{DC}_3: D^2 &\geq (m - s) \text{ and } < m \\ \text{DC}_4: D^2 &< (m - s) \end{aligned}$$

where m and s are mean and standard deviation of D^2 values.

All the crosses were grouped into the above four divergence classes. The following parameters were considered as defined by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984).

- n : number of crosses falling in different divergent classes
- p : proportion of crosses showing heterosis
- q : proportion of crosses showing heterosis greater than k
- $\bar{x}$: mean of each character over such crosses with positive heterosis
- $\bar{y}$: mean of such crosses showing heterosis greater than k
- k : mean of all positive heterosis over all the four seasons

The above parameters were estimated for each divergent class and ranked for p , q , $\bar{x}$ and $\bar{y}$ separately. A sum of ranks across all the characters was calculated for each class.

RESULTS AND DISCUSSION

The means, standard deviation and the range of the genetic divergence values (D^2) were calculated and are presented in Table I. In multivoltine breeds the range of D^2 was greater than in bivoltine breeds.

The frequency of distribution of silkworm hybrids and their positive heterosis, average heterosis and average magnitude of positive heterosis observed in the different divergent classes are presented in Table II for multivoltine and bivoltine silkworms for fitness and cocoon characters. None of the multivoltine hybrids fell in the DC₄ divergent class. However, the bivoltine hybrids were distributed in all the four classes. The maximum number of hybrids belonged to the DC₃ for all the six characters in both the multivoltine and the bivoltine silkworms (Table II). The overall performance of different divergent classes was evaluated on the basis of the scoring process. The scoring was done over all six characters and four parameters p, q, x and y.

Table I. Mean, standard deviation and range of genetic divergence values in silkworms.

Tableau I. Moyenne, écart type et fourchette des valeurs de divergence chez les vers à soie.

Race	Mean of divergence values	Standard deviation	Range of divergence values
<i>Race</i>	<i>Moyenne des valeurs de divergence</i>	<i>Ecart type</i>	<i>Fourchette des valeurs de divergence</i>
Multivoltine / Polyvoltine	21.80	13.46	9.0-47.0
Bivoltine	24.89	4.09	16.8-32.0

The results revealed that the divergent class DC₃ topped in the list of multivoltine and bivoltine crosses and were closely followed by the divergent class DC₁.

The magnitude of heterosis occurred in the different divergent classes is presented in Tables III and IV for multivoltine and bivoltine silkworms, respectively. It is evident from the data that the magnitude of heterosis found in DC₃ is higher than the rest of the divergence classes in multivoltine hybrids irrespective of the season. However, in the case of bivoltine silkworms, the highest heterosis for each character was recorded among the hybrids belonging to either DC₁ or DC₃. During the spring and dry summer seasons, the highest heterosis was recorded in DC₁ whereas during autumn and late monsoon, the maximum heterosis was found in DC₃. The result obtained in multivoltine and bivoltine hybrids revealed a close relationship between the genetic diversity and heterosis values, as reported by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) and Srivastava and Arunachalam (1977).

Table II. Frequency of silkworm hybrids falling in different divergent classes (DC) with their mean values having positive heterosis.

Tableau II. Fréquence de présence des hybrides de vers à soie présentant une hétérosis positive dans les différentes classes de divergence (DC) avec leurs valeurs moyennes.

R	C	NF n	Larval duration <i>Durée larvaire</i>				Larval weight <i>Poids larvaire</i>				Survival % <i>Taux de survie</i>				Cocoon weight <i>Poids du cocon</i>				Shell weight <i>Poids de la coque</i>				Filament length <i>Longueur de la bave</i>				Score <i>Score</i>
			p	q	x	y	p	q	x	y	p	q	x	y	p	q	x	y	p	q	x	y	p	q	x	y	
M	DC ₁	8	25.0	25.0	19.7	19.8	85	60	27.6	27.8	75	38	8800	8944	100	38	1.20	1.22	100	38	0.18	0.19	60	12	545	349	47
	DC ₂	4	7.5	25.0	19.5	19.0	100	75	25.5	26.1	100	50	9279	9333	75	50	1.03	1.01	75	25	0.14	0.14	50	25	498	616	60
	DC ₃	28	35.0	18.0	20.2	20.6	89	99	28.1	27.8	99	40	8805	8631	98	40	1.21	1.21	98	40	0.19	0.19	61	32	578	617	32
B	DC ₁	8	38.0	38.0	22.7	23.2	98	25	38.1	38.0	100	25	6173	3278	100	38	1.44	1.46	100	38	0.29	0.29	100	38	943	1040	46
	DC ₂	8	75.0	38.0	24.4	23.8	100	38	34.2	31.1	99	25	5498	1611	99	38	1.30	1.33	99	50	0.26	0.26	50	25	911	892	73
	DC ₃	20	60.0	15.0	23.6	23.6	99	35	36.3	34.4	100	40	6232	3775	100	50	1.42	1.40	90	45	0.28	0.28	75	40	918	948	43
	DC ₄	4	25.0	25.0	24.6	24.0	100	50	36.4	35.2	100	50	7003	5161	100	25	1.49	1.60	100	50	0.29	0.30	75	25	965	951	63

R: race, **C:** class, **NF:** Number of F1's, **M:** Multivoltine, **B:** Bivoltine, **n:** number of crosses falling in different divergent classes; **p:** proportion of crosses showing heterosis; **q:** proportion of crosses showing heterosis greater than K; **x:** mean of each character over such crosses with positive heterosis; **y:** mean of such crosses showing heterosis greater than K.

R: race, **C:** classe, **NF:** nombre de F1, **M:** Polyvoltine, **B:** Bivoltine, **n:** nombre de croisements dans la classe de divergence concernée; **p:** proportion de croisements présentant une hétérosis; **q:** proportion de croisements présentant une hétérosis supérieure à K; **x:** moyenne de chaque caractère pour les croisements présentant une hétérosis positive; **y:** moyenne des croisements présentant une hétérosis supérieure à K.

The magnitude of heterosis was recorded highest in DC₃ in multivoltine hybrids. But in the case of bivoltine hybrids DC₁ was found top rank for spring and dry summer seasons and DC₃ was top for the other two seasons. The evaluation and importance of divergent classes, i.e., DC₁ and DC₃, would become clear if the results were based on a large number of crosses. Although DC₁ recorded the highest heterosis over DC₃, the difference in magnitude was very marginal.

The scoring process of different divergent classes with the help of the parameters *p*, *q*, *x* and *y* showed that the divergent class DC₃ is superior to DC₂ and DC₄ and this was closely followed by DC₁. The present study revealed that the right frequency and magnitude of heterosis recorded in the hybrids belonged to the divergent class DC₃. The parents of the hybrids belonging to the class DC₃ were with an intermediate genetic distance (*m* to *m* - *s*) in multivoltine and bivoltine silkworms. A few exceptions were recorded in bivoltines during the spring and summer seasons but the degree of heterosis did not decrease remarkably in the intermediate divergent class (DC₃) in these seasons.

Table III. Magnitude of heterosis observed in different divergent classes of multivoltine silkworm hybrids.

Tableau III. Amplitude de l'hétérosis observée dans différentes classes de divergence chez les hybrides de ver à soie polyvoltins.

Class Classe	Season Saison	LD	LW	SURV	SCW	SSW	FILL
DC ₁	Autumn / Automne	-3.60	5.64	-	8.96	10.06	29.52
	Spring / Printemps	-5.56	13.28	5.06	11.53	18.75	-
	Dry summer / Été sec	-2.44	11.99	1.66	12.46	18.51	-
	Late monsoon / Fin de mousson	-2.63	14.02	7.81	15.06	17.28	-
DC ₂	Autumn / Automne	-2.44	15.60	4.79	4.97	5.09	6.93
	Spring / Printemps	-3.11	11.69	10.30	-	-	-
	Dry summer / Été sec	1.68	3.52	11.59	5.94	2.42	-
	Late monsoon / Fin de mousson	0.00	12.26	4.27	2.74	1.98	8.59
DC ₃	Autumn / Automne	-4.76	15.93	7.39	14.95	18.92	22.22
	Spring / Printemps	-7.41	21.39	16.73	16.10	23.25	16.68
	Dry summer / Été sec	-2.44	23.20	19.48	34.22	35.27	19.75
	Late monsoon / Fin de mousson	-2.63	13.05	18.61	23.53	33.95	3.05

LD: larval duration; LW: larval weight; SURV: survival percentage; SCW: single cocoon weight; SSW: single shell weight; FILL: filament length.

LD : durée larvaire ; LW : poids larvaire ; SURV : taux de survie ; SCW : poids du cocon ; SSW : poids de la coque ; FILL : longueur de la bave.

Table IV. Magnitude of heterosis observed in different divergent classes of bivoltine silkworm hybrids.**Tableau IV. Amplitude de l'hétérosis observée dans différentes classes de divergence chez les hybrides de ver à soie bivoltins.**

Class Classe	Season Saison	LD	LW	SURV	SCW	SSW	FILL
DC ₁	Autumn / Automne	0.71	23.01	45.59	13.85	32.00	7.79
	Spring / Printemps	-3.05	2.19	4.98	10.07	14.84	5.79
	Dry summer / Été sec	-4.50	14.53	188.65	26.80	53.50	23.69
	Late monsoon / Fin de mousson	-0.80	8.30	175.21	26.67	61.42	4.11
DC ₂	Autumn / Automne	3.56	12.65	46.65	17.79	36.12	20.13
	Spring / Printemps	0.00	5.43	6.96	2.94	0.75	-
	Dry summer / Été sec	-0.72	6.86	-	24.07	40.76	12.73
	Late monsoon / Fin de mousson	-2.93	15.64	213.42	6.60	27.93	-
DC ₃	Autumn / Automne	-0.71	21.63	51.61	28.43	50.82	24.96
	Spring / Printemps	-1.84	9.02	7.51	3.81	6.33	0.43
	Dry summer / Été sec	-1.52	10.48	155.70	25.72	42.52	18.18
	Late monsoon / Fin de mousson	-2.93	22.87	242.28	26.23	68.36	13.20
DC ₄	Autumn / Automne	2.08	7.14	33.21	9.27	22.78	2.57
	Spring / Printemps	0.00	1.28	3.66	1.20	3.42	-
	Dry summer / Été sec	0.00	7.30	210.60	23.72	27.86	14.15
	Late monsoon / Fin de mousson	-3.74	8.67	105.79	8.48	9.29	12.08

LD: larval duration; LW: larval weight; SURV: survival percentage; SCW: single cocoon weight; SSW: single shell weight; FILL: filament length.

LD: durée larvaire; LW: poids larvaire; SURV: taux de survie; SCW: poids du cocon; SSW: poids de la coque; FILL: longueur de la bave.

REFERENCES

- ARUNACHALAM V., BANDYOPADHYAY A. (1984) Limit to genetic divergence for occurrence of heterosis — Experimental evidence from crop plants. *Indian J. Genet.*, 44(3), 548-554.
- ARUNACHALAM V., BANDYOPADHYAY A., NIGAM S.N., GIBBONS R.W. (1984) Heterosis in relation to genetic divergence and specific combining ability in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 33-39.
- DAS S.K., PATNAIK S., GHOSH B., SINGH T., NAIR B.P., SEN S.K., SUBBA RAO G. (1994) Heterosis analysis in some three-way crosses of *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 34(1), 51-61.
- EHIOBU N.G., GODDARD M.E. (1990) Heterosis in crosses between geographically separated populations of *Drosophila melanogaster*. *Theo. Appl. Genet.*, 80, 569-575.
- GODDARD M.E., AHMED A.M. (1992) The use of genetic distance between cattle breeds to predict heterosis in crosses. *Proc. 2nd World Cong. Genet. Appl. Livestock Prod.*, Madrid, Spain, pp. 377-382.
- GALLIAS A. (1988) Heterosis: its genetic basis and its utilization in plant breeding. *Euphytica*, 39, 95-104.

- HIROBE T. (1956) Analysis of heterosis made with the silkworm. Proc. Internat. Genet. Symp. Suppl. Vol. Cytologia, 357-361.
- HOLDEN J.H.W. (1984) The second ten years. In Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation, pp. 276-285. Holden J.H.W. and William J.T. (Eds). Allen and Unwin Inc., Winchester.
- JOLLY M.S. (1983) Silkworm genetics and breeding. Lead paper. National Seminar on Seric. Research and Development, Session III, 10-13 March, Bangalore, 1-19.
- MAIN M.A.K., BAHL P.N. (1989) Genetic divergence and hybrid performance in chickpea. Indian J. Genet., 49(1), 119-124.
- MOLL R.H., LONNQVIST J.H., FORTUNO J.V., JOHNSON E.C. (1985) The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. Genetics, 52, 139-144.
- RAMANUJAM S., TIWARI A.S., MEHRA R.B. (1974) Genetic divergence and hybrid performance in mungbean. Theor. Appl. Genet., 45, 211-214.
- SEN S.K. (1993) On some aspects of improvement of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. thesis, Dept. of Zoology, Univ. of Ranchi, India.
- SENGUPTA K., DATTA R.K., BISWAS S.N., SINGH B.D. (1971) Heterosis in multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Yield performance of F₁ hybrids of Nistari and four evolved multivoltine breeds. Indian J. Seric., 10, 6-13.
- SENGUPTA K., YUSUF M.R., GROVER S.P. (1974) Hybrid vigour and genetic analysis of quantitative traits in silkworm. Indian J. Genet. SABRAO, 34(4), 249-256.
- SINGH S.P., RAMANUJAM S. (1981) Genetic divergence and hybrid performance in *Cicer arietinum* L. Indian J. Genet., 41, 268-276.
- SRIVASTAVA P.S.L., ARUNACHALAM V. (1977) Heterosis as a function of genetic divergence in triticale. Z. Pflanzenzuchtung, 78, 269-275.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., GHOSH B. (1989) Heterosis effect on some new silkworm hybrids evolved by three-way cross. Perspective in Cytology and Genetics, 6, 373-378.
- SUBBA RAO G., SEN S.K., GHOSH B., DAS S.K. (1990) Heterosis in some hybrid indigenous and bivoltine races of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Perspective in Cytology and Genetics, 7, 1043-1054.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., DAS N.K. (1991) Genetic divergence among 15 multivoltine genetic stock of silkworm (*Bombyx mori* L.). Indian J. Seric., 30(1), 72-74.
- THAKUR H.L., ZARGER M.A. (1989) Heterosis in relation to genetic divergence and specific combining ability in Indian mustard, *Brassica juncea* L. Czern. Indian J. Genet., 49(2), 223-226.
- TOYAMA K. (1906) Studies on hybridology of insects. In some silkworm crosses with special reference to Mendel's law of heredity. Bull. Coll. Agric. Tokyo Univ., 7, 259-293.
- TROYER A.F., OPENSHAW S.J., KNITTLE K.H. (1988) Measurement of genetic diversity among popular commercial corn hybrids. Crop Sci., 28, 431-485.

RELATION ENTRE LE DEGRE D'HETEROSIS ET LA DIVERGENCE GENETIQUE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

S.K. SEN, B.P. NAIR**, S.K. DAS, G.C. ROY**, B. GHOSH, P.R.T. RAO & S. SINHA**

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

L'expérience présentée ici a été réalisée afin de prévoir la fréquence des hybrides et l'amplitude de l'hétérosis en croisant des parents génétiquement divergents. Les souches parentales polyvoltines et bivoltines ont été réparties en cinq groupes. Cinq souches polyvoltines, N (Nistari), Raj, CB5, G et B, et cinq souches bivoltines, P5, NB18, JD6, SF19 et KSO, ont été sélectionnées dans chacun des groupes pour cette étude. Les parents sélectionnés ont été croisés selon un modèle diallèle individuellement et élevés au cours de deux saisons favorables (automne et printemps) et deux saisons défavorables (été sec et fin de mousson). Les parents génétiquement divergents ont été répartis en quatre catégories : DC₁ (> m + s), DC₂ (m à m + s), DC₃ (m - s à m) et DC₄ (> m - s) où m et s sont respectivement la moyenne et l'écart type de la divergence (Arunachalam et Bandyopadhyay, 1984). L'hétérosis a été calculée sous forme de pourcentage d'amélioration par rapport aux parents moyens pour six caractères importants, la durée larvaire, le poids larvaire, le pourcentage de survie, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave. L'analyse révèle que les croisements issus du groupe divergent de la catégorie DC₃ présentent une probabilité d'hétérosis supérieure à celle des autres catégories aussi bien chez les souches polyvoltines que chez les souches bivoltines.

INTRODUCTION

Le ver à soie est l'exemple le plus ancien et le plus caractéristique de la vigueur hybride. Les hybrides de ver à soie F₁ sont, à de nombreux égards, supérieurs à leurs parents (Toyama, 1906 ; Hirobe, 1956 ; Sengupta et coll., 1971, 1974 ; Jolly, 1983 ; Subba Rao et coll., 1989, 1990 ; Das et coll., 1994). L'évaluation et le choix des parents constituent une étape importante des programmes de sélection de l'hétérosis lorsque l'on cherche à améliorer une culture donnée. Lorsque l'on dispose d'une vaste collection génétique, il est difficile d'identifier des souches parentales (Holden, 1984) et de comparer les souches potentielles et leurs croisements en laboratoire ou sur le terrain. Il serait donc utile que les sélectionneurs puissent prévoir l'hétérosis potentielle de différents hybrides. S'il n'y a pas d'épistasie, l'hétérosis est généralement fonction de la différence de fréquence des gènes entre les populations ou de l'augmentation de l'hétérozygotie chez les hybrides F₁ (Ehiobu et Goddard, 1990). Goddard et Ahmed (1982) ont défini une statistique F' pour mesurer cette différence :

$$F' = (HF_1 - H_p)/H_p$$

H_p = hétérozygotie chez les parents

HF₁ = hétérozygotie chez l'hybride F₁

* Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram Post, Kodathi, Bangalore 560 035, Inde.

** Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, P.O. Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, Inde.

L'hétérozygotie et la capacité combinatoire des parents sont les paramètres les plus importants pour la sélection des hybrides F₁. Ramanujam et coll. (1984), Singh et Ramanujam (1981), Arunachalam et Bandyopadhyay (1984), Arunachalam et coll. (1984), Gallias (1988), Troyer et coll. (1988), Main et Bahl (1989) et Thakur et Zarger (1989) ont étudié différents aspects de la relation entre la divergence génétique et l'hétérosis chez diverses cultures.

Arunachalam et Bandyopadhyay (1984) ont observé que les croisements issus de deux parents dont la divergence génétique se situe entre $(m + s)$ et $(m - s)$ auront une plus forte probabilité de fréquence et d'amplitude hétérotique élevée que les croisements issus de parents dont la divergence se situe en dehors de la limite $(m + s, m - s)$, m étant la moyenne et s l'écart type. Le concept de limite de la divergence parentale pour une expression optimale de l'hétérosis a été étudié chez des hybrides de maïs issus de parents géographiquement divergents (Moll et coll., 1965).

L'objectif de cet article est de déterminer et de prévoir la fréquence et l'amplitude de l'hétérosis chez des hybrides F₁ issus de parents génétiquement divergents chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

MATERIELS ET METHODES

La divergence génétique entre 15 souches polyvoltines et 17 souches bivoltines de ver à soie a été mesurée individuellement d'après la méthode statistique D^2 (Subba Rao et coll., 1991 ; Sen, 1993). Les vers à soie polyvoltins et bivoltins de la banque génétique ont été répartis en cinq groupes. Cinq souches polyvoltine, N (Nistari), Raj, CB5, G et B, et cinq souches bivoltines, P5, NB18, JD6, SF19 et KSO, ont été sélectionnées séparément dans chaque groupe. Le point de vue du sélectionneur a également été pris en compte lors de la sélection des parents pour chaque groupe. Les parents sélectionnés des vers à soie polyvoltins et bivoltins ont été croisés de manière diallélique individuellement. Tous les hybrides possibles de polyvoltins et de bivoltins ont été élevés au cours des quatre saisons d'élevage commercial du Bengale occidental, à savoir deux saisons favorables (automne et printemps) et deux saisons défavorables (été sec et fin de mousson). On a suivi le calendrier standard d'élevage des vers à soie, avec trois répétitions pour chaque hybride et chaque parent. Les données concernant la performance portent sur six caractères quantitatifs importants : la durée larvaire, le poids larvaire, le taux de survie, le poids du cocon, le poids de la coque et la longueur de la bave. L'hétérosis a été calculée par rapport aux valeurs du parent moyen en fonction de la saison séparément pour les polyvoltins et les bivoltins.

Les valeurs D^2 ont été réparties en quatre catégories, DC₁, DC₂, DC₃ et DC₄, selon la méthode proposée par Arunachalam et Bandyopadhyay (1984). Les quatre catégories de divergence sont définies ci-dessous :

$$\begin{aligned} \text{DC}_1 : D^2 &\geq (m + s) \\ \text{DC}_2 : D^2 &< (m + s) \text{ et } < m \\ \text{DC}_3 : D^2 &\geq (m - s) \text{ et } < m \\ \text{DC}_4 : D^2 &< (m - s) \end{aligned}$$

où m et s correspondent respectivement à la moyenne et à l'écart type des valeurs D^2 .

Tous les croisements ont été répartis dans ces quatre catégories de divergence. Les paramètres suivants ont été pris en compte, selon la méthode définie par Arunachalam et Bandyopadhyay (1984).

- n : nombre de croisements entrant dans des catégories de divergence différentes
- p : proportion de croisements présentant une hétérosis
- q : proportion de croisements présentant une hétérosis supérieure à k
- x : moyenne de chaque caractère par rapport aux croisements ayant une hétérosis positive
- y : moyenne des croisements présentant une hétérosis supérieure à k
- k : moyenne de toutes les hétérosis positives pour les quatre saisons

Ces paramètres ont été estimés pour chaque catégorie de divergence et classés pour p, q, x et y séparément. La somme des classements obtenus pour tous les caractères a été calculée pour chaque catégorie.

RESULTATS ET DISCUSSION

La moyenne, l'écart type et l'amplitude des valeurs de divergence génétique (D^2) ont été calculés et sont présentés dans le tableau I. Chez les souches polyvoltines, l'amplitude de D^2 est supérieure à celle obtenue pour les souches bivoltines.

La fréquence de distribution des hybrides de ver à soie polyvoltins et bivoltins et leur hétérosis positive, leur hétérosis moyenne et l'amplitude moyenne d'hétérosis positive dans les différentes catégories de divergence sont présentées dans le tableau II en fonction des caractères du cocon et des classements obtenus. Aucun des hybrides polyvoltins n'entre dans la catégorie de divergence DC₄. Cependant, les hybrides bivoltins se répartissent dans les quatre catégories. Le nombre maximal d'hybrides pour les six caractères entre dans la catégorie DC₃ tant pour les bivoltins que pour les polyvoltins (Tableau II). La performance globale des différentes catégories de divergence a été évaluée sur la base du classement obtenu. Le classement porte sur les six caractères et les quatre paramètres p, q, x et y.

Les résultats révèlent que la catégorie de divergence DC₃ arrive en tête de la liste des croisements polyvoltins et bivoltins, juste devant la catégorie de divergence DC₁.

L'amplitude d'hétérosis dans les différentes catégories de divergence est présentée dans le tableau III pour les polyvoltins et dans le tableau IV pour les bivoltins. Les données montrent clairement que l'amplitude d'hétérosis observée dans la catégorie DC₃ est supérieure à celle obtenue dans les autres catégories de divergence pour les hybrides polyvoltins, quelle que soit la saison. Cependant, chez les bivoltins, l'hétérosis pour tous les caractères est maximale chez les hybrides appartenant soit à DC₁, soit à DC₃. Pour le printemps et l'été sec, l'hétérosis est maximale chez la catégorie DC₁ tandis que pour l'automne et la fin de mousson elle est maximale chez la catégorie DC₃. Les résultats obtenus chez les hybrides polyvoltins et bivoltins font apparaître une relation étroite entre la diversité génétique et les valeurs de l'hétérosis, comme l'ont observé Arunachalam et Bandyopadhyay (1984) et Srivastava et Arunachalam (1977).

L'amplitude d'hétérosis des hybrides polyvoltins est maximale pour la catégorie DC₃. Cependant, chez les hybrides bivoltins, la catégorie DC₁ donne les meilleurs résultats pour le printemps et l'été sec et DC₃ donne les meilleurs résultats pour les deux autres saisons. L'évaluation et l'importance des catégories de divergence DC₁ et DC₃ seraient indiscutables si les résultats étaient basés sur un grand nombre de croisements. Bien que DC₁ enregistre l'hétérosis maximale par rapport à DC₃, la différence d'amplitude reste très faible.

Le classement des différentes catégories de divergence en fonction des paramètres p, q, x et y montre que la catégorie de divergence DC₃ est supérieure aux catégories DC₂ et DC₄, devant DC₁. Cette étude révèle que les hybrides donnant la bonne fréquence et la bonne amplitude d'hétérosis entrent dans la catégorie de divergence DC₃. Les parents des hybrides appartenant à la catégorie DC₃ sont à distance génétique intermédiaire (m à $m - s$) chez les polyvoltins et les bivoltins. On observe quelques exceptions chez les bivoltins au printemps et en été mais le degré d'hétérosis ne diminue pas de manière marquée dans la catégorie de divergence intermédiaire (DC₃) au cours de ces saisons.

PROGRESSIVE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS INFECTED TISSUES OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

C.A.M. FLORA, M.V. SAMSON*, B. NATARAJU, M. BALAVENKATASUBBAIAH & R.K. DATTA

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

*A progressive histopathological study of the various larval tissues of the silkworm, **Bombyx mori** L., infected with the nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) has been carried out. There was a consistent relationship between the histopathological changes and the progression of external symptoms. BmNPV infects the nuclei of fat bodies, haemocytes, hypodermis, tracheal matrix, silk gland, gonads, muscles and nerve cells. Polyhedra of both small and large sizes were found in different tissues, but within a nucleus all the polyhedra observed were of uniform size. Histochemical studies revealed a substantial increase in the synthesis of nuclear protein in the fat body, haemocytes, hypodermis, tracheal matrix and silk gland following the infection.*

Keywords: Nuclear polyhedra, tissues, histopathological changes, hypertrophy.

INTRODUCTION

Nuclear polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* L., caused by *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) is one of the earliest known viral diseases (Nysten, 1808). It is well known that BmNPV can infect a variety of larval tissues. The recent reports have demonstrated that it can infect the follicular epithelium of silkmoths (Smith-Johanssen *et al.*, 1986) and epithelial sheath of testes (Attathom and Sinchaisri, 1987) as well as those already established as sites of infection, i.e., cells of fat body, trachea, hypodermis, blood and silk gland (Aruga, 1957; Tinsley and Harrap, 1977).

Behavioural changes associated with baculovirus infection have been discussed by Entwistle and Evans (1985). Granados and Lawler (1980) provided a comprehensive account of the early steps in polyhedral dissolution and passage of *Autographica californica* NPV in *Trichoplusia ni* larvae. Mazzone (1985) has reviewed the various events occurring in the gut, haemocoel and haemolymph after ingestion of the virus. Histochemical observations of the BmNPV-infected cells have been reported by Bergold and Friedrich-Freska (1947), Iwasaki (1954), Iwashita and Aruga (1957) and Shigematsu and Noguchi (1969a, 1969b).

In spite of the extensive literature available on the pathological changes associated with BmNPV infection, far less is known about the day-wise progressive histopathological changes. Hence, the present study was conducted with the objective to establish the time between infection and manifestation of histopathological changes in various tissues and to correlate the gross symptomatology with the mortality.

* Director, Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Carmelaram P.O., Bangalore - 560 035, India.

MATERIALS AND METHODS

1. Induction of infection:

A popular bivoltine pure breed, Kalimpong A (KA), was selected for the present work. The larvae were brushed and reared following the standard rearing conditions (Krishnaswami *et al.*, 1973). After the second moult, the larvae were replicated into groups of 200 larvae each and maintained per treatment. The nuclear polyhedra were collected in sterile distilled water from the haemolymph of the nuclear polyhedrosis infected silkworms and were purified by differential centrifugation (Sugimori *et al.*, 1990). A polyhedral suspension in sterile distilled water containing 1×10^6 polyhedra/ml was used to induce infection. The larvae were infected perorally by feeding 50 sq. cm mulberry discs smeared with 0.25 ml of inoculum. A control batch without any induction of infection was also maintained for comparison.

2. Sampling of tissues:

Samples of various tissues, i.e., haemolymph, trachea, midgut, fat body, Malpighian tubule and silk gland, were smeared every day up to the seventh day of infection and stained with azocarmine G (Palmieri *et al.*, 1978), for identification of polyhedra.

3. Histopathological techniques:

The larval tissues were fixed every day up to the seventh day of infection in alcoholic Bouin's fixative and 2.5% glutaraldehyde for staining the polyhedra and total proteins, respectively. The fixed tissues were processed and embedded in paraffin wax. Serial sections of 4-7 μ m thickness were stained following the methods of Hamm (1966) and Palmieri and Sullivan (1977) for identification of the polyhedra. Histochemical staining of total proteins in the tissues was performed according to Cawood *et al.* (1978).

RESULTS AND DISCUSSION

The present histopathological study revealed a relationship between the histopathological changes and the progression of external symptoms. No infected cells were observed in the different tissues of control larval sections (untreated) and their nuclei were smaller (Fig. 1) whereas, in treated larval sections, the infection was restricted to the nuclei of infected tissues, which could be well differentiated from the healthy ones by their staining property, in 24 hr post inoculation (pi). The nuclei of fat bodies, haemocytes and hypodermis were hypertrophied, stained red, and staining was darker in the fat body (Fig. 2a and 2b). At this stage, no symptoms were observed except that the worms became slightly sluggish.

After 48 hr, the nuclei of the tracheal matrix, haemocytes and hypodermis stained red, denoting their hypertrophied nature (Fig. 2c and 2c). The fat body nuclei contained the typical virogenic stroma (Fig. 2d) described by Xeros (1956), which is probably condensed chromatin reported to be different from the host protein (Mazzone, 1985). After 72 hr, the granularity of the fat body and silk gland nuclei increased by showing some tiny, red-coloured granules (Fig. 3a). These granules may be propolyhedra or developing polyhedra (Smith and Xeros, 1953). The nuclei of fat body, haemocytes and hypodermis were almost filled with polyhedra by 96 hr pi. The tissues infected were stained intensely blue (Fig. 3b). The silk gland nuclei were hypertrophied, but only the developing polyhedra were not clear (Fig. 3c). At this stage only, the intersegmental swelling of infected larvae started, resulting in jaundiced appearance.

At 120 hr pi, the larvae became shiny, resembling a bamboo stem. Massive quantities of inclusion bodies are produced as most of the body tissues become infected, the end result being virtually a bag of virus (Evans *et al.*, 1981). The hypodermis was extremely fragile and the body wall frequently ruptured, releasing a milky fluid. The fluid when examined was found to have well-developed polyhedra. Most of the larvae moved aimlessly along the ridges of rearing trays, and the mechanism behind these behavioural changes is not known. But early infection of the gut (as in the case of nuclear polyhedrosis of the saw fly), haemocytes and nerve ganglia may well mimic starvation, so that larvae

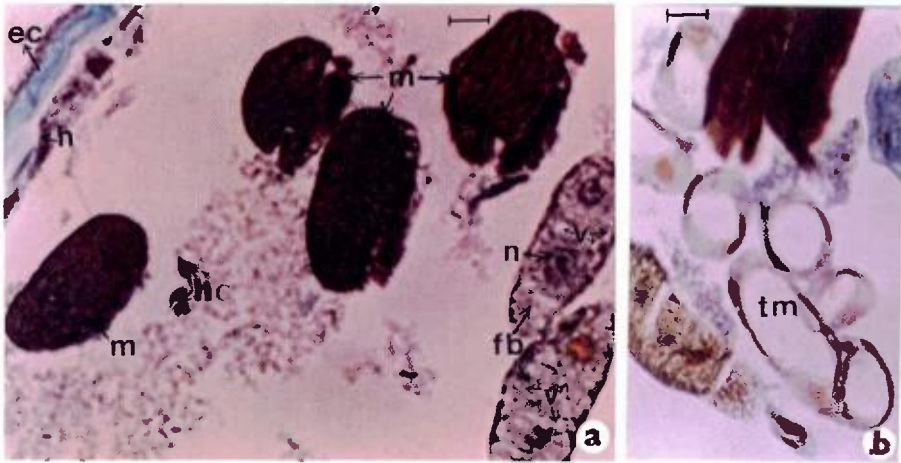


Fig. 1.

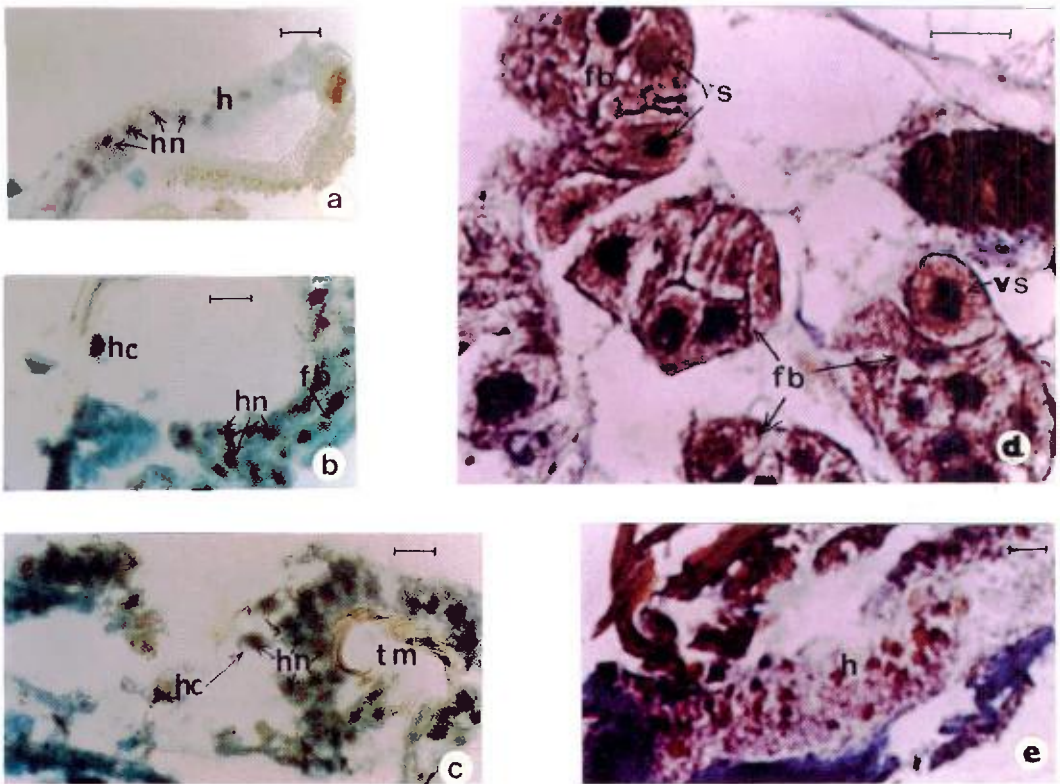


Fig. 2

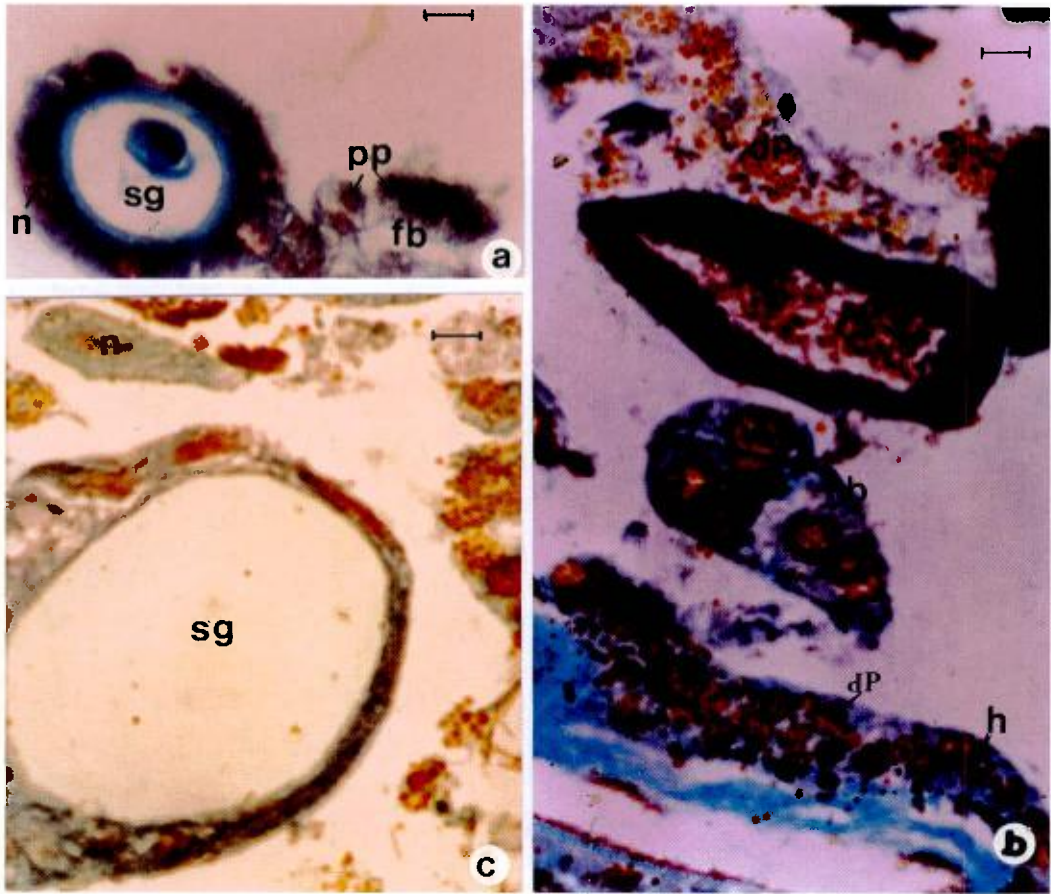


Fig. 3

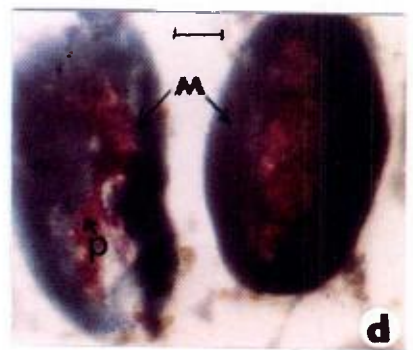
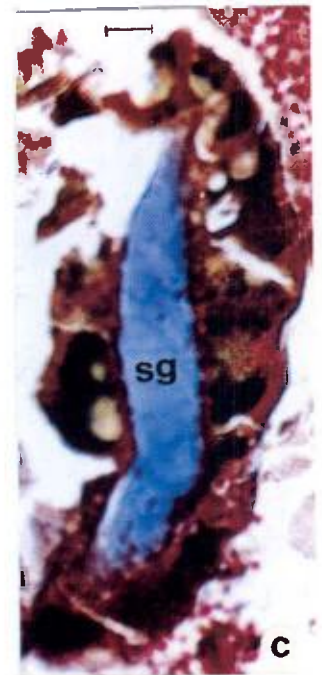
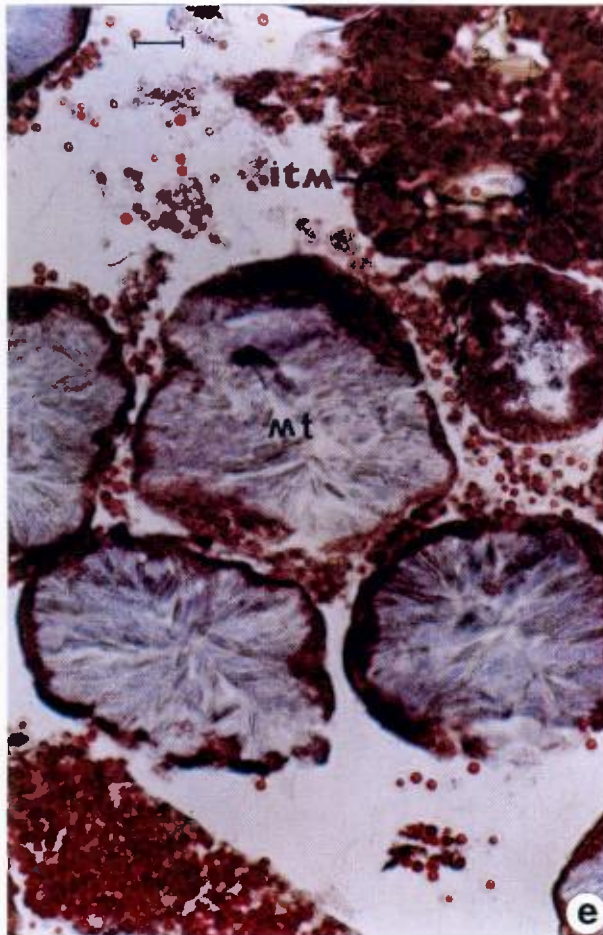
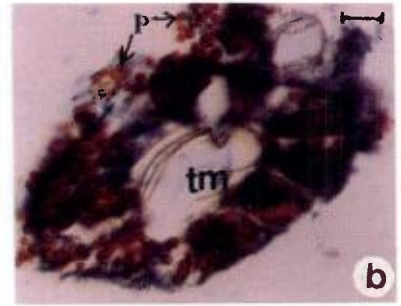
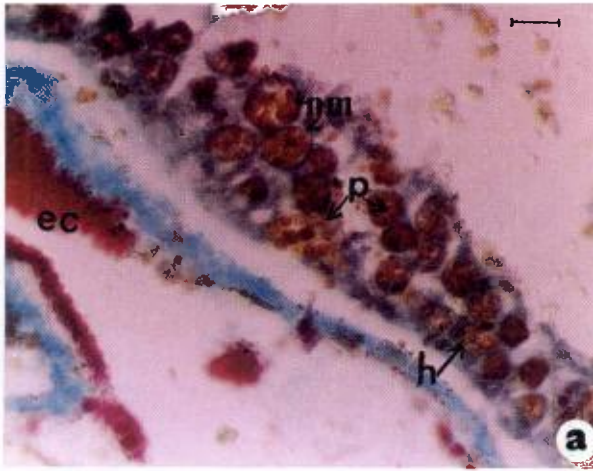


Fig. 4

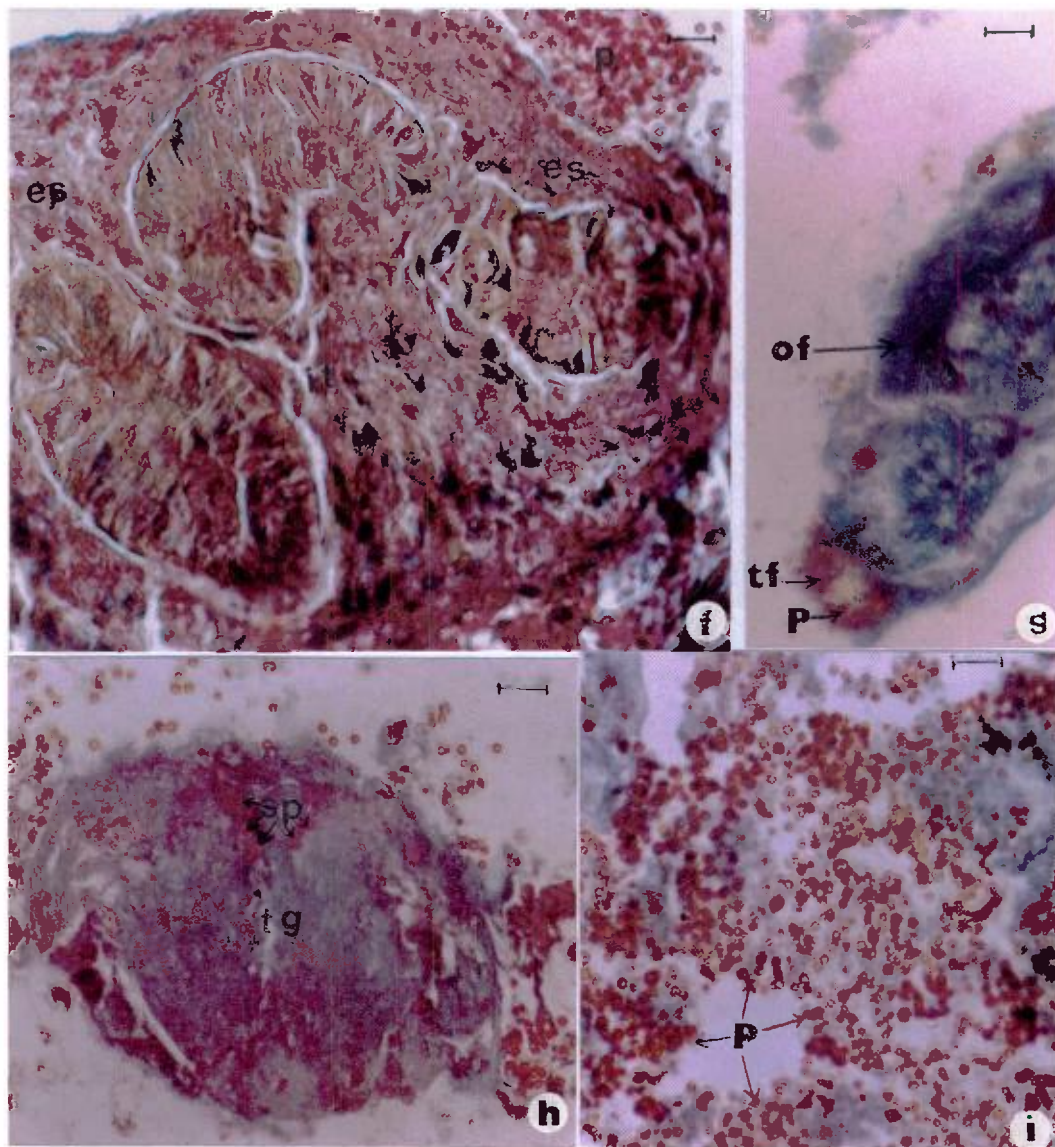


Fig 4. (Continued / Suite)

Fig. 1: Stained sections of healthy *B. mori* larvae.

a: Normal fat bodies (fb) with large vacuoles (v) and small nuclei (n), muscles (m), epicuticle (ec), haemocytes (hc) and hypodermis (h). Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

b: Healthy tracheal matrices (tm). Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

Fig. 1 : Coupes colorées de larves saines de *B. mori*.

a : Corps adipeux normaux (fb) comportant de grandes vacuoles (v) et des noyaux (n), muscles (m) normaux, épicuticule (ec) normale et hypoderme (h) normale de petite taille. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

b : Matrices trachéennes saines (tm). Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

Fig. 2: Sections of *B. mori* larvae inoculated with BmNPV.

a: Hypodermis (h) with hypertrophied nuclei (hn) 24 hr pi. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

b: Fat body (fb) and haemocyte (hc), 24 hr pi with hypertrophied nuclei (hn). Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

c: Tracheal matrix (tm) and haemocytes (hc) 48 hr pi, showing nuclear hypertrophy (hn). Modified azan stain. Bar indicates 2 μ m.

d: Fat body (fb) cells 48 hr pi, with typical virogenic stroma (vs) within the nuclei. Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

e: Hypodermis (h) after 48 hr showing hypertrophied nuclei. Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

Fig. 2 : Coupes de larves de *B. mori* inoculées avec du BmNPV.

a : Hypoderme (h) comportant des noyaux hypertrophiés (hn) 24 h après l'inoculation. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

b : Corps adipeux (fb) et hémocyte (hc) 24 h après l'inoculation comportant des noyaux hypertrophiés (hn). Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

c : Matrice trachéenne (tm) et hémocytes (hc) 48 h après l'inoculation présentant une hypertrophie nucléaire (hn). Coloration à l'azan modifié. Trait : 2 μ m.

d : Cellules du corps adipeux (fb) 48 h après l'inoculation comportant un stroma vironique (vs) typique à l'intérieur des noyaux. Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

e : Hypoderme (h) après 48 h présentant des noyaux hypertrophiés. Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

Fig. 3

a: Infected anterior part of middle division of silk gland (sg) and fat body (fb) nuclei, 72 hr pi, showing propolyhedra (pp), n-nucleus. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

b: Fat body (fb) and hypodermis (h) 96 hr pi, showing developing polyhedra (dp) within the hypertrophied nuclei. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

c: Posterior part of silk gland (sg) and nerve cell (n) 96 hr pi showing hypertrophied nuclei. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

a : Noyaux de la partie antérieure infestée de la division médiane de la glande séricigène (sg) et du corps adipeux (fb) 72 h après l'inoculation montrant les propolyèdres (pp), n-noyau. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

b : Corps adipeux (fb) et hypoderme (h) 96 h après l'inoculation présentant des polyèdres en cours de développement (dp) à l'intérieur des noyaux hypertrophiés. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

c : Partie postérieure de la glande séricigène (sg) et des cellules nerveuses (n) 96 h après l'inoculation présentant des noyaux hypertrophiés. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

Fig. 4: Sections of *B. mori* larvae 120 hr pi.

a: The nuclei of hypodermis (h) and epicuticle (ec) filled with developed polyhedra (p). Note in some areas the nuclear membrane (nm) breaks, liberating polyhedra. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

b: Tracheal matrix (tm) with polyhedra (p). Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

c: Silk gland (sg) with disfigured appearance. Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

d: Muscles (m) with polyhedral bodies (p) in-between muscle strands. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

e: Infected tracheal matrix (itm) filled with polyhedra and uninfected Malpighian tubules (mt). Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

f: Infected testis (it) showing epithelial sheath (es) filled with polyhedra (p). Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

g: Ovarian follicle (of) with polyhedral bodies (p) in the terminal filament (tf) area. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

h: Thoracic ganglion (tg) showing small-sized polyhedra (sp) within the nucleus. Mallory's triple stain. Bar indicates 1 μ m.

i: Section showing well-developed polyhedra (p) found free in the haemocoel area after disintegration of the nuclear membrane and lysis of infected cells. Modified azan stain. Bar indicates 1 μ m.

Fig. 4 : Coupes de larves de *B. mori* 120 h après l'inoculation.

a : Les noyaux de l'hypoderme (h) et de l'épicuticule (ec) sont remplis de polyèdres matures (p). Dans certaines zones, la membrane nucléaire (nm) se rompt et libère les polyèdres. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

b : Matrice trachéenne (tm) avec des polyèdres (p). Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

c : Glande séricigène difformée. Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

d : Muscles (m) comportant des corpuscules polyédriques (p) entre les torons musculaires. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

e : Matrice trachéale infestée (itm) remplie de polyèdres et tubes malpighiens (mt) non infestés. Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

f : Testicule infesté (ti) présentant une gaine épithéliale (es) remplie de polyèdres (p). Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

g : Follicle ovarien (of) comportant des corpuscules polyédriques (p) dans la zone du filament terminal (tf). Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

h : Ganglion thoracique (tg) montrant des polyèdres de petite taille (sp) à l'intérieur du noyau. Triple coloration de Mallory. Trait : 1 μ m.

i : Coupe présentant des polyèdres (p) bien développés libérés dans la zone de l'hémocoèle après désintégration de la membrane nucléaire et lyse des cellules infestées. Coloration à l'azan modifié. Trait : 1 μ m.

continue to search for food even with a full gut (Evans and Allaway, 1983) and subsequently fall over the ground and die.

Table I. Comparison of protein level between BmNPV infected (I) and normal (C) tissues of *Bombyx mori* larvae.

Tableau I. Comparaison des teneurs en protéines dans les tissus infestés par le BmNPV (I) et les tissus sains (C) de *Bombyx mori*.

Tissues Tissus	Days / Jours						
	1	2	3	4	5	6	7
Fat body / Corps adipeux							
C*	-	-	-	-	-	-	-
I	++	+++	++++	+++++	+++++	+++++	++++
Haemocytes / Hémocytes							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	+	++	+++	++++	+++++	+++++	++++
Hypodermis / Hypoderme							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	+	++	++++	++++	+++++	++++	++++
Trachea / Trachée							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	-	+++	+++	++++	+++++	+++	++
Silk gland / Glande séricigène							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	-	+	+++++	++++	++++	+++	+++
Muscle							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	+	+	+++	++++	+++++	++++	+++
Malpighian tubules / Tubes malpighiens							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-
Epicuticle / Epicuticule							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	+	+++	++++	+++	+++
Gut / Intestin							
C	-	-	-	-	-	-	-
I	+	+	++	+	+	+	+

+ Coomassie positive / Réaction au coomassie.

- Coomassie negative / Pas de réaction au coomassie.

* Healthy protein staining in control larvae was not taken into account.

* La coloration des protéines saines chez les larves témoins n'a pas été prise en considération.

By this time (120 hr pi) all the tissue sections, i.e., fat body, hypodermis, tracheal epithelium, silk gland, muscles, gonads and thoracic ganglion, except Malpighian tubules and midgut, revealed the infection (Fig. 4a-h). Due to severe infection, the nuclei of most of the tissues were hypertrophied to an enormous size until the nuclear membrane broke and the cytoplasm destroyed, permitting

polyhedra to escape into the body cavity, where they were found in great numbers (Fig. 4i). Although primary infection occurs in the gut, there was no occlusion of the virus particles in the gut cells (Mazzone, 1985). The present observations are in conformity with the findings of Tinsley and Harrap (1977), Smith-Johanssen *et al.* (1986), Attathom and Sinchaisri (1987), and also with the histopathological symptoms of nuclear polyhedrosis of lepidopteran larvae.

Polyhedra of two different sizes were observed in the infected tissues. However, they were always of the same size in the same nucleus. This finding tends to support Smith's (1967) observation. The smallest polyhedra were found in the nervous tissue, muscular tissue and then follow the polyhedra of the tracheal matrix, hypodermis, haemocytes and adipose tissues, as shown by Benz (1963). The smeared samples as well as histopathological sections revealed the following sequence at the time of polyhedral incidence: (1) fat body, (2) haemocytes, (3) hypodermis, (4) tracheal matrix, (5) silk gland, (6) gonads, (7) muscles and (8) nerve cells. The same sequence applies to the histochemical changes described below.

Shigematsu and Takeshita (1958) observed an increase in protein concentration of the fat body, late in the course of disease in NPV-infected *B. mori*. While Shigematsu and Noguchi (1969a, 1969b) showed a rapid increase in the protein synthesis in the fat body and silk gland, and attributed it to the increased synthesis of the viral and polyhedral proteins, Bergold and Friedrich-Freska (1947) demonstrated that the protein content of polyhedrosis-diseased silkworms increases by some 50%. The present study also adds credence to the above findings (Table I). The positive staining was first observed in the parts of the fat body situated next to the gut, later on in the fat body below the hypodermis and then in the haemocytes and hypodermis. Even after polyhedral formation, these tissues showed positive reaction whereas, in control larvae, all the tissues revealed negative reaction only.

There is an increased interest in the mechanism of virus multiplication and the response of the host to the virus. Sampling of larvae before the completion of the incubation period of the virus, that is, at the time when lysis of the infected cells is minimum (72-84 hr), would help in effective diagnosis and further prevention and control of the disease at its initial stage itself. The information presented here is relevant and indispensable for proper understanding of the complex and fascinating pathology associated with NPV infection. Such information would be valuable in subsequent early diagnostic and prophylactory measures to achieve control by an integrated approach suitable to the prevailing conditions.

REFERENCES

- ARUGA H. (1957) Polyhedral diseases in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Silkworm, 9, 381-412.
- ATTATHOM T., SINCHAI SRI N. (1987) Nuclear polyhedrosis virus isolated from *Bombyx mori* in Thailand. Sericologia, 27(2), 287-295.
- BENZ G. (1963) A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Staudinger). J. Insect Pathol., 5, 215-241.
- BERGOLD G., FRIEDRICH-FRESKA H. (1947) Zur Grosse und Serologie des *Bombyx mori*-Polyedervirus. Z. Naturforsch., 2b, 410-414.
- CAWOOD A.H., POTTER U., DICKINSON H.G. (1978) An evaluation of coomassie blue as a stain for quantitative microdensity of protein in section. J. Histochem. Cytochem., 26, 645-650.
- ENTWISTLE P.F., EVANS H.F. (1985) Viral control. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 12, 347. Pergamon Press, Oxford.
- EVANS H.F., ALLAWAY G.P. (1983) Dynamics of baculovirus growth and dispersal in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) larval population introduced into small cabbage plots. Appl. Environ. Microbiol., 45, 493.
- EVANS H.F., LOMER C.J., KELLY D.C. (1981) Growth of nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* L. Arch. Virol., 70, 207.
- GRANADOS R.R., LAWLER K.A. (1980) *In vivo* pathway of *Autographica californica* baculovirus invasion and infection. Virology, 108, 297.
- HAMM J.J. (1966) A modified azan staining technique for inclusion body viruses. J. Invert. Pathol., 8, 125-226.

- IWASAKI T. (1954) The relation of histochemical changes to the virus multiplication in polyhedrosis-infected silkworm (*Bombyx mori* L.). I. The catalase activity of the body fluid and appearance of the polyhedral body. *Medicine and Biol.*, 19, 3538.
- IWASHITA Y., ARUGA H. (1957) Mechanism of resistance to virus diseases in the silkworm, *Bombyx mori*. III. Histological studies on the polyhedrosis in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 26, 323.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANAN S.K. (1973) *Sericultural Manual*. 2: Silkworm Rearing. FAO Agricultural Services Bulletin, Rome, 15, 1-128.
- MAZZONE H.M. (1985) Pathology associated with baculovirus infection. In *Viral Insecticide For Biological Control*. Karl Maramorosch and K.E. Sherman eds., p. 81. Academic Press, London.
- NYSTEN P.H. (1808) *Recherches sur les maladies des vers à soie*. Impr. impériale, Paris.
- PALMIERI J.R., KELDERMAN W., SULLIVAN J.T. (1978) A staining technique for smears containing inclusion body viruses. *J. Invert. Pathol.*, 31, 264.
- PALMIERI J.R., SULLIVAN J.T. (1977) A technique for location of microsporidia in host tissues. *J. Invert. Pathol.*, 30, 276.
- SHIGEMATSU H., NOGUCHI A. (1969a) Biochemical studies on multiplication of a nuclear-polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. II Protein synthesis in larval tissues after infection. *J. Invert. Pathol.*, 14, 300-307.
- SHIGEMATSU H., NOGUCHI A. (1969b) Biochemical studies on the multiplication of a nuclear-polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. III Functional changes in infected cells with reference to the synthesis of nucleic acid and proteins. *J. Invert. Pathol.*, 14, 308-315.
- SHIGEMATSU H., TAKESHITA H. (1958) Changes in quantity of nucleic acid and protein in the fat body of the silkworm in a course of contracting jaundice. *J. Sericult. Sci. Japan*, 27(2), 66.
- SMITH-JOHANSEN H., WITKIEWICZ H., IATROV K. (1986) Infection of silkworm follicular cells with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.*, 48, 74-84.
- SMITH K.M. (1967) *Insect Virology*. Academic Press, New York.
- SMITH K.M., XEROS N. (1953) Development of virus in the cell nucleus. *Nature*, 172, 660-671.
- SUGGIMORI H., NAGAMINE T., KOBAYASHI M. (1990) Analysis of structural polypeptides of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Entomol. Zool.*, 25, 67-77.
- TINSLEY T.W., HARRAP K.A. (1977) Viruses of invertebrates. In *Comparative Virology*. P. Frankel-Contrat and R.R. Wagner eds., 12, p. 1-101. Plenum Press, New York/London.
- XEROS N. (1956) The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis. *Nature*, 178, 412-413.

MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES PROGRESSIVES DES TISSUS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. INFESTES PAR LE VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE

C.A.M. FLORA, M.V. SAMSON*, B. NATARAJU, M. BALAVENKATASUBBAIAH & R.K. DATTA

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

*On a réalisé une étude histopathologique de divers tissus larvaires du ver à soie *Bombyx mori* L. infesté par le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV). Il y a une relation constante entre les modifications histopathologiques et la progression des symptômes externes. Le BmNPV infeste le noyau du corps adipeux, des hémocytes, de l'hypoderme, de la matrice trachéenne, des glandes séricigènes, des gonades, des muscles et des cellules nerveuses. On observe des polyèdres de petite et de grande taille dans les différents tissus, mais tous les polyèdres sont de même taille à l'intérieur d'un noyau. Les études histochimiques font apparaître une augmentation importante de la synthèse des protéines nucléaires dans le corps adipeux, les hémocytes, l'hypoderme, la matrice trachéenne et les glandes séricigènes à la suite de l'infestation.*

INTRODUCTION

La polyédrose nucléaire du ver à soie *Bombyx mori* L., causée par le virus de la polyédrose nucléaire de *B. mori* (BmNPV), est l'une des maladies virales les plus anciennement connues (Nysten, 1808). On sait que le BmNPV peut infester un grand nombre de tissus larvaires. Des études récentes ont permis de démontrer qu'il infeste l'épithélium folliculaire des papillons (Smith-Johanssen et coll., 1986) et la gaine épithéliale des testicules (Attathom et Sinchaisri, 1987) ainsi que les tissus déjà connus comme sites d'infestation : les cellules du corps adipeux, la trachée, l'hypoderme, le sang et les glandes séricigènes (Aruga, 1957 ; Tinsley et Harrap, 1977).

Les modifications comportementales associées à l'infestation baculovirale ont été discutées par Entwistle et Evans (1985). Granados et Lawler (1980) ont fourni un compte rendu détaillé des premiers stades de la dissolution des polyèdres et du passage du NPV d'*Antographa californica* dans les larves de *Trichoplusia ni*. Mazzone (1985) a fait la synthèse des divers événements survenant dans l'intestin, l'hémocoel et l'hémolymph après ingestion du virus. Des observations histochimiques des cellules infestées par le BmNPV ont été réalisées par Bergold et Friedrich-Freska (1947), Iwasaki (1954), Iwashita et Aruga (1957) et Shigematsu et Noguchi (1969a, 1969b).

Malgré une documentation importante sur les modifications pathologiques associées à l'infestation par le BmNPV, on dispose de très peu d'informations sur la progression journalière des modifications histopathologiques. Cette étude a donc été réalisée afin de déterminer le moment exact entre l'infestation et la manifestation des modifications histopathologiques dans divers tissus et de corréler la symptomatologie générale avec la mortalité.

MATERIELS ET METHODES

1. Induction de l'infestation :

Une race pure polyvoltine couramment utilisée, Kalimpong A (KA), a été sélectionnée pour cette étude. Les larves ont été levées et éduquées suivant les conditions d'élevage standard (Krishnaswami

* Director, Silkworm Seed Technology, Laboratory, Kodathi, Carmelaram P.O., Bangalore - 560 035, Inde.

et coll., 1973). Après la deuxième mue, les larves ont été réparties en groupes de 200 en fonction des traitements. Les polyèdres nucléaires ont été prélevés avec l'eau distillée stérile dans l'hémolymphe de vers à soie infestés par la polyédrose nucléaire (Sugimori et coll., 1990). On a utilisé une suspension de polyèdres diluée dans de l'eau distillée et contenant 1×10^6 polyèdres/ml pour induire l'infestation. Les larves ont été infestées par voie orale avec des disques de feuilles de mûrier de 50 cm² imbibés de 0,25 ml d'inoculum. Un lot témoin, sur lequel aucune infestation n'a été induite, a également été maintenu pour les études comparatives.

2. Echantillonnage des tissus :

Des échantillons de divers tissus (hémolymphe, trachée, intestin moyen, corps adipeux, tube malpighien et glande séricigène) ont été écrasés quotidiennement pendant sept jours et colorés avec de l'azocarmine G (Palmieri et coll., 1978) afin d'identifier les polyèdres.

3. Techniques histopathologiques :

Les tissus larvaires ont été fixés quotidiennement jusqu'au septième jour d'infestation dans le fixateur alcoolisé de Bouin et de la glutaraldéhyde à 2,5 % pour colorer respectivement les polyèdres et les protéines totales. Les tissus fixés ont été traités et inclus dans de la paraffine solide. Des coupes sérielles de 4 à 7 µm d'épaisseur ont été colorées suivant les méthodes de Hamm (1966) et de Palmieri et Sullivan (1977) pour l'identification des polyèdres. La coloration histochemique des protéines totales dans les tissus a été effectuée selon le protocole de Cawood et coll. (1978).

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude histopathologique fait apparaître une relation entre les modifications histopathologiques et la progression des symptômes externes. On n'observe aucune cellule infestée dans les tissus des coupes de larves témoins (non traitées) et les noyaux sont plus petits (Fig. 1). Dans les coupes de larves traitées, l'infestation se limite aux noyaux des tissus infestés, qui se distinguent des noyaux sains à leur propriété de coloration 24 heures après l'inoculation. Les noyaux du corps adipeux, des hémocytes et de l'hypoderme sont hypertrophiés et de couleur rouge, la coloration est plus foncée dans le corps adipeux (Fig. 2a et 2b). A ce stade, on ne relève aucun symptôme si ce n'est une légère léthargie des larves.

Après 48 h, les noyaux de la matrice trachéenne, des hémocytes et de l'hypoderme se colorent en rouge, ce qui dénote leur nature hypertrophiée (Fig. 2c et 2e). Les noyaux du corps adipeux contiennent le stroma virogène typique (Fig. 2d) décrit par Xeros (1956) ; ce stroma est probablement de la chromatine condensée qui serait différente des protéines de l'hôte (Mazzone, 1985). Après 72 h, la granularité des noyaux du corps adipeux et de la glande séricigène s'accroît et des granules minuscules, de couleur rouge, apparaissent (Fig. 3a). Il se peut que ces granules soient des propolyèdres ou des polyèdres en cours de développement (Smith et Xeros, 1953). Les noyaux du corps adipeux, des hémocytes et de l'hypoderme sont pratiquement remplis de polyèdres après 96 h. Les tissus infestés prennent une forte coloration bleue (Fig. 3b). Les noyaux de la glande séricigène sont hypertrophiés mais les polyèdres en cours de développement ne sont pas distincts (Fig. 3c). C'est seulement à ce stade que commence l'hypertrophie intersegmentale des larves infestées, leur donnant un aspect jaunâtre.

Après 120 h, les larves deviennent brillantes et ressemblent à une tige de bambou. Des quantités considérables de corps d'inclusion sont produites à mesure que les tissus s'infestent, ce qui produit une véritable poche de virus (Evans et coll., 1981). L'hypoderme est extrêmement fragile et la paroi du corps fréquemment sectionnée, libérant un fluide laiteux. L'examen de ce fluide révèle qu'il contient de nombreux polyèdres. La plupart des larves se déplacent sans but sur le bord des claies ; on ne connaît pas le mécanisme lié à ces modifications comportementales. Cependant, au début de l'infestation de l'intestin (comme dans le cas de la polyédrose nucléaire de la tenthrède), il se peut que les hémocytes et les ganglions nerveux miment le stress du manque de nourriture de sorte que les larves continuent à chercher leur nourriture même lorsque leur intestin est plein (Evans et Allaway, 1983), elles tombent ensuite sur le sol et meurent.

A ce stade (120 h après l'infestation), presque toutes les coupes tissulaires (corps adipeux, hypoderme, épithélium trachéen, glandes séricigènes, muscles, gonades et ganglion thoracique) sont infestées, sauf les tubes malpighiens et l'intestin moyen (Fig. 4a à 4h). En raison de la forte infestation, les noyaux de la plupart des tissus sont hypertrophiés et atteignent une taille énorme, faisant éclater la membrane nucléaire et détruisant le cytoplasme, ce qui permet aux polyèdres de s'échapper dans la cavité du corps où ils sont présents en grands nombres (Fig. 4i). Bien que l'infestation primaire se produise dans l'intestin, on n'observe aucune occlusion de particules virales dans les cellules de l'intestin (Mazzone, 1985). Les résultats présentés ici sont conformes à ceux obtenus par Tinsley et Harrap (1977), Smith-Johanssen et coll. (1986), Attathom et Sinchaisri (1987) et aux symptômes histopathologiques de la polyédrose nucléaire des larves de lépidoptères.

On observe des polyèdres de deux tailles différentes dans les tissus infestés. Cependant, les polyèdres sont toujours de taille identique dans un même noyau. Cette observation tend à confirmer celle de Smith (1967). Les polyèdres de petite taille sont présents dans le tissu nerveux et le tissu musculaire : les polyèdres plus grands sont localisés dans la matrice trachéenne, l'hypoderme, les hémocytes et le tissu adipeux, comme l'a montré Benz (1963). Les échantillons traités et les coupes histopathologiques révèle que l'ordre d'incidence des polyèdres est le suivant : 1) corps adipeux, 2) hémocytes, 3) hypoderme, 4) matrice trachéenne, 5) glandes séricigènes, 6) gonades, 7) muscles, 8) cellules nerveuses. Cet ordre d'incidence s'applique également aux modifications histopathologiques décrites ci-dessous.

Shigematsu et Takeshita (1958) ont observé une augmentation de la concentration en protéines du corps adipeux dans les derniers stades de l'infestation de *B. mori* par le NPV. Tandis que Shigematsu et Noguchi (1969a, 1969b) ont mis en évidence une augmentation rapide de la synthèse des protéines dans le corps adipeux et dans les glandes séricigènes et ont attribué cela à l'augmentation de la synthèse de protéines virales et polyédriques, Bergold et Friedlch-Freska (1947) ont démontré que le contenu en protéines des vers à soie atteints par la polyédrose augmente d'environ 5 %. L'étude présentée ici confirme ces résultats (Tableau 1). La coloration positive a tout d'abord été observée dans les parties du corps adipeux situées à côté de l'intestin, puis dans celles situées au-dessous de l'hypoderme et enfin dans les hémocytes et dans l'hypoderme. Même après la formation des polyèdres, ces tissus présentent une réaction positive tandis que, chez les larves témoin, tous les tissus présentent une réaction négative.

On s'intéresse de plus en plus au mécanisme de multiplication du virus et à la réponse de l'hôte au virus. L'échantillonnage des larves avant la fin de la période d'incubation du virus, c'est-à-dire au moment où la lyse des cellules infestées est minimale (de 72 à 84 h), permettrait d'établir un diagnostic efficace et de prendre des mesures de prévention et lutte contre la maladie au stade initial. Les informations données ici sont indispensables pour bien comprendre la pathologie complexe et fascinante associée à l'infestation par le NPV. Ce type de renseignements est précieux pour la mise en place d'un diagnostic précoce et de mesures prophylactiques permettant d'éliminer la maladie par une approche intégrée appropriée aux conditions environnementales.

GENETIC LINKAGE ANALYSIS OF *nsd-Z*, THE NONSUSCEPTIBILITY GENE OF *BOMBYX MORI* TO THE ZHENJIANG (CHINA) STRAIN DENSONUCLEOSIS VIRUS

QIN J. & YI W.-Z.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, Jiangsu, China.

Linkage analysis of the gene nonsusceptible to the densonucleosis virus (nsd-Z) was carried out. Mating tests revealed that nsd-Z was linked to the white-sided egg (Se), which maps at 16.9 cM on the fifteenth linkage group.

Keywords: *Bombyx mori*, DNV resistant inheritance, genetic linkage analysis.

INTRODUCTION

Densonucleosis virus (DNV) belongs to the Parvoviridae Densovirus. The cryptogram is: D/1:2.7/20:S/S:I/O. The resistance to DNV varies markedly with variety. Watanabe and Maeda (1978) found that the nonsusceptibility of the silkworm to the Ina strain of DNV is controlled by a pair of autosomal recessive genes, and similarly, Huang (1986) found that the nonsusceptibility of the silkworm to the strain of Zhenjiang (China) is also controlled by a pair of non sex-linked recessive genes. Subsequently, it was found in Japan that the nonsusceptibility of the silkworm to the Yamanashi and Ina strains are controlled by different genes and, in 1986, a dominant gene for the nonsusceptibility of the silkworm to the Ina strain was found by Eguchi *et al.* Furthermore, Eguchi *et al.* (1987) revealed that the Ina nonsusceptibility gene (*nsd-1*) is linked to the *rb* and *Lan* genes in the twenty-first linkage group. Since 1985, the author has carried out linkage analysis of nonsusceptibility of the silkworm to the *Se* gene in the fifteenth linkage group.

MATERIALS AND METHODS

Marker genes used in these experiments:

p^M (2), *lem*(3), *L*(4), *oc*(5), E^{kp} (6), *q*(7), *st*(8), *la*(9), *w-2*(10), *K*(11), *ms*(12), *ch*(13), *U*(14), *Se*(15), *cts*(16), *mln*(18), *nh*(19), *rb*(21), *or*(22), *sp*(23), *Ym*(?).

During the early-autumn and late-autumn rearing seasons of 1985, the genotype of nonsusceptibility to densonucleosis virus of the lines with the marker genes described above was investigated by administering the larvae with dilution of a standard suspension of virus (designated 10^{-1} , see below for virus preparation). For convenience, the susceptible gene is temporarily designated as *R* and the nonsusceptible gene as *r* in the following description. The genotype of most lines was *RR* or *rr*; the genotype of a few lines was more complex, segregating *RR* or *rr*, in which *rr* individuals survived for further rearing for linkage analysis.

Virus:

Dried midgut infected with DNV was supplied by the Pathological Research Department of our Institute. Sixty mg of dried midgut tissue, which was stored in the refrigerator, was ground in 0.5 ml 0.2 M Na_2CO_3 solution by using quartz sand. The suspension was diluted to 6 ml by adding aseptic water and centrifuged at 2000 rpm for 20 minutes. Five ml supernatant was collected, and 15 ml 0.2 M

acetic acid solution and 15 ml 0.2 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer solution (pH 10.83) were added and the pH was adjusted to 7. The 10^{-1} dilution of virus suspension was obtained by adjusting the volume to 50 ml with aseptic water.

Method of virus administration:

A 10^{-1} dilution of virus suspension was used for administration to the silkworm in 1985 and 1986 while a 10^{-2} dilution was applied in 1987. Silkworm eggs for testing were incubated according to the standard method for bivoltine races. Newly hatched larvae were collected at 9 a.m. and fed with mulberry leaves which had already been smeared with virus suspension using a calligraphy brush, air dried and cut into small pieces. Plastic coated paper (with no holes) was used to pad, cover and wrap the rearing bed to retain humidity. Virus-smeared mulberry leaves were fed to the silkworms again at 7 p.m. on the same day. From the second day, the silkworms were fed with fresh virus-free mulberry leaves twice daily. By this method, most of the susceptible individuals died before the third instar and few were able to survive up to the fourth instar. For linkage analysis, segregation of viral susceptibility in RF_1 (progeny of backcross) and F_2 progeny was investigated only with the nonsusceptible individuals.

RESULTS AND DISCUSSION

The crossing scheme for linkage analysis of the nonsusceptible gene of the silkworm to the Zhenjiang (China) strain of DNV and the segregation of characters in the RF_1 and F_2 are shown in Table I in detail. The segregation of characters was based on surviving nonsusceptible individuals after virus administration, that is, the genotype of all the surviving individuals was *rr*, 2-6 batches were raised separately for each cross.

As shown in Table I, the genotypes of the six dominant marker stocks — p^M , *L*, E^{kp} , *Ia*, *K* and *U* — were all *RR*. The segregation ratios of these markers in the surviving individuals of the F_1 progeny were all approximately 1:1. For the *L* marker, for example, when F_1 females resulting from the cross of *RRLL* individuals and *rr++* individuals were backcrossed with *rr++* males, the genotype of the RF_1 should be 1 *L+Rr* : 1 *++rr* and the genotype of the survivors after virus administration should be only *++rr* if *r* is linked to *L* because only *rr* individuals can survive when the newly hatched silkworm is treated with the virus. If *r* and *L* genes segregate independently, however, the genotype of the RF_1 progeny should be 1 *L+Rr* : 1 *L+rr* : 1 *++Rr* : 1 *++rr* and the genotype of surviving individuals should be 1 *L+rr* : 1 *++rr*. In our experiments, the segregation ratios of markers among surviving individuals in the RF_1 progeny of the six dominant genes were all 1:1, indicating that the *r* gene does not reside on these six chromosomes — $p^M(2)$, *L(4)*, $E^{kp}(6)$, *Ia(9)*, *K(11)* and *U(14)*.

The line with the dominant gene, *Ym*, was *rr*. After crossing with *RR++*, the F_1 females were backcrossed with *rr++* males. When the RF_1 progeny were treated with the virus, the segregation ratio of *Ym* and + of the survivors was 1:1, which also showed that the *r* gene is independent from the *Ym*(?) gene, whose linkage group has not yet been established.

The lines of the 11 recessive marker genes — *lem*, *oc*, *q*, *st*, *w-2*, *ms*, *ch*, *nb*, *rb*, *or* and *sp* — were all *RR*, and the segregation ratio of markers of surviving individuals in the F_2 was all about 3:1. For the *lem* gene, for example, after *Rrlemlem* individuals were crossed with the *rr++* individuals, the F_2 phenotypes should be 2 *+R-* : 1 *+-rr* : 1 *lemlemRr* and that of the surviving individuals should be only *+-rr* if *r* is linked to *lem*; on the other hand, the F_2 phenotype should be 9 *++R-* : 3 *+-rr* : 3 *lemlemR-* : 1 *lemlemrr* and that of the survivors should be 3 *+-rr* : 1 *lemlemrr* if *r* is independent from *lem*. In our experiments, the segregation ratio of markers of the surviving individuals in the F_2 of all 11 recessive genes was about 3:1, which is consistent with the conclusion that the *r* gene is inherited independently from all 11 chromosomes marked by these recessive genes — *lem(3)*, *oc(5)*, *q(7)*, *st(8)*, *w-2(10)*, *ms(12)*, *ch(13)*, *nb(19)*, *rb(21)*, *or(21)* and *sp(23)*.

The lines of two recessive genes, *cts* and *mln*, were *rr* genotypically, and the segregation ratio of markers of surviving individuals in the RF_1 was about 1:1 in these crosses. In *mln*, for example, when F_1 females resulting from the cross between *mlnmlnrr* individuals and *+++RR* individuals were backcrossed with *mlnmlnrr* males, the RF_1 genotype should be 1 *mlnRr* : 1 *mlnmlnrr* and that of surviving individuals should be only *mlnmln* if *r* is linked to *mln*. If *r* is independent from *mln*,

however, the genotype of the RF₁ progeny should be $1+mlnRr:1mlnmlnRr:1+mlnrr:1mlnmlnrr$. In our experiment, the segregation ratio of the markers in the RF₁ of the two genes was 1:1, which showed that the *r* gene was inherited independently from the *cts*(16)- and *mln*(18)-bearing chromosomes.

Table I. Crossing scheme and segregation of characters in RF₁ and F₂.

Tableau I. Plan des croisements et ségrégation des caractères chez RF₁ et F₂.

Markers	Crossing scheme	Segregation of characters of surviving progeny	Segregation relative to marker	χ^2
Marqueurs	Plan des croisements	Ségrégation des caractères chez les descendants survivants	Ségrégation par rapport au marqueur	χ^2
<i>p</i> ^M (2)	(RRp ^M × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>p</i> ^M :98, +:109	ind.	0.584
<i>lem</i> (3)	(RRlemlem × rr++) F ₁ *	+164, <i>lem</i> :51	ind.	0.192
<i>L</i> (4)	(RRLL × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>L</i> :211, +:220	ind.	0.188
<i>oc</i> (5)	(RRococ × rr++) F ₁ *	+150, <i>oc</i> :65	ind.	3.140
<i>E</i> ^{Kp} (6)	(RRE ^{Kp} E ^{Kp} × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>E</i> ^{Kp} :96, +:116	ind.	1.887
<i>q</i> (7)	(RRqq × rr++) F ₁ (F) *	+381, <i>q</i> :140	ind.	0.973
<i>st</i> (8)	(RRstst × rr++) F ₁ *	+116, <i>st</i> :29	ind.	1.934
<i>la</i> (9)	(RRlala × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>la</i> :315, +:344	ind.	1.335
<i>w-2</i> (10)	(RRw-2w-2 × rr++) F ₁ *	+168, <i>w-2</i> :65	ind.	1.043
<i>K</i> (11)	(RRKK × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>K</i> :213, +:218	ind.	0.058
<i>ms</i> (12)	(RRmsms × rr++) F ₁ *	+114, <i>ms</i> :31	ind.	0.974
<i>ch</i> (13)	(RRchch × rr++) F ₁ *	+86, <i>ch</i> :30	ind.	0.047
<i>U</i> (14)	(RRUU × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>U</i> :364, +:392	ind.	1.037
<i>cts</i> (16)	(rrctsetcts × RR++) F ₁ (F) × rrctsetcts (M)	+222, <i>cts</i> :209	ind.	0.196
<i>mln</i> (18)	(rrmlnmln × RR++) F ₁ (F) × rrmlnmln (M)	+188, <i>mln</i> :173	ind.	0.312
<i>nb</i> (19)	(RRnbnb × rr++) F ₁ *	+115, <i>nb</i> :40	ind.	0.053
<i>rb</i> (21)	(RRrbrrb × rr++) F ₁ *	+162, <i>rb</i> :61	ind.	0.660
<i>or</i> (22)	(RRoror × rr++) F ₁ *	+110, <i>or</i> :35	ind.	0.057
<i>sp</i> (23)	(RRspsp × rr++) F ₁ *	+93, <i>sp</i> :24	ind.	1.224
<i>Ym</i> (?)	(rrYmYm × RR++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>Ym</i> :143, +:160	ind.	0.954
<i>Se</i> (15)	(RRSeSe × rr++) F ₁ (F) × rr++ (M)	<i>Se</i> :0, +:94	1	
	(RRSeSe × rr++) F ₁ (F) *	<i>SeSe</i> :0, <i>Se</i> +:17, ++:58	1	

(F): female / femelle.

(M): male / mâle.

* self-crossed / auto-croisé.

ind.: independent / indépendant.

l: linked / lié.

The marker gene *Se* (white side egg) in the fifteenth linkage group is a pseudomaternally inherited gene. The heterozygous form is differently marked from the homozygous form. The homozygous egg

shows many wrinkles and swelling of the egg surface, along with a grey egg shell, while the heterozygous egg shows a normal, smooth shape and a grey colour in the middle or abdominal side of the posterior of the egg, around the edges of the egg shell. The line carrying the *Se* gene was *RR* in form. When F_1 females resulting from the cross of *RR Se Se* individuals and *rr++* individuals were backcrossed with *rr++* males and two batches were taken from the RF_1 for rearing, the segregation ratio of the markers of the surviving individuals after virus administration was 0:1. If *r* is independent from *Se*, the genotypes of the RF_1 progeny should be 1 *Se+Rr*: 1 *++rr* and that of the survivors should be of only one genotype, *++rr*. In our experiment, two batches from RF_1 were taken for rearing, and 94 females obtained after virus administration. All of the female moths laid normal eggs, which showed that the *r* gene is linked to the *Se* gene. Similarly, among 75 surviving females from 2 batches of an F_2 cross following virus treatment, 58 laid normal eggs and 17 laid heterozygous *Se* eggs, consistent with the linkage of *R* to *Se* on the fifteenth linkage group. In this experiment, there were 17 *Se+rr* recombinants accounting for 22.5% of the total. Additional experiments are needed to establish its precise map position.

In Japan, the *Ina* strain is defined as densovirus I form and the Yamanashi strain as densovirus II form, by which the nonsusceptibility gene of the silkworm to DNV is named. By its characteristics, for example, the nucleic acid and antigenic reaction, the Zhenjiang (China) strain of DNV is similar to the Yamanashi strain. Lacking further genetic tests for nonsusceptibility genes, we name the gene that governs resistance to the Zhenjiang (China) strain of DNV the nonsusceptible gene (*nsd-Z*).

REFERENCES

- DAI R.M. (1982) Studies on the chemical properties of flacherie virus of the silkworm. *Sci. Seric. China*, 8, 199-202.
- EGUCHI R., FURUTA Y., NINAKI O. (1986) Dominant nonsusceptibility to densovirus in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 55, 177-178.
- EGUCHI R. (1987) Linkage analysis of silkworm DNV-I nonsensitive gene (*nsd-1*). *Abst. of 57th Congr. Soc. Seric. Japan*, 72.
- FURUTA Y. (1978) On the heredity of the resistance to small flacherie virus in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 47, 241-242.
- HU W.F., QIAN Y.J. (1981) Studies on the resistance to infectious flacherie virus and its mechanism of Dong 34 $\times$ Su 12 of the silkworm. *Sci. Seric. China*, 7, 51-67.
- HUANG L.Q. (1986) Studies on the method of breeding silkworm strain that can resist the disease of Densovirus. *Sci. Seric. China*, 12, 29-35.
- IWISHITA Y., CAO Y.S. (1983) The development of a densovirus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori*, of China. *Sci. Seric. China*, 9, 219-222.
- WATANABE H., MAEDA S. (1978) Genetic resistance to peroral infection with a densovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 47, 209-214.
- ZHANG Y.N., LIU S.X., HUO Y., OU S.R. (1982) Identification of the resistance of certain silkworm races to six types of silkworm diseases. *Sci. Seric. China*, 8, 94-97.

ANALYSE DE LIAISON GENETIQUE DE *nsd-Z*, GENE DE NON SENSIBILITE DE *BOMBYX MORI* A LA SOUCHE ZHENJIANG (CHINE) DU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE

QIN J. & YI W.-Z.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, Jiangsu, Chine.

On a réalisé l'analyse de liaison du gène de non sensibilité (nsd-Z) au virus de la densonucléose. Les tests d'appariement révèlent que nsd-Z est lié au gène de l'oeuf à côtés blancs (Se), lequel se situe à 16,9 cM sur le quinzième groupe de liaison.

INTRODUCTION

Le virus de la densonucléose (DNV) appartient aux Densovirus parvoviridés. La nomenclature est D/1:2.7:20:S/S:I/O. La résistance au DNV varie fortement suivant les variétés. Watanabe et Maeda (1978) ont observé que la non sensibilité du ver à soie à la souche Ina du DNV est gouvernée par une paire de gènes récessifs autosomique ; en outre, Huang (1986) a observé que le gène de non sensibilité du ver à soie à la souche de Zhenjiang (Chine) est également gouverné par une paire de gènes récessifs non liés au sexe. Par la suite, il a été découvert au Japon que la non sensibilité du ver à soie aux souches Yamanashi et Ina est gouvernée par des gènes différents et, en 1986, un gène dominant pour la non sensibilité du ver à soie à la souche Ina a été mis en évidence par Eguchi et coll. De plus, Eguchi et coll. (1987) ont démontré que le gène de non sensibilité à Ina (*nsd-1*) est lié aux gènes *rb* et *Lan* sur le 21^e groupe de liaison. Depuis 1985, l'auteur a réalisé l'analyse de liaison du gène de non sensibilité du ver à soie au gène *Se* sur le quinzième groupe de liaison.

MATERIELS ET METHODES

Gènes marqueurs utilisés dans ces expériences :

p^M(2), *lem*(3), *L*(4), *oc*(5), *E^{sp}*(6), *q*(7), *st*(8), *la*(9), *w-2*(10), *K*(11), *ms*(12), *ch*(13), *U*(14), *Se*(15), *cts*(16), *mln*(18), *nb*(19), *rb*(21), *or*(22), *sp*(23), *Ym*(?).

Au cours des élevages de début d'automne et de fin d'automne de 1985, le génotype de la non sensibilité au virus de la densonucléose des lignées portant les gènes marqueurs énumérés ci-dessus a été étudié en traitant les larves avec une dilution d'une suspension standard de virus (dénommée « 10⁻¹ », voir ci-dessous pour la préparation virale). Par commodité, dans la présente communication, le gène de sensibilité est provisoirement appelé *R* et le gène de non sensibilité *r*. Le génotype de la plupart des lignées est *RR* ou *rr* ; le génotype de certaines lignées est plus complexe, séparant *RR* ou *rr* dans lesquels les individus *rr* survivent à la génération suivante pour l'analyse de liaison.

Virus :

Des intestins moyens séchés infestés avec du DNV ont été fournis par le Département de recherches pathologiques de notre Institut. Soixante mg de tissu d'intestin moyen séché, stockés au réfrigérateur, ont été broyés dans 0,5 ml d'une solution de 0,2 M Na₂CO₃ avec du sable quartzueux. La suspension a été diluée à 6 ml par addition d'eau stérilisée et centrifugée à 2 000 tours/minute pendant 20 minutes. Cinq ml de surnageant ont été prélevés puis 15 ml d'une solution d'acide acétique

à 0,2 M et 15 ml d'une solution tampon à 0,2 M $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (pH 10,83) ont été ajoutés et le pH a été ajusté à 7. La dilution de 10^{-1} de suspension virale a été obtenue en ajustant le volume à 50 ml avec de l'eau stérile.

Méthode d'administration du virus :

Une suspension virale diluée à 10^{-1} a été administrée aux vers à soie en 1985 et 1986 et une dilution de 10^{-2} a été appliquée en 1987. Les oeufs de vers à soie destinés au test ont été incubés selon la méthode standard pour les oeufs bivoltins. Les larves néonates ont été prélevées à 9h00 et nourries avec des feuilles de mûrier badigeonnées de suspension virale à l'aide d'un pinceau calligraphique, séchées à l'air et coupées en petits morceaux. Du papier plastifié (non perforé) a été utilisé pour tapisser, recouvrir et envelopper la litière afin de préserver l'humidité. Des feuilles de mûrier enduites de virus ont été à nouveau fournies aux vers à soie à 19h00 le même jour. À partir du deuxième jour, les larves ont été nourries avec des feuilles exemptes de virus deux fois par jour. Sous l'effet de ce traitement, la plupart des individus sensibles sont morts avant le troisième âge et quelques uns ont pu survivre jusqu'au quatrième âge. Pour l'analyse de liaison, la ségrégation de la sensibilité virale des RF_1 (descendants du rétrocroisement) et des descendants F_2 a été étudiée uniquement chez les individus non sensibles.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le plan de croisement pour l'analyse de liaison du gène de non sensibilité du ver à soie à la souche Zhenjiang (Chine) du DNV et la ségrégation des caractères aux générations RF_1 et F_2 sont présentés en détail dans le tableau I. La ségrégation des caractères est basée sur la survie des individus non sensibles après administration du virus et montre que le génotype de tous les individus survivants est rr ; 2 à 6 lots ont été élevés séparément pour chaque croisement.

Comme le montre le tableau I, les génotypes des six souches de marqueurs dominants (p^M , L , E^{kp} , la , K et U) sont tous RR . Le taux de ségrégation de ces marqueurs chez les individus survivants des descendants F_1 est d'environ 1:1. Pour le marqueur L , par exemple, lorsque les femelles F_1 issues du croisement d'individus $RRLL$ avec des individus $rr++$ sont rétrocroisées avec des mâles $rr++$, le génotype de RF_1 sera 1 $L+Rr$: 1 $++rr$ et le génotype des survivants après administration du virus sera seulement $++rr$ si r est lié à L car seuls les individus rr peuvent survivre lorsque le virus est inoculé chez les larves néonates. Cependant, si les gènes r et L se répartissent indépendamment, le génotype des descendants RF_1 sera 1 $L+Rr$: 1 $++Rr$: 1 $++rr$ et le génotype des individus survivants sera 1 $L+rr$: 1 $++rr$. Dans notre expérience, le taux de ségrégation des marqueurs chez les individus survivants à la génération RF_1 des six gènes dominants est toujours de 1:1 ; ce qui indique que le gène r ne se situe sur aucun des six chromosomes $p^M(2)$, $L(4)$, $E^{kp}(6)$, $la(9)$, $k(11)$ et $U(14)$.

La lignée portant le gène dominant Ym est rr . Après croisement avec $RR++$, les femelles F_1 ont été rétrocroisées avec des mâles $rr++$. Lorsque le virus est inoculé chez les descendants RF_1 , le taux de ségrégation de Ym et de + des survivants est de 1:1 ; ce qui montre également que le gène r est indépendant du gène $Ym(?)$, dont le groupe de liaison n'a pas encore été déterminé.

Les lignées des 11 gènes marqueurs récessifs (*lem*, *oc*, *q*, *st*, *w-2*, *ms*, *ch*, *nb*, *rb*, *or* et *sp*) sont toutes RR et le taux de ségrégation des marqueurs des individus survivants à la génération F_2 est d'environ 3:1. Pour le gène *lem*, par exemple, après croisement des individus $Rrlemlem$ avec les individus $rr++$, le phénotype des F_2 sera 2 $+-R-$: 1 $+-rr$: 1 $lemlemRr$ et celui des individus survivants sera seulement $+-rr$ si r est lié à *lem* ; par ailleurs, le phénotype des F_2 sera 9 $++R-$: 3 $+-rr$: 3 $lemlemR-$: 1 $lemlemrr$ et celui des survivants sera 3 $+-rr$: 1 $lemlemrr$ si r est indépendant de *lem*. Dans notre expérience, le taux de ségrégation des individus survivants à la génération F_2 est d'environ 3:1 pour les 11 gènes récessifs ; ce qui corrobore la conclusion que le gène r est hérité indépendamment pour les 11 chromosomes marqués par les gènes récessifs *lem(3)*, *oc(5)*, *q(7)*, *st(8)*, *w-2(10)*, *ms(12)*, *ch(13)*, *nb(19)*, *rb(21)*, *or(21)* et *sp(23)*.

Les lignées des deux gènes récessifs *cts* et *mln* sont rr génotypiquement et le taux de ségrégation des marqueurs des individus survivants chez les RF_1 est d'environ 1:1 chez ces croisements. Chez *mln*, par exemple, lorsque les femelles F_1 issues du croisement entre des individus $mlnmlnrr$ et des individus $++RR$ sont rétrocroisées avec des mâles *mlnmlnrr*, le génotype de RF_1 sera

$1 + mlnRr : 1 mlnmlnrr$ et celui des individus survivants sera seulement $mlnmln$ si r est lié à mln . Cependant, si r est indépendant de mln , le génotype des descendants RF_1 sera $1 + mlnRr : 1 mlnmlnRr : 1 + mlnrr : 1 mlnmlnrr$. Dans notre expérience, le taux de ségrégation des marqueurs à la génération RF_1 des deux gènes est de 1:1 ; ce qui montre que le gène r est hérité indépendamment des chromosomes portant $cts(16)$ et $mln(18)$.

Le gène marqueur *Se* (oeuf à côtés blancs) du quinzième groupe de liaison est un gène hérité de manière pseudo-maternelle. La forme hétérozygote est marquée différemment de la forme homozygote. L'oeuf homozygote présente de nombreuses rides, une surface bombée et un chorion gris, tandis que l'oeuf hétérozygote est de forme normale, lisse et est de couleur grise dans la région moyenne ou abdominale de l'extrémité postérieure et sur les bords du chorion. La lignée portant le gène *Se* est de type *RR*. Lorsque des femelles F_1 issues d'un croisement entre des individus *RR Se Se* et des individus *rr+* sont rétrocroisées avec des mâles *rr++* avec deux lots prélevés chez les RF_1 pour l'élevage, le taux de ségrégation des marqueurs des individus survivant après administration du virus est de 0:1. Si r est indépendant de *Se*, les génotypes des descendants RF_1 sera $1 Se+Rr : 1++$ et celui des survivants ne comportera qu'un seul génotype : $++rr$. Dans notre expérience, deux lots de RF_1 ont été prélevés pour élevage et 94 femelles ont été obtenues après administration du virus. Tous les papillons femelles ont pondu des oeufs normaux ; ce qui montre que le gène r est lié au gène *Se*. De même, sur 75 femelles survivantes issues de deux lots d'un croisement F_2 après administration du virus, 58 ont pondu des oeufs normaux et 17 ont pondu des oeufs *Se* ; ce qui corrobore la liaison de *R* à *Se* sur le quinzième groupe de liaison. Des expériences sont nécessaires afin d'établir sa position précise sur la carte.

Au Japon, la souche Ina est définie sous l'appellation de forme I du virus de la denso-nucléose et la souche Yamanashi forme II du virus de la denso-nucléose, d'où est tiré le nom du gène de non sensibilité du ver à soie au DNV. Par exemple, l'acide nucléique et la réaction antigénique de la souche de Zhenjiang (Chine) ont des caractéristiques similaires à celles de la souche Yamanashi. En l'absence de compléments de tests des gènes de non sensibilité, nous avons appelé le gène qui gouverne la résistance à la souche de DNV de Zhenjiang (Chine) le gène de non sensibilité (*nsd-Z*).

EFFECT OF LONG-TERM REFRIGERATION OF EGGS ON HATCHING AND REARING PERFORMANCE OF SOME POLYVOLTINE SILKWORM RACES, *BOMBYX MORI* L., IN NORTHERN INDIA

MEERA VERMA¹ & T.P.S. CHAUHAN²

1. Regional Sericultural Research Station, Sahaspur, Dehradun, Uttar Pradesh, India.

2. Regional Sericultural Research Station, P.B. No. 21, Coonoor 643 101, Nilgiris Dist., Tamil Nadu, India.

The present study revealed that refrigeration (5 °C temp.) of non-hibernating eggs up to 30 days did not have any adverse effect on the rearing parameters of Nistari, MY1 and 'O' polyvoltine silkworm races. In 40- and 50-day-refrigerated eggs, the hatching percentage varied between 88.99 and 65.65 in these races. Similarly, the rearing performance of the larvae of 30-day-refrigerated eggs was on a par with the control. The rearing parameters at 40 and 50 days of cold storage were found mildly affected in all the races while in the 60- and 70-day batches the hatching and rearing performances were severely affected in all the races.

Keywords: Silkworm race, polyvoltine, refrigeration, non-hibernating eggs.

INTRODUCTION

Embryonic development in the non-hibernating eggs of polyvoltine races is completed by the ninth day after oviposition under proper incubation conditions (Hiratsuka, 1975; Datta, 1988). It is well established that the eggs after oviposition can be preserved for 20 days at 5 °C to delay the hatching for various reasons without affecting the rearing characteristics (Hiratsuka, 1975). In the recent past, prolonged refrigeration of silkworm eggs for more than 20 days has been attempted and the effects of refrigeration on hatching and subsequent rearing were studied in the indigenous polyvoltine races by many researchers (Datta *et al.*, 1972; Narayanaswamy and Govindan, 1987; Tayade *et al.*, 1987; Anonymous, 1989).

Prolonged refrigeration of eggs is inevitable in some parts of Northern India where mulberry leaves fall during winter months and as a result rearings are not possible. The polyvoltine silkworm races in these areas are maintained either by conducting rearing of limited quantum on the mulberry foliage available in the late-pruned bushes or from the mist chambers in mulberry gardens. This involves a high rearing cost and restricts the mass-scale rearings to prepare P₁ seeds for rearing during the spring season, thus hampering the preparation of multivoltine × bivoltine hybrid seed during the summer season.

The present study was undertaken to work out the threshold period of refrigeration of non-hibernating eggs in cold storage so as to obtain normal hatching and overall rearing performance in some popular polyvoltine races under the prevailing North Indian conditions.

MATERIALS AND METHODS

Disease-free layings of Nistari, 'O' and MY1 silkworm races were taken for the study. After 20 hr of oviposition, layings were collected and disinfected in 2 per cent of formalin solution. Green moth examination was conducted to ensure that the layings were free from any diseases. Disease-free

Table I. Rearing performance* of the refrigerated eggs of the different polyvoltine silkworm races.

Tableau I. Performances d'élevage* des oeufs réfrigérés des différentes races de ver à soie polyvoltines.

Sl no.	Race	Refrigeration duration (days)	Replication	Hatching percentage	Cocoon yield/10,000 larvae brushed		Average single cocoon weight (g)	Average single shell weight (g)	Average shell ratio (%)	Effective rate of rearing (ERR)
N° de série	Race	Durée de réfrigération (jours)	Répétitions	Taux d'éclosion (%)	Weight (kg)	Number	Poids moyen du cocon (g)	Poids moyen de la coque (g)	Richesse soyeuse moyenne (%)	Taux effectif d'élevage
					Rendement en cocons pour 10 000 larves levées					
					Poids (kg)	Nombre				
1	MY1	30	3	88.78 ± 2.22	11.157 ± 0.717	8457 ± 535	1.44 ± 0.028	0.204 ± 0.005	14.19 ± 0.249	84.57 ± 5.35
		40	3	88.99 ± 1.20	10.980 ± 1.179	7894 ± 794	1.45 ± 0.036	0.192 ± 0.008	13.23 ± 0.718	78.94 ± 7.94
		50	3	51.97 ± 5.06	8.139 ± 1.340	5838 ± 863	1.429 ± 0.131	0.212 ± 0.007	14.94 ± 0.878	58.38 ± 8.63
		60	3	50.38 ± 13.73	4.342 ± 1.031	3824 ± 1007	1.217 ± 0.024	0.157 ± 0.013	12.89 ± 1.19	38.24 ± 10.07
		70	3	44.79 ± 6.99	2.970 ± 0.539	3121 ± 198	1.06 ± 0.042	0.124 ± 0.002	11.71 ± 0.494	31.21 ± 1.98
		Control / Témoin	3	91.02 ± 0.649	10.12 ± 0.457	9332 ± 358	1.158 ± 0.031	0.169 ± 0.007	14.53 ± 0.252	93.32 ± 3.58
2	Nistari	30	3	91.55 ± 0.535	8.319 ± 0.038	8926 ± 137	1.03 ± 0.012	0.127 ± 0.008	12.34 ± 0.08	89.26 ± 1.37
		40	3	76.04 ± 7.73	6.337 ± 1.559	6711 ± 1566	1.002 ± 0.033	0.125 ± 0.006	12.44 ± 0.266	67.11 ± 15.66
		50	3	66.68 ± 1.413	9.055 ± 0.930	7834 ± 809	1.15 ± 0.028	0.145 ± 0.004	12.60 ± 0.201	78.34 ± 8.09
		60	3	49.69 ± 7.49	6.059 ± 1.044	6627 ± 992	0.972 ± 0.072	0.108 ± 0.013	11.04 ± 1.39	66.27 ± 9.92
		70	3	43.14 ± 11.01	1.897 ± 0.221	2503 ± 414	0.904 ± 0.004	0.109 ± 0.009	11.94 ± 0.203	25.03 ± 4.14
		Control / Témoin	3	92.04 ± 1.98	8.673 ± 0.074	9451 ± 225	0.928 ± 0.044	0.103 ± 0.008	11.12 ± 0.389	94.51 ± 2.25
3	'O'	30	3	83.97 ± 6.72	11.500 ± 1.068	8833 ± 458	1.29 ± 0.057	0.190 ± 0.010	14.76 ± 0.627	88.33 ± 4.58
		40	3	65.65 ± 9.17	7.023 ± 0.512	7123 ± 299	1.019 ± 0.033	0.145 ± 0.012	14.21 ± 1.212	71.23 ± 2.99
		50	3	81.08 ± 2.74	6.056 ± 0.763	5988 ± 737	1.123 ± 0.078	0.152 ± 0.008	13.53 ± 0.285	59.88 ± 7.37
		60	3	55.61 ± 2.49	8.907 ± 0.750	6965 ± 285	1.318 ± 0.061	0.202 ± 0.014	15.29 ± 0.509	69.65 ± 2.85
		70	3	35.28 ± 4.624	2.978 ± 0.113	2955 ± 142	1.03 ± 0.042	0.158 ± 0.007	15.32 ± 0.155	29.55 ± 1.42
		Control / Témoin	3	93.53 ± 2.60	10.222 ± 1.356	9329 ± 299	1.125 ± 0.090	0.150 ± 0.006	13.35 ± 0.560	93.29 ± 2.99

* Mean ± standard deviation / Moyenne ± écart type.

layings of each race were grouped in 5 treatment batches and a control with 3 replications in each batch. Eggs aged 24 to 30 hr were preserved at 5 °C for 30 and 40 days' duration. Temperature was further lowered from 5 °C to 2 °C $\pm$ 1 °C for 50, 60 and 70 days' refrigeration of eggs. The observations on hatching were recorded for 30, 40, 50, 60 and 70 days' batches after incubation. The rearing performances of these batches on cocoon yield, effective rate of rearing (ERR) and other cocoon characters were studied, conducting the rearing under optimum temperature and humidity conditions. The results were subjected to statistical analysis (ANOVA) and significance test. The experiment was conducted during October-November months.

RESULTS

It is evident from the results listed in Tables I and II that the hatching in the Nistari, 'O' and MY1 races was not affected by refrigeration of egg layings over a period of 30 days. Nistari, 'O' and MY1 races recorded hatching percentages of 91.55, 83.97 and 88.78, respectively, up to 30 days' refrigeration of eggs. The hatching percentage of these races, however, decreased significantly from 91.02 to 44.79 in MY1, 92.04 to 43.14 in Nistari and 93.53 to 35.28 in 'O' with the increase in the refrigeration duration from 0 (control) to 70 days. Hatching in the 40- and 50-day-refrigerated eggs was considerably affected but was well above 65 per cent in all the races except MY1 race (51.97 per cent); while at 60 and 70 days' refrigeration, the hatching was severely affected and a number of eggs died after body pigmentation. Embryonic studies of these eggs revealed that the eggs reached up to Ki 'B' and 'C' stages and died subsequently inside the egg shells.

The rearing performance (Table I) of the hatched larvae of 60- and 70-day-refrigerated eggs revealed that prolonged refrigeration of eggs adversely affected the cocoon yield, cocoon weight and shell weight. The survival rate (cocoon yield/10,000 larvae by number) of these larvae fell significantly ($P < 0.01$) below 31 per cent after 70 days of refrigeration. At 40 and 50 days of refrigeration, the rearing performance of these races was adversely affected too as compared to the control and 30 days' refrigeration. The rearing performance of the 30-day-refrigerated eggs of these races was almost on a par with the control especially in terms of cocoon yield/10,000 larvae brushed by number. MY1 and 'O' races recorded a higher cocoon yield by weight/10,000 larvae brushed in 30-day-refrigerated batches than their respective controls; however, Nistari race recorded the lowest cocoon yield by weight/10,000 larvae brushed, on a par with its control batch. It was interesting to note that the average single cocoon weight of MY1, 'O' and Nistari races was higher in 30-, 40- and 50-day-refrigerated batches than in their corresponding controls. But in 70-day-refrigerated batches the average single cocoon weight decreased as compared to the control batches in all the races.

Cocoons harvested out of these batches were kept for emergence in the grainage room. Self-mating was allowed in 1:1 male:female ratio. The grainage results revealed that there was no adverse effect of refrigeration on fecundity and hatching in the progeny of 30-, 40- and 50-day-refrigerated eggs of these races. But the 60- and 70-day-refrigerated eggs showed decrease in the fecundity.

DISCUSSION

Refrigeration of non-hibernating eggs of polyvoltine silkworm races for a period of 20 to 22 days has no side effects on hatching and its rearing (Datta *et al.*, 1972; Hiratsuka, 1975). However, an increase in the chilling duration beyond 20 days results in a decrease in the hatching percentage of non-hibernating eggs (Furusawa *et al.*, 1987; Narayanaswamy and Govindan, 1987; Anonymous, 1989). In contrast to these earlier studies, the present investigation revealed no adverse effect of refrigeration of eggs for 30 days on hatching of MY1, Nistari and 'O' races. The increase in the duration of refrigeration beyond 30 days adversely affected the hatching. These observations are in agreement with those of Tayade *et al.* (1987) who stated that preservation of eggs of 'Pure Mysore' polyvoltine eco-race at 5 °C up to 30 days did not have any adverse effect on hatching. They also found a decrease in the hatching percentage with the increase in the chilling duration and in 55-day-refrigerated eggs hatching came down to 24.15 per cent.

Table II. Analysis of variance of refrigerated batches of Nistari, 'O' and MY1 races.

Tableau II. Analyse de variance des lots réfrigérés des races Nistari, O et MY1.

Source	Degree of freedom	Mean sum of squares		
		Hatching	ERR	Average single cocoon wt.
Source	Degré de liberté	Somme moyenne des carrés		
		Eclosion	Taux effectif d'élevage	Poids moyen du cocon
Nistari				
Replication / Répétition	2	115.145	99.36	0.00
Treatment / Traitement	4	1155.8922**	1776.67**	0.025**
Error / Ecart	8	84.512	135.80	0.003
CD at 5%		17.309	21.941	0.1031
CV		14.052	17.874	5.418
'O'				
Replication / Répétition	2	51.605**	4.23	0.00199
Treatment / Traitement	4	1190.755**	1409.39**	0.06
Error / Ecart	8	48.693	34.36	0.00559
CD at 5%		13.1385	11.0367	0.1408
CV		10.849	9.1978	6.4638
MY1				
Replication / Répétition	2	3.672	114.56	0.1283
Treatment / Traitement	4	1449.52**	1689.4235**	0.0923**
Error / Ecart	8	100.163	73.1167	0.0245
CD at 5%		18.844	16.099	0.1409
CV		15.4015	14.675	5.682

CV: Coefficient of variation / Coefficient de variation.

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

The rearing performance of the refrigerated eggs in the present experiment was found associated with the preservation duration concomitant to the hatching performance in a particular race. Up to 30 days, there was no adverse effect of refrigeration on the rearing performance. The cocoon yield by weight/10,000 larvae brushed in 30-day-refrigerated batches was high especially in MY1 and 'O' races despite the decrease in ERR as compared to their corresponding controls, which was mainly due to the increase in the average single cocoon weight in the refrigerated batches. Interestingly, the average single cocoon weight in 30-, 40- and 50-day-refrigerated batches of MY1, 'O' and Nistari races was high as compared to their controls. This increase in cocoon weight remained unexplained in the present study in the absence of any biochemical studies on the refrigerated eggs of these polyvoltine races. But in 50-, 60- and 70-day-refrigerated eggs, there was a pronounced adverse effect

especially on the cocoon yield by number and on the cocoon characters. In a similar experiment on 'Pure Mysore' × bivoltine hybrid which lays non-hibernating eggs, a decrease was observed in the effective rate of rearing in larvae of 35-day-refrigerated eggs (Anonymous, 1989).

Comparing the overall performance of the races taken for the present study, Nistari performed fairly well in respect of hatching and rearing performance in the 30-, 40-, 50- and 60- day-refrigerated eggs. The present study, however, does not recommend any long-term refrigeration of eggs of polyvoltine races beyond 30 days but provides a guideline as to what extent non-hibernating eggs of Nistari, 'O' and MY1 races can withstand the refrigeration without affecting the rearing performance in general. But the authors also view that there should be more experiments on manipulation of temperature, humidity in cold storage with long-term refrigeration of non-hibernating eggs and the biochemical aspect of refrigerated eggs especially carbohydrates should be studied before reaching any conclusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the technical staff of the Regional Sericultural Research Station, Majra, Dehradun, who have helped in completion of this experiment and Mr S. Sekar, Stenographer, Regional Sericultural Research Station, Coonoor, for having typed this manuscript neatly. Research facilities provided by the Joint Director, Regional Sericultural Research Station, Majra, are also thankfully acknowledged.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1989) Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore (1988-89), India, 72 pp.
- DATTA R.K., SENGUPTA K., BISWAS S.N. (1972) Studies on the preservation of multivoltine silkworm eggs at low temperatures. *Indian J. Seric.*, 11(1), 22-27.
- DATTA R.K. (1988) Embryological studies of non-diapause silkworm *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 27(1), 1-6.
- FURUSAWA T., SHIMIZU K., YANO T. (1987) Polymol accumulation in the non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan*, 56(2), 150-156.
- HIRATSUKA (1975) Textbook of Tropical Sericulture. Japanese Overseas Co-operation Volunteers, Tokyo, Japan, pp. 293-294.
- NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R. (1987) Effect of refrigeration of eggs of Pure Mysore race of silkworm, *Bombyx mori* L., at blue stage. *Entomon* 12(2), 105-107.
- TAYADE D.S., JAWALE M.D., UNCHEGAONKAR P.K. (1987) Effect of refrigeration on hatching of eggs of multivoltine race, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 27(2), 297-299.

EFFET DE LA REFRIGERATION PROLONGEE DES OEUFS SUR L'ECLOSION ET LES PERFORMANCES DE CERTAINES RACES POLYVOLTINES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. DANS LE NORD DE L'INDE

MEERA VERMA¹ & T.P.S. CHAUHAN²

1. Regional Sericultural Research Station, Sahaspur, Dehradun, Uttar Pradesh, Inde.

2. Regional Sericultural Research Station, P.B. No. 21, Coonoor 643 101, Nilgiris Dist., Tamil Nadu, Inde.

Cette étude montre que la réfrigération (à 5 °C) des oeufs non diapausants jusqu'à 30 jours n'a pas d'effet négatif sur les paramètres d'élevage des races de ver à soie Nistari, MYI et O. Le taux d'éclosion varie de 88,99 à 65,65 % chez ces races lorsque les oeufs sont stockés au froid pendant 40 et 50 jours. De même, la performance d'élevage des larves provenant d'oeufs conservés au froid pendant 30 jours est comparable à celle obtenue pour le témoin. Le stockage au froid pendant 40 et 50 jours affecte faiblement les paramètres d'élevage chez toutes les races considérées tandis que le taux d'éclosion et la performance d'élevage obtenus pour les lots conservés au froid pendant 60 et 70 jours sont fortement affectés chez toutes les races.

INTRODUCTION

Le développement embryonnaire des oeufs non diapausants des races polyvoltines est terminé neuf jours après l'oviposition dans des conditions d'incubation appropriées (Hiratsuka, 1975 ; Datta, 1988). On sait que les oeufs peuvent être conservés à 5 °C pendant 20 jours après l'oviposition si l'on souhaite, pour diverses raisons, retarder l'éclosion sans que cela affecte les caractéristiques d'élevage (Hiratsuka, 1975). De nombreux chercheurs ont étudié les effets de la réfrigération prolongée des oeufs de ver à soie au-delà de 20 jours sur l'éclosion et l'élevage chez des races polyvoltines indigènes (Datta et coll., 1972 ; Narayanaswamy et Govindan, 1987 ; Tayade et coll., 1987 ; Anonyme, 1989).

La réfrigération prolongée des oeufs est nécessaire dans certaines régions du nord de l'Inde où les mûriers perdent leurs feuilles en hiver, rendant tout élevage impossible. Les races de ver à soie polyvoltines de ces régions sont conservées en réalisant un élevage limité avec des feuilles d'arbustes taillés tardivement ou cultivés sous abri humide dans la plantation de mûrier. Cette méthode est onéreuse, elle restreint les élevages de masse de graines P₁ destinées à l'élevage de printemps et bloque le grainage des hybrides polyvoltins × bivoltins en été.

Cette étude a été entreprise afin de déterminer un seuil de réfrigération des oeufs non diapausants permettant d'obtenir une éclosion et une performance d'élevage normales chez certaines races polyvoltines couramment utilisées dans les conditions climatiques du nord de l'Inde.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines de Nistari, O et MYI ont été choisies pour cette étude. Vingt heures après l'oviposition, les pontes ont été prélevées et désinfectées dans une solution de formol à 2 %. On a procédé à l'examen des papillons afin de s'assurer que les pontes étaient exemptes de maladies. Des pontes saines de chacune des races ont été réparties en cinq lots expérimentaux et un témoin, avec trois répétitions par lot. Les oeufs âgés de 24 à 30 h ont été conservés à 5 °C sur des durées de 30 et 40 jours. La température de réfrigération des oeufs a ensuite été portée de 5 °C à 2 ± 1 °C pendant 50,

60 et 70 jours. Les observations sur l'éclosion ont été enregistrées à 30, 40, 50, 60 et 70 jours après l'incubation. Les performances d'élevage de ces lots pour ce qui concerne le rendement en cocons, le taux effectif d'élevage et les autres caractères du cocon ont été étudiées ; les élevages ont été réalisés dans des conditions optimales de température et d'humidité. Les résultats ont été soumis à une analyse statistique et à un test de signification. L'expérience a été réalisée en octobre-novembre.

RESULTATS

Les résultats présentés dans les tableaux I et II montrent clairement que la réfrigération des oeufs sur une période de 30 jours n'affecte pas le taux d'éclosion des races Nistari, O et MY1. Nistari, O et MY1 donnent respectivement un taux d'éclosion de 91,55 %, 83,97 % et 88,78 % jusqu'à 30 jours de réfrigération. Toutefois, le pourcentage d'éclosion de ces races diminue de manière significative, passant de 91,02 à 44,79 % chez MY1, de 92,04 à 43,14 % chez Nistari et de 93,53 à 35,28 % chez O lorsque la durée de réfrigération passe de 0 (témoin) à 70 jours. Le taux d'éclosion des oeufs réfrigérés pendant 40 et 50 jours est fortement affecté mais dépasse largement 65 % chez toutes les races, sauf MY1 (51,97 %) ; cependant, à 60 et 70 jours de réfrigération, le taux d'éclosion diminue fortement et un certain nombre d'oeufs meurent après la pigmentation du corps. L'étude embryonnaire de ces oeufs révèle que les oeufs atteignent les stades Ki « B » et « C » et meurent ensuite à l'intérieur du chorion.

La performance d'élevage (Tableau I) des larves écloses dans les lots réfrigérés pendant 60 et 70 jours révèle qu'une réfrigération prolongée des oeufs a un effet négatif sur le rendement en cocons, le poids du cocon et le poids de la coque. Le taux de survie (rendement en cocons/10 000 larves en nombre) de ces larves chute de manière significative ($P < 0,01$) et passe à 31 % après 70 jours de réfrigération. A 40 et à 50 jours de réfrigération, la performance de ces races est également affectée par rapport au témoin et à la réfrigération pendant 30 jours. La performance d'élevage des oeufs réfrigérés pendant 30 jours est comparable à celle obtenue pour le témoin, principalement pour ce qui concerne le rendement en cocons/10 000 larves levées (en nombre). Les races MY1 et O donnent un poids du cocon plus élevé chez les lots réfrigérés pendant 30 jours que chez les témoins correspondants ; cependant, Nistari donne le rendement en cocons/10 000 larves levées (en poids) le plus faible, résultat comparable à celui obtenu pour le lot témoin. Il est intéressant de noter que le poids du cocon chez les races MY1, O et Nistari est plus élevé chez les lots réfrigérés pendant 30, 40 et 50 jours que chez les témoins correspondants. Cependant, chez les lots réfrigérés pendant 70 jours, le poids du cocon diminue par rapport à celui des lots témoins pour toutes les races.

Les cocons issus de ces lots ont été conservés dans la pièce de grainage jusqu'à l'émergence. Les papillons ont été accouplés à raison de 1 femelle pour 1 mâle. Les résultats du grainage montrent que la réfrigération n'a pas d'effet négatif sur la fécondité et le taux d'éclosion des descendants des lots réfrigérés pendant 30, 40 et 50 jours chez ces races. En revanche, les descendants des lots réfrigérés pendant 60 et 70 jours présentent une diminution de la fécondité.

DISCUSSION

La réfrigération des oeufs non diapausants de vers à soie polyvoltins sur une période de 20 à 22 jours n'a pas d'effets secondaires sur l'éclosion et l'élevage (Datta et coll., 1972 ; Hiratsuka, 1975). Cependant, l'augmentation de la durée de conservation au froid au-delà de 20 jours entraîne une diminution du taux d'éclosion des oeufs non diapausants (Furusawa et coll., 1987 ; Narayanaswamy et Govindan, 1987 ; Anonyme, 1989). Contrairement à ces travaux antérieurs, l'étude présentée ici montre que la réfrigération des oeufs pendant 30 jours n'a pas d'effets défavorables sur l'éclosion chez les races MY1, Nistari et O. L'augmentation de la durée de réfrigération au-delà de 30 jours a un effet négatif sur le taux d'éclosion. Ces observations sont conformes à celles de Tayade et coll. (1987) qui ont observé que la conservation des oeufs de l'écorace polyvoltine Pure Mysore à 5 °C jusqu'à 30 jours n'a pas d'effet négatif sur le taux d'éclosion. Ils ont également observé une diminution du taux d'éclosion lorsque la durée de la conservation au froid augmente : chez les oeufs réfrigérés pendant 55 jours, le taux d'éclosion tombe à 24,15 %.

La performance d'élevage des oeufs réfrigérés obtenue dans cette étude est associée à la durée de conservation et liée à la performance d'éclosion d'une race donnée. Jusqu'à 30 jours, la réfrigération n'a pas d'effet négatif sur la performance d'élevage. Le rendement en cocons/10 000 larves levées (en poids) chez les lots réfrigérés pendant 30 jours est élevé, en particulier chez les races MY1 et O, malgré la diminution, due surtout à l'augmentation du poids du cocon chez les lots réfrigérés, du taux effectif d'élevage par rapport aux témoins correspondants. Il est intéressant de noter que le poids du cocon obtenu chez les lots réfrigérés pendant 30, 40 et 50 jours des races MY1, O et Nistari est supérieur à celui obtenu chez les témoins. En l'absence d'études biochimique sur les oeufs réfrigérés de ces races polyvoltines, il ne nous est pas possible d'expliquer cette augmentation du poids du cocon. Cependant, chez les oeufs réfrigérés pendant 50, 60 et 70 jours, on observe un effet négatif marqué, en particulier pour ce qui concerne le rendement en cocons (en nombre) et les caractères du cocon. Dans une expérience similaire chez l'hybride Pure Mysore × bivoltin, qui pond des oeufs non diapausants, on a observé une diminution du taux effectif d'élevage pour les larves issues d'oeufs réfrigérés pendant 35 jours (Anonyme, 1989).

Si l'on compare la performance globale des races sélectionnées pour cette étude, Nistari donne d'assez bons résultats concernant le taux d'éclosion et la performance d'élevage chez les oeufs réfrigérés pendant 30, 40, 50 et 60 jours. Cependant, cette étude déconseille la conservation prolongée des oeufs de races polyvoltines au-delà de 30 jours et vise à donner des indications sur le degré de résistance à la conservation au froid des oeufs non diapausants des races Nistari, O et MY1 sans qu'il y ait d'effet sur la performance globale d'élevage. Les auteurs estiment également qu'il conviendrait de procéder à des expériences sur la manipulation de la température et de l'humidité lors de la réfrigération prolongée des oeufs non diapausants ; l'aspect biochimique des oeufs réfrigérés, en particulier les hydrates de carbone, devrait être abordé avant de tirer des conclusions définitives.

SILK ENHANCER FROM *CASSIA TORA* FOR *BOMBYX MORI* L.*

S.K. CHOWDHRY¹, R.K. KHAJURIA¹, A.K. KULSRASTA², R.K. OGRA¹ & S.M. JAIN¹

1. Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu Tawi 180001, India.

2. Department of Sericulture, Government of Hichalam Pradesh, Palampur, H.P., India.

The effect of active constituents of Cassia tora such as chrysophanol, chrysophanol-1-0-β-D-glucoside, Cassia tora butanol extract, triacontanol, β-sitosterol, β-sitosterol glucoside, kaempferol-3-0-rutinoside and quercetin-7-0-rhamnoside, applied topically on the abdominal tergum of the silkworm, Bombyx mori L., after the fourth ecdysis has been studied. It was observed that, with the application of higher doses of compound, the larval period decrease was associated with the silk ratio increase but to a limited extent. The most effective dose was observed to be 7 µg/larva when applied at 48 and 72 hr after resumption of the last moult. There was also a difference in the silk increase in the different races, and NB4D2 gave the highest increase as compared to KA and SH6.

Keywords: *Bombyx mori*, *Cassia tora*, chrysophanol, chrysophanol-1-δ-0-β-D-glucoside, triacontanol, sitosterol-β-glucoside, kaempferol-3-0-rutinoside, quercetin-7-0-rhamnoside.

INTRODUCTION

Moulting hormones of insects are known to cause morphogenesis, regulate gene activities, metabolism of nucleic acids, protein synthesis, development, reproduction, diapause as well as cocoon spinning in the silkworm at a particular stage during the fifth instar. They considerably increase silk production and decrease the larval period at specific doses and times of application. In the present study, a number of active principles of *Cassia tora* were studied for silk increase and their effect on different races was also studied. *Cassia tora* (Leguminosae) is a wild plant in tropical Asian countries. It is also known as sickle pod and is reputed for its medicinal value as expectorant, antiasthmatic and diuretic (Nadkani *et al.*, 1954; Raghunathan *et al.*, 1974). The seeds are used to improve visual acuity in Chinese medicine. In Korea, the hot aqueous extract of the seeds is taken orally for the protection of liver. An increase in silk production in the silkworm, *Bombyx mori*, with an aqueous extract of *Cassia tora* was reported Shan and Sheng (1980). In our studies, the aerial parts of *Cassia tora* before maturation of pods were subjected to isolation of various constituents which were studied individually on four pure races and two hybrids of the silkworm, *Bombyx mori*. The results are reported in the present communication.

MATERIALS ET METHODS

Melting points were determined on an S.L. 152 melting point apparatus and are uncorrected. UV spectra were carried out on Hitachi UV 320 spectrophotometer. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on Jeol FX-90Q spectrophotometer using TMS as internal standard. Mass spectra were obtained on JMS-D 300 mass spectrometer.

* This paper is covered by Indian patent application No. 513/DEL dated 19 May 1993.

The aerial part of *Cassia tora* was collected in the month of August before maturation of the pods. The plant material was dried, powdered and extracted with 50% aqueous methanol in the Soxhlet's apparatus. The solvent from the extract was removed under vacuum to afford a residue which was diluted with water and partitioned successively with chloroform, ethyl acetate and finally with n-butanol, concentrated under vacuum to give the residue. The chloroform extract on column chromatography over silica gel (60-120 mesh) afforded two compounds, A and B, in petroleum ether (60-80°) and ethyl acetate in order of their increasing polarity. Similarly, the ethyl acetate extract on column chromatography over silica gel (60-120 mesh) yielded one compound C on elution with chloroform-ethyl acetate and methanol. The n-butanol extract on repeated column chromatography over silica gel (60-120 mesh) furnished four compounds, D, E, F and G.

Compound A (yield 0.15%), m.p. 87 °C, was identified as triacontanol by spectral data, TLC and mixed melting point determination with authentic sample (Kazushiro *et al.*, 1980).

Compound B (yield 0.05%), m.p. 136 °C, was identified as β -sitosterol with the help of spectral data, TLC and mixed melting point with authentic material (Osman *et al.*, 1975).

Compound C (yield 0.001%), m.p. 196 °C, was identified as chrysophanol on the basis of comparison of spectral data as described in literature (Acharya *et al.*, 1975).

Compound D (yield 0.001%), m.p. 284 °C, was identified as sitosterol β -D-glucopyranoside on the basis of its spectral data. On acid hydrolysis it furnished β -sitosterol and D-glucose.

Compound E (yield 0.0009%), m.p. 248-249 °C, was identified as chrysophanol-1-O- β -D-glucopyranoside on the basis of spectral data and study of its hydrolysis products (Wong *et al.*, 1989).

Compound F (yield 0.0002%) was identified as kaempferol-3-O-rutinoside on the basis of its hydrolysis products and comparison of $^1\text{H-NMR}$, UV, MS spectral data of the aglycone with the literature value (Kim *et al.*, 1992).

Compound G (yield 0.0006%), m.p. 222 °C, was identified as quercetin-7-O-rhamnoside on the basis of its hydrolysis products and comparison of $^1\text{H-NMR}$, UV, MS spectral data of the aglycone with the literature data (Mabry *et al.*, 1970).

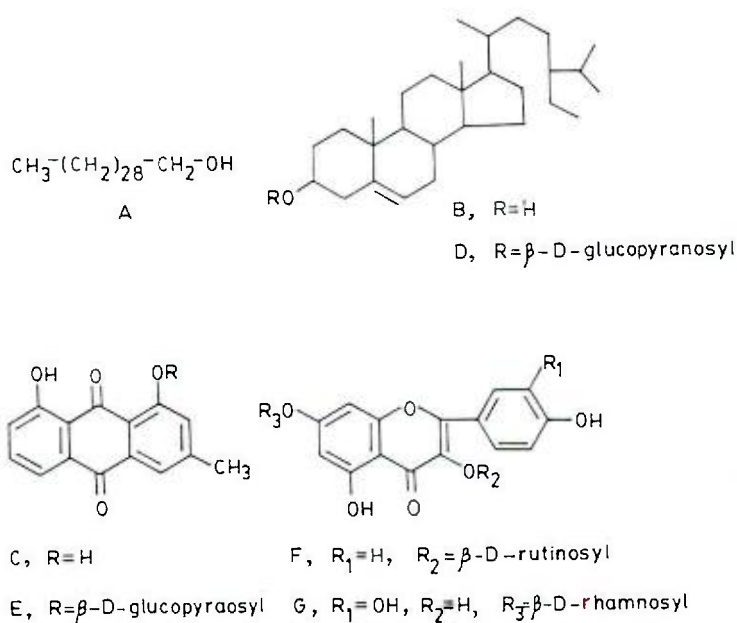


Fig. 1: Chemical composition of compounds A, B, C, D, E, F and G.

Fig. 1 : Composition chimique des composés A, B, C, D, E, F et G.

Preparation and application of doses:

Compounds A, B, C, D, E, F and G were first dissolved in ethanol and later diluted with water. Three concentrations, i.e., 3 µg, 5 µg and 7 µg, were prepared and applied topically on the abdominal tergum of the larvae with the help of a microapplicator.

The test animals and methods of application:

Larvae in the fifth instar of fourth generation hybrid RL₂₆ × RL₃₀ (RH86) (evolved by the Regional Research Laboratory, Jammu), NB7, NB4D₂, SH₆ and KA (Central Silk Board races) were used for the experiments. The larvae were reared on mulberry leaves in wooden trays in the laboratory at 23 ± 1 °C and 70% relative humidity. Test animals of equal size and weight were selected after the fourth ecdysis. For each compound, twelve batches of test animals were taken and each batch consisted of three replicates. Each replicate had fifty animals. In the first experiment, the dose of 5 µg was given for each compound at 48 and 72 hr separately. In addition, repeated doses at 24 hr, 24 hr and 48 hr were given in one of the experiments in which the n-butanol extract was applied in doses of 0.01 µg/larva, 0.1 µg/larva and 5 µg/larva respectively in the third, fourth and fifth instars. In the second experiment, three different doses, i.e., 3 µg/larva, 5 µg/larva and 7 µg/larva were given at 48 hr, 72 hr and 96 hr of interval in the fifth instar on NB7 race. In the third experiment, three different races, i.e., NB4D₂, SH₆ and KA, were treated with a dose of 4 µg/larva at a fixed time of treatment, i.e., 72 hr in the fifth instar.

RESULTS

The results of the application of six compounds, i.e., chrysophanol, chrysophanol-1-O-β-D-glucoside, n-butanol extract, β-sitosterol-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside and quercetin-7-O-rhamnoside, are presented in Tables I, II and III, respectively. A perusal of the tables show that the time of application and test doses are highly significant with respect to cocoon weight, pupal weight, shell weight, shell percentage, increase of silk and decrease of larval period in the different races treated with the different compounds.

Cocoon weight:

It is clear from Table I that the highest cocoon weight was recorded with the butanol extract, i.e., 2.173 g in single dose and 2.178 g in repeated doses as compared to the control, i.e., 1.809 g. As shown in Table I, in almost all the compounds tested, the cocoon weight increased when fixed doses of 5 µg/larva were given at 48 and 72 hr. On the other hand, application done with repeated doses of 0.01 µg, 0.1 µg and 5 µg given in the third, fourth and fifth instars at 24 hr, 24 hr and 48 hr, respectively, of butanol extract gave the highest activity of 2.178 g. In another experiment on batches treated at different time intervals, i.e., 48 hr, 72 hr and 96 hr with doses of 3 µg, 5 µg and 7 µg/larva, it was recorded that the highest cocoon weight of 2.566 g was obtained with the dose of 7 µg/larva when applied at 96 hr.

Similarly, the racial difference was also studied for the butanol extract in a single dose of 4 µg/larva at 72 hr with three races, i.e., NB4D₂, SH₆ and KA. It was observed that NB4D₂ gave the highest cocoon weight of 2.630 g, as given in Table II.

Pupal weight:

When different compounds were tested, it was found that the highest pupal weight (1.48 g) was recorded with quercetin-7-O-rhamnoside and chrysophanol when applied in a dose of 5 µg/larva, as shown in Table I. On the contrary, when the racial difference was observed, it was found that the increase in pupal weight was higher in the case of KA, i.e., 6.80% higher than the control (Table III).

Shell weight:

The maximum shell weight (0.760 g) was observed when repeated doses of butanol extract were given and the minimum (0.669 g) with chrysophanol (Table I). In other experiments when treatments were given at 48 hr, 72 hr and 96 hr in doses of 3 µg, 5 µg and 7 µg/larva, respectively, of butanol

extract, it was found that the treatment of 3 µg/larva when applied at 72 hr was highly significant, giving 0.440 g of silk as compared to the other two races (Table III).

Table 1. Effect of *Cassia tora* on *Bombyx mori* L., strain RH86.

Tableau I. Effet de *Cassia tora* sur *Bombyx mori* L., souche RH86.

Treatment	Time of application (dose 5 mg/larva)	Total larval period after 27 days		Decrease in larval period (hours)	Average cocoon weight (g)	Average pupal weight (g)	Average shell weight (g)	Increase in silk over control (%)
		days	hours					
Traitement	Moment de l'application (dose 5 mg/larve)	Durée larvaire totale après 27 jours		Diminution de la période larvaire (heures)	Poids moyen du cocon (g)	Poids moyen nymphal (g)	Poids moyen de la coque (g)	Augmentation de la soie par rapport au témoin (%)
		jours	heures					
C	48 hr after 5th instar	27	23	1	2.160	1.480	0.680	7.59
	48 h après 5e âge				± 0.0133	± 0.112	± 0.121	
CG	48 hr after 5th instar	27	22	2	2.149	1.470	0.674	6.64
	48 h après 5e âge				± 0.123	± 0.102	± 0.131	
C	72 hr after 5th instar	27	19	5	2.126	1.450	0.664	5.85
	72 h après 5e âge				± 0.213	± 0.021	± 0.312	
CG	72 hr after 5th instar	27	18	6	2.142	1.460	0.760	6.96
	72 h après 5e âge				± 2.142	± 0.171	± 0.132	
CtBE	2nd, 4th and 5th instars	27	21	3	2.178	1.141	0.760	20.25
	2e, 4e et 5e âges				± 0.132	± 0.110	± 0.132	
TSGKR	48 hr after 5th instar	27	22	2	2.168	1.470	0.698	10.44
	48 h après 5e âge				± 0.112	± 0.121	± 0.132	
CtBE	48 hr after 5th instar	27	21.5	2.5	2.173	1.440	0.725	14.71
	48 h après 5e âge				± 0.132	± 0.205	± 0.0121	
QR	72 hr after 5th instar	27	23	1	2.163	1.480	0.680	7.5
	72 h après 5e âge				± 0.131	± 0.112	± 0.213	
KR	72 hr after 5th instar	27	23	2	2.165	1.480	0.685	8.3
	72 h après 5e âge				± 0.121	0.212	0.123	
Control	-	28	-	-	1.809	1.170	0.680	
Témoin					± 0.202	± 0.202	± 0.0133	

C: Chrysophanol. CG: Chrysophanol-1-O-glucoside. CtBE: *Cassia tora* butanol extract (repeated dose) / Extrait butanol de *Cassia tora* (dose répétée). TSGKR: Triaccontanol + β-sitosterol glucoside + kaempferol-3-O-rutinoside. QR: Quercetin-7-O-rhamnoside. KR: Kaempferol-3-O-rutinoside.

Values are mean ± standard deviation of 50 values / Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 50 mesures.

Silk ratio:

The most significant silk ratio was observed when the butanol extract was applied in a dose of 3 µg/larva at 72 hr in the fifth instar. It was found to be 25.05% as compared to 17.5% and 18.32% in the control (Table II). Similarly, when the racial difference was studied, it was observed that NB₄D₂ showed the highest effect as compared to SH₆ and KA (Table II). On the other hand, when three different doses of 3 µg, 5 µg and 7 µg at 48 hr, 72 hr and 96 hr, respectively, of butanol extract, the highest silk ratio observed was 21.7% at 48 hr with the dose of 7 µg/larva (Table II).

Table II. Effect of *Cassia tora* butanol extract on *Bombyx mori* L., strain NB₇: studies on dose and time of application.

Tableau II. Effet de la dose et du moment d'application de l'extrait butanolique de Cassia tora sur la souche NB₇ de Bombyx mori L.

Treatment hormone	Dose (µg/larva)	Time of application in the 5th instar (hr)	Decrease in larval period over control (d:h)	Average cocoon weight (g)	% increase over control	Average shell weight (g)	% increase over control	Shell ratio (%)
<i>Hormone de traitement</i>	<i>Dose (µg/larve)</i>	<i>Heure d'application au 5e âge</i>	<i>Diminution de la durée larvaire par rapport au témoin (j:h)</i>	<i>Poids moyen du cocon (g)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>	<i>Poids moyen de la coque (g)</i>	<i>Augmentation par rapport au témoin (%)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
Control Témoin	3.00	48	0.5	1.863	-11.49	0.290	-21.63	15.566
	5.00		1.5	1.766	-16.11	0.333	-10.00	18.856
	7.00		1.5	2.000	-4.99	0.434	17.29	21.700
	-			2.105		0.370		17.577
Control Témoin	3.00	60-72	0.5	2.400	+16.44	0.440	+15.38	18.330
	5.00		0.9	2.350	+14.02	0.435	+15.38	18.510
	7.00		1.0	2.240	+8.67	0.411	+9.01	18.348
	-			2.061		0.377		18.292
Control Témoin	3.00	80-96	0.8	2.093	-1.46	0.415	+11.26	19.809
	5.00		1.1	2.134	+0.37	0.397	+6.43	18.603
	7.00		1.0	2.566	+20.69	0.400	+1.07	15.588
	-			2.126		0.373		17.544

Values are mean ± standard deviation of 50 values / Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart type de 50 valeurs.

Table III. Effect of *Cassia tora* butanol extract on different races of the silkworm, *Bombyx mori* L.Tableau III. Effet de l'extrait butanolique de *Cassia tora* sur différentes races du ver à soie *Bombyx mori* L..

Race	Dose (μ g/larva)	Time of application in 5th instar	Decrease in larval period (hr)	Average cocoon weight (g)	% increase over control	Average shell weight (g)	% increase over control	Average pupal weight (g)	% increase over control	Shell ratio (%)
<i>Race</i>	<i>Dose</i> (μ g/larve)	<i>Heure</i> <i>d'application</i> <i>au 5e âge</i>	<i>Diminution</i> <i>de la durée</i> <i>larvaire</i> <i>(h)</i>	<i>Poids</i> <i>moyen</i> <i>du cocon</i> <i>(g)</i>	<i>Augmentation</i> <i>par rapport</i> <i>au témoin</i> <i>(%)</i>	<i>Poids</i> <i>moyen de</i> <i>la coque</i> <i>(g)</i>	<i>Augmentation</i> <i>par rapport</i> <i>au témoin</i> <i>(%)</i>	<i>Poids</i> <i>nymphal</i> <i>moyen</i> <i>(g)</i>	<i>Augmentation</i> <i>par rapport</i> <i>au témoin</i> <i>(%)</i>	<i>Richesse</i> <i>soyeuse</i> <i>(%)</i>
NB ₄ D ₂ Control Témoin	4.00 - -	72 - -	10 - -	2.63 2.45	+7.34	0.475 0.415	14.45	2.15 2.03	5.91	18.06 16.93
SH ₆ Control Témoin	4.00 - -	72 - -	11 - -	2.60 2.48	+4.83	0.462 0.410	+12.68	2.13 2.07	+2.89	17.76 16.53
KA Control Témoin	4.00 - -	72 - -	10 - -	2.45 2.28	+7.45	0.406 0.362	+12.15	2.04 1.91	+6.80	16.57 15.87

Values are mean $\pm$ standard deviation of 50 values / Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écart type de 50 valeurs.

Larval period:

From Tables I, II and III, it is clear that all the compounds applied in different doses, at different times and in different races gave a clear-cut reduction in the larval period, i.e., feed intake reduction. The highest decrease of larval period was found in treatment II, i.e. when a dose of 7 µg/larva was given at 48 hr to NB7 race. The reduction in the larval period was 1.5 days, i.e., one day and five hours.

DISCUSSION

The present study on the effect of different compounds, i.e., triacontanol, β -sitosterol, chrysophanol, β -sitosterol-3-O-glucoside, chrysophanol-1-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside and quercetin-7-O-rhamnoside, clearly indicates that the activity of these compounds is ecdysotonal in action. The reduction in the larval period is from 1 hr to 37 hr, as recorded in the different experiments. Similar observations were made by Shan and Sheng (1980) but their observations were based upon crude alcohol extract only and it showed activity of 5 hr. This difference in the larval period reduction activity is reflected in our studies also. The increase in silk to the extent of 20% is highly significant as far as commercial exploitation is concerned. Similar findings were given by Shan and Sheng (1980) without giving percentage increase in silk. The lower effect of pure compounds such as chrysophanol and others is again due to the fact that both crude butanol extract and combination of all the pure compounds gave a higher silk increase, as shown in Table I. It is because of the synergistic activity of the combined compounds, i.e., why the butanolic extract gave 20.25% increase in silk as compared to 10.44% in the mixture of compounds such as triacontanol, β -sitosterol-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside which do not have chrysophanol and perhaps compounds which are in very minute quantities could not be isolated. According to Shan and Sheng (1980) plant extract is in commercial use in China. The higher increase of silk with repeated doses was reported previously by Akai *et al.* (1985) with the use of juvenile hormone mimics, i.e., methoprene. In the present studies, the activity of repeated doses of butanol extract is similar to the observation of Akai *et al.* (1985) of increasing silk from one and a half time to double as compared with a single dose application.

The present studies have opened a new field in sericulture development because on the one hand there is a reduction in the larval period/feeding period by which labour as well as feed consumption are reduced; on the other hand more silk will be produced. Until now, juvenile hormones have been used for increasing silk production, which increased the larval period, because of which labour as well as feed were higher than the normal, hence silk increase was not significantly very economical.

REFERENCES

- ACHARYA T.K., CHATTERJEE I.B. (1975) Isolation of chrysophanic acid-9-anthrone, the major antifungal principle of *Cassia tora*. *Llyodia*, 38(1), 218-220.
- AKAI H., KIMURA K., KIUCHI M., SHIBUKAWA A. (1985) Increase of silk production by repeated treatment with juvenile hormone analogue. *J. Sericult. Sci. Japan*, 54(4), 297-299.
- HOFFMEISTER M., GRUTZAMAEIES H.F. (1966) Zur Chemie des Ecdysterons. *Tetrahedron Lett.*, 4017-4023.
- HETRU C., HORN D.H.S. (1980) Phytocdysteroids and zooecdysteroid. *Progress in Ecdysone Research*, 7, 13-28, J.A. Hoffmann, Elsevier, North Holland.
- KAZUSHIRO M., KAZULOSHI T., YOSHINORI Y. (1980) Synthesis of triacontanol via metathesis-hydroboration-isomerization-oxidation. *J. Org. Chem.*, 45, 737-738.
- KIM M.N., BOGARET F.L.S., PARIS M. (1992) Flavonoids from *Carthamus tinctorius* flowers. *Planta Medica*, 58, 285-286.
- MABRY T.J., MARKIAN K.R., THOMAS M.B. (1970) The systematic identification of flavonoids. 127-152. *Flavones and Flavonols*.
- NADKANI R.M. (1954) Popular Book Depot, Bombay. *Indian Materia Medica*, 1, 291.
- NAKANISHI K., KOREDA M., CHANG M.L., HSU H.Y. (1968) Insect hormones. V. The structures of ponasterones B and C. *Tetrahedron*, 1105-1110.

- OSMAN A.M. (1975) Chemical examination of local plants. Aust. J. Chem., 28, 217-220.
- RAGHUNATHAN K., HARIHARAN V., RANGASWAMI S. (1974) Chrysophanol-1- β -gentiobiose, a new anthraquinone glycoside from *Cassia tora* L. Indian J. Chem., 12, 1251-1253.
- SHAN W.C. (1980) Growth regulation and silk production in *Bombyx mori* L. from photogenous ecdysteroids. Progress in Ecdysone Research, 7, 281-297, J.A. Hoffmann, Elsevier, North Holland.
- TAKEMOTO T., KINO H., HIKMO Y., ORGAWA S., NISHIMOTO N. (1968) Structure of subrosterone, a novel C₁₉ metabolite of insect moulting substances from *Achyranthes subprofusea*. Tetrahedron Lett., 3053-3056.
- WONG S.M., WONG M.M., SELIGMAN O., WAGNER H. (1989) Anthraquinone glycosides from the seeds of *Cassia tora*. Phytochem., 28(1), 211-214.

AMELIORATION DU RENDEMENT EN SOIE CHEZ *BOMBYX MORI* L. A L'AIDE D'EXTRAITS DE *CASSIA TORA*

S.K. CHOWDHRY¹, R.K. KHAJURIA¹, A.K. KULSRASTA², R.K. OGRA¹ & S.M. JAIN¹

1. Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu Tawi 180001, Inde.

2. Department of Sericulture, Government of Hichalam Pradesh, Palampur, H.P., Inde.

On a étudié l'effet de substances actives de Cassia tora tels que le chrysophanol, le chrysophanol-1-0-β-D-glucoside, l'extrait butanolique de Cassia tora, le triacontanol, le β-sitostérol, le β-sitostérol glucoside, le kaempférol-3-0-rutinoside et la quercétine-7-0-rhamnoside appliqués de manière topique sur le tergum abdominal du ver à soie Bombyx mori après la quatrième ecdysis. L'application de doses élevées de composés entraîne une diminution de la durée larvaire et une augmentation limitée de la richesse soyeuse. La dose la plus efficace est de 7 µg/larve appliquée à 48 h et 72 h après reprise de la dernière mue. Il y a également une différence d'augmentation de la quantité de soie en fonction des races, NB4D2 donnant l'augmentation maximale par rapport à KA et SH6.

INTRODUCTION

On sait que les hormones de mue des insectes provoquent la morphogénèse, régulent l'activité des gènes, le métabolisme des acides nucléiques, la synthèse des protéines, le développement, la reproduction, la diapause et le filage chez le ver à soie à un stade précis du cinquième âge. Administrées à des doses et des moments spécifiques, elles provoquent une augmentation importante de la production de soie et une diminution de la durée larvaire. Dans cette étude, un certain nombre de principes actifs de *Cassia tora* ont été étudiés afin de déterminer leur effet sur l'augmentation de la soie grège et sur les différentes races considérées. *Cassia tora* (de la famille des légumineuses) est une plante sauvage des pays tropicaux d'Asie. Elle est également appelée « casse falquée » et est reconnue pour ses vertus médicinales, expectorantes, antiasthmiques et diurétiques (Nadkani et coll., 1954 ; Raghunathan et coll., 1974). Les graines sont utilisées pour améliorer l'acuité visuelle dans la médecine chinoise. En Corée, l'extrait aqueux chaud des graines est administré oralement pour prévenir les maladies du foie. Shan et Sheng (1980) ont observé une augmentation de la production de soie chez le ver à soie *Bombyx mori* après application d'un extrait aqueux de *Cassia tora*. Dans cette étude, nous avons isolé, dans les parties aériennes de *Cassia tora* avant la maturation des gousses, diverses substances qui ont été appliquées sur quatre races pures et deux hybrides du ver à soie *Bombyx mori*. Les résultats sont décrits ici.

MATERIELS ET METHODES

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil de point de fusion S.L. 152 et ne sont pas corrigés. Les spectres UV ont été réalisés sur un spectrophotomètre Hitachi UV 320. Les spectres ¹H et ¹³C-NMR ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Jeol FX-90Q avec un TMS comme standard interne. Les spectres de masse ont été obtenus sur un spectrophotomètre de masse JMS-D 300.

La partie aérienne de *Cassia tora* a été prélevée au mois d'août avant la maturation des gousses. Le matériel végétal a été séché, pulvérisé et extrait avec du méthanol aqueux à 50 % dans un appareil de Soxhlet. Le solvant a été éliminé de l'extrait sous vide afin de laisser un résidu qui a été dilué avec de l'eau, fractionné successivement avec du chloroforme, de l'acétate éthylique et du n-butanol et concentré sous vide pour obtenir le résidu. L'extrait de chloroforme déposé sur une colonne de gel

de silice (60-120 mailles) a donné deux composés, A et B, dans de l'éther de pétrole (60-80°) et de l'acétate éthylique afin d'augmenter leur polarité. De même, l'extrait d'acétate éthylique chromatographié sur colonne de gel de silice (60-120 mailles) a donné un composé, C, par élution avec du chloroforme-acétate éthylique et du méthanol. L'extrait n-butanolique, chromatographié à répétition sur gel de silice (60-120 mailles), a donné quatre composés : D, E, F et G.

Composé A (rendement : 0,15 %), point de fusion 87 °C : il s'agit de triacontanol d'après les données spectrales, le TLC et la détermination du point de fusion mélangé à un échantillon témoin (Kazushiro et coll., 1980).

Composé B (rendement : 0,05 %), point de fusion 136 °C : il s'agit de β -sitostérol d'après les données spectrales, le TLC et la détermination du point de fusion mélangé avec du matériel authentique (Osman et coll., 1975).

Composé C (rendement : 0,001 %), point de fusion 196 °C : il s'agit de chrysophanol après comparaison avec les données spectrales décrites dans la documentation (Acharya et coll., 1975).

Composé D (rendement : 0,001 %), point de fusion 284 °C, il s'agit de β -sitostérol-D-glucopyranoside d'après les données spectrales. Après hydrolyse d'acide, il produit du β -sitostérol et du D-glucose.

Composé E (rendement : 0,0009 %), point de fusion 248-249 °C : il s'agit de chrysophanol-1-O- β -D-glucopyranoside d'après les données spectrales et l'étude des produits hydrolysés (Wong et coll., 1989).

Composé F (rendement : 0,0002 %) : il s'agit de kaempférol-3-O-rutinoside d'après les produits hydrolysés et la comparaison des données spectrales ¹H-NMR, UV, MS de l'aglycone avec les valeurs données dans la documentation (Kim et coll., 1992).

Composé G (rendement : 0,0006 %), point de fusion 222 °C : il s'agit de quercétine-7-O-rhamnoside d'après les produits hydrolysés et la comparaison des données spectrales ¹H-NMR, UV, MS de l'aglycone avec les données fournies dans la documentation (Mabry et coll., 1970).

Préparation et application des doses :

Les composés A, B, C, D, E, F et G ont tout d'abord été dissous dans de l'éthanol puis dans l'eau. Trois concentrations (3 μ g, 5 μ g et 7 μ g) ont été préparées et appliquées de manière topique sur le tergum abdominal des larves à l'aide d'un microapplicateur.

Animaux expérimentaux et méthodes d'application :

Des larves au cinquième âge de l'hybride RL₂₆ × RL₃₀ (RH 86) à la quatrième génération (isolé par le *Regional Research Laboratory*, Jammu) et des races NB7, NB4D2, SH6 et KA (races du *Central Silk Board*) ont été utilisées dans ces expériences. Les larves ont été élevées sur feuilles de mûrier sur des claies en bois en laboratoire à 23 ± 1 °C et 70 % d'humidité relative. Les animaux destinés aux expériences, de taille et de poids identiques, ont été prélevés après la quatrième ecdysis. Pour chaque composé, douze lots d'animaux ont été prélevés ; chaque lot a été répété trois fois, avec cinquante animaux par répétition. Dans la première expérience, une dose de 5 μ g de chacun des composés a été administrée à 48 h et 72 h séparément. De plus, des doses répétées à 24 h, 24 h et 48 h d'intervalle ont été administrées chez l'un des traitements avec de l'extrait n-butanolique à raison de 0,01 μ g/larve, 0,1 μ g/larve et 5 μ g/larve respectivement au troisième, quatrième et cinquième âge. Dans la deuxième expérience, trois doses différentes (3 μ g/larve, 5 μ g/larve et 7 μ g/larve) ont été administrées à 48 h, 72 h et 96 h d'intervalle chez des larves du cinquième âge de la race NB7. Dans la troisième expérience, trois races différentes (NB4D2, SH6 et KA) ont été traitées avec une dose de 4 μ g/larve à un moment déterminé du traitement, à savoir : 72 h au cinquième âge.

RESULTATS

Les résultats de l'application de six composés (chrysophanol, chrysophanol-1-O- β -D-glucoside, extrait n-butanol, β -sitostérol-3-O-glucoside, kaempférol-3-O-rutinoside et

quercétine-7-O-rhamnoside) sont présentés dans les tableaux I, II et III. La lecture des tableaux révèle que le moment de l'application et les doses testées sont fortement significatifs pour ce qui concerne le poids du cocon, le poids de la chrysalide, le poids de la coque, la richesse soyeuse, l'augmentation du rendement en soie et la diminution de la période larvaire chez les races traitées avec les différents composés.

Poids du cocon :

Le tableau I montre clairement que le poids du cocon est maximal avec l'extrait de butanol, à savoir 2,173 g pour la dose unique et 2,178 g pour les doses répétées, contre 1,809 g seulement chez le témoin. Comme le montre le tableau I, pour la plupart des composés testés, le poids du cocon augmente chez les larves traitées avec des doses fixes de 5 µg/larve à 48 et 72 h. Par ailleurs, l'application de doses répétées d'extrait de butanol à 0,01 µg, 0,1 µg et 5 µg aux troisième, quatrième et cinquième âges respectivement à 24 h, 24 h et 48 h donne le poids le plus élevé (2,178 g). Dans une autre expérience sur des lots traités à différents intervalles (48 h, 72 h et 96 h) avec des doses de 3 µg, 5 µg et 7 µg/larve, la dose de 7 µg/larve appliquée à 96 h donne le poids maximal (2,566 g).

On a également étudié l'effet de l'extrait butanolique appliqué en une seule dose de 4 µg/larve à 72 h en fonction des races chez trois variétés (NB₄, SH₆ et KA). La race NB₄D₂ donne le poids du cocon maximal (2,630 g), comme le montrent le tableau II.

Poids nymphal :

Pour ce qui concerne l'effet des différents composés, le poids nymphal maximal (1,48 g) est obtenu avec la quercétine-7-O-rhamnoside et le chrysophanol appliqués à raison de 5 µg/larve (Tableau I). En revanche, pour ce qui concerne les différences entre les races, l'augmentation du poids est plus élevée chez KA (6,80 % d'augmentation par rapport au témoin) (Tableau III).

Poids de la coque :

Le poids de la coque est maximal (0,760 g) avec l'application de doses répétées d'extrait butanolique et minimal (0,669 g) avec le chrysophanol (Tableau I). Chez les lots traités à 48 h, 72 h et 96 h avec des doses respectives de 3 µg, 5 µg et 7 µg/larve d'extrait de butanol, la dose de 3 µg/larve appliquée à 72 h donne 0,440 g de soie, ce qui est fortement significatif par rapport aux autres races (Tableau III).

Richesse soyeuse :

L'augmentation de la richesse soyeuse la plus significative est obtenue avec l'extrait butanolique appliqué à une dose de 3 µg/larve à 72 h au cinquième âge : elle est de 25,05 % contre 17,5 % et 18,32 % chez le témoin (Tableau II). Pour ce qui concerne les différences entre les races, NB₄D₂ donne l'effet maximal par rapport à SH₆ et KA (Tableau II). Par ailleurs, chez les lots traités avec l'extrait butanolique à trois concentrations différentes (3 µg, 5 µg et 7 µg respectivement à 48 h, 72 h et 96 h), la richesse soyeuse est maximale (21,7 %) avec la dose de 7 µg/larve à 48 h (Tableau II).

Période larvaire :

A la lecture des tableaux I, II et III, il est clair que tous les composés appliqués à différentes concentrations et à des moments différents chez différentes races donnent une réduction marquée de la période larvaire, c'est-à-dire une diminution de l'ingestion de nourriture. La diminution de la période larvaire est maximale chez le traitement II, c'est-à-dire avec la dose de 7 µg/larve à 48 h chez la race NB₇. La diminution de la période larvaire est dans ce cas de 1 jour et 5 heures.

DISCUSSION

Cette étude sur l'effet de différents composés, triacontanol, β -sitostérol, chrysophanol, β -sitostérol-3-O-glucoside, chrysophanol-1-O-glucoside, kaempférol-3-O-rutinoside et quercétine-7-O-rhamnoside, montre clairement que l'activité de ces composés est de type ecdysone. La diminution de la période larvaire enregistrée dans les différentes expériences varie de 1 h à 37 h.

Des observations similaires ont été faites par Shan et Sheng (1980) mais celles-ci étaient basées sur un extrait alcoolique brut et révélaient une réduction de 5 h. Cette différence d'activité de réduction de la période larvaire se reflète également dans notre étude. L'augmentation de 20 % obtenue pour le rendement en soie est tout à fait intéressante sur le plan commercial. Shan et Sheng (1980) ont obtenu des résultats similaires mais n'ont pas fourni le pourcentage d'augmentation du rendement en soie. L'effet faible des composés purs tels que le chrysophanol et d'autres est également dû au fait que l'extrait butanolique brut et la combinaison de tous les composés purs donne une augmentation plus importante du rendement en soie, comme le montre le tableau I. Ceci est dû à l'action synergique des composés combinés, c'est la raison pour laquelle l'extrait butanolique donne une augmentation de 20,25 % du rendement en soie contre 10,44 % pour le mélange de composés tels que le triacontanol, le β -sitostérol-glucoside et le kaempférol-3-O-rutinoside qui ne contiennent pas de chrysophanol ; en outre, il se peut que certains composés présents en quantités infimes n'aient pas pu être isolés. D'après Shan et Sheng (1980), les extraits végétaux sont utilisés à l'échelle commerciale en Chine. L'augmentation plus forte du rendement en soie obtenue avec des doses répétées a déjà été observée par Akai et coll. (1985) avec l'utilisation d'un analogue d'hormone juvénile, le méthoprène. Dans cette étude, l'action de doses répétées d'extrait de butanol est conforme aux résultats d'Akai et coll. (1985) qui ont observé une augmentation d'une fois et demie à deux fois du rendement en soie par rapport aux lots traités avec une seule dose.

Cette étude ouvre de nouvelles possibilités en sériciculture car on obtient, d'une part, une diminution de la durée larvaire, donc de la période de nourrissage, qui permet de réduire la main d'oeuvre et la consommation de nourriture et, d'autre part, une augmentation du rendement en soie. Jusqu'à présent, seules les hormones juvéniles étaient utilisées pour augmenter la production de soie ; ceci entraînait une augmentation de la période larvaire, donc une main d'oeuvre et un nourrissage supérieurs à la normale, l'augmentation du rendement en soie n'était donc pas significative sur le plan économique.

GENETICAL TRAITS OF COCOON QUALITY IN *ANTHERAEA MYLITTA* D.

A.A. SIDDIQUI*, M.K. SINHA & D.P. DASMOHAPTRA**

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, India.

Eight lines were crossed to three testers in a line $\times$ tester design. Non-additive effects were predominant for cocoon shell weight, percentage of cocoon shell weight, length of cocoon filament, reelability percentage of cocoon and qualitative reelability percentage of cocoon. However, additive effects were observed for size of cocoon filament. Among the lines studied, GF₃, RS, S₄ and S₁₇ proved to be good combiners for cocoon shell weight, percentage of cocoon shell weight, length of cocoon filament, size of cocoon filament, reelability percentage of cocoon and qualitative reelability percentage of cocoon. Most of the best combinations for different traits resulted from crosses among the parents with high $\times$ high, high $\times$ low and low $\times$ low general combining ability effects.

Keywords: Inheritance, overdominance, gene action, heterosis combining ability.

INTRODUCTION

The nature and magnitude of gene action have been studied in quantitative traits in the tasar silkworm, *A. mylitta* D. (Jolly *et al.*, 1969; Siddiqui *et al.*, 1988a, 1988b). But so far no work has been done on the qualitative traits in the species which produces silk fibre for quality fabric. However, some investigations were made for qualitative traits in *B. mori* L. (Hong *et al.*, 1988; Abaozhieva and Malinov, 1989; Grekov and Petkov, 1990). As the knowledge of combining ability, together with *per se* performance of the parents, hybrids and heterotic response helps the breeders in selecting suitable parents and hybrids for exploitation in systematic breeding programmes, the present investigation has been undertaken for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Eight female parents, namely, GE₁, GE₂, GF₃, N₁, N₂, L₈, S₄ and S₁₇, and three male parents, i.e., N₅, Raily and RS, were selected from the germplasm maintained at the Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi. The females were crossed with each of the males in a line $\times$ tester design. The rearing of 24 hybrids, 8 lines and 3 testers was conducted in a randomised block design with 4 replications during the commercial crop 1988-89. The number of larvae brushed from one disease-free laying was considered as one replication. Ten cocoons were selected randomly and subjected to reeling keeping constant reeling machine and reeler. The data were recorded in respect of cocoon shell weight, percentage of cocoon shell weight, length of cocoon filament, size of cocoon filament, reelability percentage of cocoon and qualitative reelability of cocoon. The reelability percentage of cocoon and qualitative reelability percentage of cocoon were worked out following the method of Krishnaswami *et al.* (1972).

Analysis of variance and general and specific combining ability (GCA, SCA) effects were estimated according to Kempthorne (1957). The average degree of dominance was computed by using

* Present address: Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, Kamrup, Assam, India.

** Regional Sericultural Research Station, Koraput, Orissa, India.

Table I. Average values of parents and hybrids for seven characters.

Tableau I. Valeurs moyennes des parents et des hybrides pour sept caractères.

Parents/ hybrids	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Percentage of cocoon shell wt.	Length of cocoon filament (m)	Size of cocoon filament	Cocoon reelability percentage	Cocoon qualitative reelability percentage
<i>Parents/ hybrides</i>	<i>Poids du cocoon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Titre de la bave</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Qualité du dévidage (%)</i>
Female parents / Parents femelles							
1. GE ₁	12.88	1.99	15.45	909.38	13.17	72.89	24.76
2. GE ₂	13.79	2.00	14.50	812.38	10.80	70.01	49.14
3. GF ₃	13.53	2.08	15.37	861.25	13.28	75.84	26.77
4. N ₁	12.36	1.81	14.64	850.25	10.97	70.70	34.02
5. N ₂	12.55	1.99	15.85	971.38	12.00	67.19	48.01
6. L ₈	13.42	2.10	15.65	887.13	11.21	70.77	25.48
7. S ₄	13.59	2.07	15.23	813.88	11.69	69.95	24.40
8. S ₁₇	12.87	1.92	14.92	669.87	13.80	74.24	17.78
Male parents / Parents mâles							
9. N ₅	12.26	1.90	15.50	878.75	14.04	71.40	46.53
10. Raily	12.91	2.02	15.65	878.13	9.07	71.67	20.73
11. RS	13.45	2.10	15.61	1000.75	13.80	80.90	50.37
Hybrids / Hybrides							
1 × 9	13.12	2.01	15.32	850.00	10.60	76.31	22.82
1 × 10	13.40	1.97	14.70	984.38	12.23	75.14	25.52
1 × 11	12.79	2.06	16.11	999.38	11.22	69.98	40.18
2 × 9	12.68	1.92	15.14	911.88	11.51	71.21	27.92
2 × 10	13.75	2.16	15.71	935.25	11.37	75.44	34.95
2 × 11	12.79	1.92	15.01	947.50	13.12	66.54	24.01
3 × 9	13.16	2.02	15.35	1054.38	11.60	76.54	32.98
3 × 10	13.19	2.03	15.39	1056.25	9.91	76.85	27.46
3 × 11	12.14	1.89	14.84	698.38	14.62	72.11	26.92
4 × 9	13.36	2.09	15.64	771.13	12.32	72.65	26.86
4 × 10	13.69	2.21	16.14	825.88	13.76	67.32	25.93
4 × 11	12.93	2.07	16.01	698.25	10.91	66.62	23.69
5 × 9	13.54	2.21	16.32	849.88	12.28	70.52	23.20
5 × 10	13.76	2.00	14.55	841.13	11.65	70.71	14.29
5 × 11	12.91	2.01	15.57	710.38	10.46	67.57	18.93
6 × 9	13.40	2.14	15.97	1038.13	12.74	75.30	22.69
6 × 10	13.23	1.96	14.93	971.50	12.12	76.21	25.14
6 × 11	12.64	1.98	15.66	728.13	13.56	73.71	20.34
7 × 9	12.98	2.01	15.49	631.75	15.10	76.05	38.94
7 × 10	13.72	2.20	16.03	935.00	13.88	75.79	29.29
7 × 11	12.55	2.07	16.49	803.25	11.64	62.61	21.91
8 × 9	13.55	2.16	15.94	1110.50	15.49	70.00	36.31
8 × 10	14.06	2.26	16.07	917.50	12.18	71.06	36.67
8 × 11	13.45	2.01	14.94	895.13	12.30	70.90	21.44
Range	12.26-	1.81-	14.50-	631.75-	9.07-	66.54-	14.29-
Fourchette	14.06	2.26	16.49	1110.50	15.49	76.85	50.37
Mean / Moyenne	13.17	2.04	15.48	877.09	12.62	72.08	28.75

the formula of Kempthorne and Cumow (1961). Estimates of heterosis over mid and better parents (MP, BP) were worked out.

RESULTS AND DISCUSSION

The average values, range and mean for the seven qualitative characters of parents and hybrids are presented in Table I.

The analysis of variance showed significant differences among the genotypes for all the six characters (Table II). The ANOVA for combining ability for all the traits is presented in Table III. Variation due lines showed significant differences for percentage of cocoon shell weight, length of cocoon filament and reelability percentage whereas variation due to testers was significant only for length of cocoon filament. The interaction between lines and testers was significant for length of cocoon filament, reelability percentage of cocoon and qualitative reelability percentage of cocoon.

Table II. Analysis of variance for six characters in *A. mylitta*.

Tableau II. Analyse de variance pour six caractères chez *A. mylitta*.

Source of variation	Degree of freedom	Mean sum of squares					
		Cocoon shell weight	Percentage of cocoon shell wt.	Length of cocoon filament	Size of cocoon filament	Cocoon reelability percentage	Cocoon qualitative reelability percentage
Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés moyens					
		Poids de la coque	Richesse soyeuse	Longueur de la have	Titre de la have	Dévidabilité	Qualité du dévidage
Replication / Répétitions	3	0.05	1.07	7520.27	2.48	5.83	4.01
Treatment / Traitement	34	0.24**	3.95	55032.04**	8.69**	57.01**	348.69**
Line / Lignée	7	0.18**	2.81**	52355.79**	8.98**	57.02**	214.31**
Testers / Témoins	2	0.15**	3.65*	34614.89**	27.11**	79.50**	515.25**
Line × testers / Lignée × témoins	14	0.20**	2.60**	54534.90**	8.47**	60.16**	134.24**
Error / Ecart	102	0.05	0.95	8302.42	2.97	18.03	28.64

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

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

The ratio of δ^2A/δ^2D (Table III) for cocoon shell weight, length of cocoon filament, reelability percentage of cocoon and qualitative reelability percentage of cocoon indicated the predominant role of non-additive gene action in the inheritance of these traits, whereas the ratio δ^2A/δ^2D revealed that the trait size of cocoon filament was under the control of additive gene action. The degree of dominance ($\delta^2D/\delta^2A^{0.5}$) was in the range of overdominance (> 1) for cocoon shell weight, percentage of cocoon shell weight, length of cocoon filament and qualitative reelability percentage of cocoon. Abaozhieva and Malinov (1989) reported that inheritance of cocoon weight, cocoon shell weight and silk thread weight was overdominant whereas length of thread was inherited additively in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

The contribution of lines to the total sum of squares due to hybrids was higher than the testers and line $\times$ tester interaction only for the percentage of cocoon shell weight. The higher contribution of line $\times$ tester interaction than either lines or testers for cocoon shell weight, length of cocoon filament, size of cocoon filament, reelability percentage of cocoon denotes the higher estimates of variance due to SCA.

Table III. Estimates of variance due to combining ability effects, genetic components and contribution to hybrids (%).

Tableau III. Estimation de la variance due aux effets de la capacité combinatoire, des composants génétiques et de la contribution chez les hybrides (%).

Variance/ genetic components	Cocoon shell weight	Percentage of cocoon shell wt.	Length of cocoon filament	Size of cocoon filament	Cocoon reelability percentage	Cocoon qualitative reelability percentage
<i>Variance/ composants génétiques</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Longueur de la bave</i>	<i>Titre de la bave</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Qualité du dévidage</i>
GCA(lines / lignées)	0.04	0.12	691.87	0.25	1.50	2.39
GCA(testers / témoins)	0.02	0.05	259.45	0.09	0.56	0.89
SCA	0.03	0.36	2075.61	0.74	4.51	7.16
$\delta^2 A / \delta^2 D$	0.22	0.37	0.62	1.10	0.07	0.79
$\delta^2 D / \delta^2 A^{0.5}$	4.57	1.65	1.27	0.95	3.78	1.26
Contribution to hybrids / Contributions chez les hybrides (%)						
Due to line / Due aux lignées	30.20	48.54	23.50	25.23	28.50	34.02
Due to testers / Due aux témoins	11.42	8.64	27.53	28.01	11.35	23.37
Due to line $\times$ testers	58.32	42.52	48.97	46.76	60.15	42.81
<i>Due aux lignées $\times$ témoins</i>						

GCA: General combining ability / Capacité combinatoire générale.

SCA: Specific combining ability / Capacité combinatoire spécifique.

The GCA effects of the parents are presented in Table IV. The parents that proved to be good general combiners on the basis of their desirable GCA effects and *per se* performance for specific traits were N₂, GF₃, S₄ and RS for cocoon shell weight; N₂ and GF₃ for percentage of cocoon shell weight; L₈, Raily, S₄ and S₁₇ for length of cocoon filament; S₁₇, GE₁, GE₂, Raily and RS for reelability percentage of cocoon; RS, N₅, GF₃, S₄ and S₁₇ for qualitative reelability percentage of cocoon and these may be used for hybridisation for obtaining desirable segregates. Hong *et al.* (1988) also reported high GCA effects for cocoon shell weight and raw silk percentage on Eunbackjam mulberry silkworm variety.

The SCA effects and heterosis over mid-parent and better parent are presented in Tables V and VI. Desirable SCA alone is of no practical value unless the *per se* performance of the hybrids exceeds the mid parent and better parent. Hence, the hybrids were judged on the basis of their *per se* SCA effects and heterotic response for cocoon shell weight and its other components. Some crosses had higher *per se* performance and SCA effects but negligible and negative heterosis of mid parent

and better parent. Some crosses had poor *per se* performance but exhibited higher SCA and heterosis over mid and better parents. The crosses found best on the basis of the *per se* performance, SCA effects and heterotic response were $GF_3 \times Raily$, $N_1 \times RS$, $N_2 \times N_5$, $N_2 \times Raily$, $L_8 \times RS$, $S_4 \times RS$ and $S_{17} \times Raily$ for cocoon shell weight; $GF_3 \times N_5$, $GF_3 \times Raily$, $N_1 \times RS$, $N_2 \times RS$, $S_4 \times RS$ and $S_{17} \times Raily$ for percentage of cocoon shell weight; $GE_1 \times RS$, $GE_2 \times N_5$, $GE_3 \times N_5$, $N_1 \times RS$, $L_8 \times N_5$, $S_4 \times RS$, $S_{17} \times N_5$ and $S_{17} \times Raily$ for length of cocoon filament; $GE_1 \times Raily$, $GF_3 \times RS$, $N_1 \times RS$, $L_8 \times N_5$ and $L_8 \times RS$ for size of cocoon filament; $GE_1 \times RS$, $GF_3 \times RS$, $N_2 \times N_5$, $S_4 \times N_5$ and $S_{17} \times Raily$ for reelability percentage of cocoon and $GE_1 \times N_5$ and $S_{17} \times RS$ for qualitative reelability percentage of cocoon.

Table IV. Estimates of general combining ability effects for six characters.

Tableau IV. Estimation des effets de la capacité combinatoire générale pour six caractères.

Progenies	Cocoon shell weight	Percentage of cocoon shell wt.	Length of cocoon filament	Size of cocoon filament	Cocoon reelability percentage	Cocoon qualitative reelability percentage
Descendants	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Longueur de la bave	Titre de la bave	Dévidabilité	Qualité du dévidage
Lines / Lignées						
1. GE_1	-0.10	-0.46	-41.91	0.01	2.91**	-2.48
2. GE_2	-0.05	-0.21	-53.99	0.34*	1.87*	-3.23
3. GF_3	0.04**	0.36*	-62.87	1.00**	0.85	7.67**
4. N_1	0.01	0.22	-33.49	-0.26	-0.76	-0.48
5. N_2	0.09**	0.54*	-19.08	-0.59	-2.44	-0.76
6. L_8	0.02	-0.56	84.51**	1.06**	-2.88	-5.90
7. S_4	0.04**	0.15	12.21	-0.94	-0.24	2.08*
8. S_{17}	0.004	-0.05	114.63**	-0.71	2.39**	3.09**
Testers / Témoins						
9. N_5	-0.05	-0.22	-77.73	0.91**	1.54**	2.07**
10. $Raily$	0.02	0.12	85.51**	-0.02	1.61**	-4.63
11. RS	0.03**	0.09	-7.78	0.93**	0.08	2.55**

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

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

A comparison of the SCA effects of the crosses with GCA effects of the parents involved in the best four crosses for cocoon shell weight revealed that all the crosses showing high SCA effects had high $\times$ high ($S_4 \times RS$), low $\times$ high ($N_1 \times RS$, $L_8 \times RS$) and low $\times$ low ($GE_1 \times N_5$) combiners; likewise for percentage of cocoon shell weight the crosses showing high SCA effects had low $\times$ low combiners ($GE_1 \times N_5$, $L_8 \times Raily$) and high $\times$ low ($GF_3 \times N_5$); and for length of cocoon filament the crosses showing high SCA effects had low $\times$ low ($GE_1 \times RS$), high $\times$ low ($L_8 \times RS$, $S_4 \times Raily$) and high $\times$ high ($S_{17} \times Raily$) combiners. For size of cocoon filament, the crosses $GE_1 \times Raily$ and $S_{17} \times Raily$

showed low $\times$ low and $L_8 \times RS$ showed high $\times$ high. The crosses $GF_3 \times RS$ and $N_1 \times RS$ showed low $\times$ low and $N_2 \times N_5$, low $\times$ high combiners for reelability percentage of cocoon whereas the crosses $GE_2 \times Raily$ and $GE_1 \times Raily$ showed low $\times$ low; $N_2 \times N_5$, low $\times$ high; $S_{17} \times RS$, high $\times$ high combiners for qualitative reelability percentage of cocoon.

Table V. Estimates of specific combining ability effects for six characters.

Tableau V. Estimation des effets de la capacité combinatoire spécifique pour six caractères.

Crosses	Cocoon shell weight	Percentage of cocoon shell wt.	Length of cocoon filament	Size of cocoon filament	Cocoon reelability percentage	Cocoon qualitative reelability percentage
<i>Croisements</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Longueur de la bave</i>	<i>Titre de la bave</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Qualité du dévidage</i>
1 $\times$ 9	0.10	0.46**	-75.46	-0.93	-0.10	-4.22
1 $\times$ 10	-0.08	-0.28	-63.85	-2.19	-1.15	-6.59
1 $\times$ 11	-0.02	-0.18	139.32**	-1.25	-1.26	-2.37
2 $\times$ 9	0.002	-0.46	70.99*	0.44	-0.23	-0.76
2 $\times$ 10	0.06	0.19	20.98	-0.37	0.43	7.28**
2 $\times$ 11	-0.06	0.27	-91.97	-0.07	-0.20	-6.52
3 $\times$ 9	0.012*	0.42**	94.87**	-1.23	-2.67	3.29*
3 $\times$ 10	0.09**	0.16	84.60**	0.42	-2.19	4.56**
3 $\times$ 11	-0.11	-0.58	-179.47	0.82**	4.86**	1.27
4 $\times$ 9	-0.10	-0.33	-22.0	0.32	-1.54	-1.12
4 $\times$ 10	-0.02	0.08	-72.39	-1.18	2.97	1.35
4 $\times$ 11	0.11**	0.24	91.40**	0.86**	4.51**	-0.23
5 $\times$ 9	0.06	-0.45	-13.05	0.52	4.38**	6.19**
5 $\times$ 10	0.04	0.11	64.81*	0.53*	2.61*	1.14
5 $\times$ 11	-0.10	0.34**	-51.77	-1.05	-6.99	-7.33
6 $\times$ 9	-0.06	0.34**	-104.38	0.62*	-4.08	0.40
6 $\times$ 10	-0.04	-0.50	-47.52	-1.76	3.24*	-2.62
6 $\times$ 11	0.10**	0.16	151.90**	1.14*	0.85	2.22*
7 $\times$ 9	-0.03	-0.13	74.79*	1.10*	3.28*	1.38
7 $\times$ 10	-0.11	-0.19	105.98**	-0.94	-2.54	-5.97
7 $\times$ 11	0.14**	0.31**	31.19*	-0.16	-0.74	4.54**
8 $\times$ 9	0.02	0.15	25.76*	-0.83	0.96	-5.15
8 $\times$ 10	0.06	0.42**	119.35**	1.10*	2.57*	-3.21
8 $\times$ 11	0.07	-0.57	-93.60	-0.28	3.53*	8.36**

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

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

Table VI. Heterosis over mid parent (MP) and better parent (BP) for six characters.

Tableau VI. Hétérosis par rapport au parent moyen (MP) et au meilleur parent (BP) pour six caractères.

Crosses	Cocoon shell weight		Percentage of cocoon shell wt.		Length of cocoon filament		Size of cocoon filament		Cocoon reelability percentage		Cocoon qualitative reelability percentage	
Croisements	Poids de la coque		Richesse soyeuse		Longueur de la bruy		Titre de la bave		Dévidabilité		Qualité du dévidage	
	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP	MP	BP
1 × 9	3.15	0.60	-0.91	-1.18	-4.93	-6.53	-22.09	-24.52	5.77*	4.70*	-35.99	-50.91
1 × 10	-5.68	-6.20	-4.37	-4.96	-21.86	-23.20	31.46**	10.97*	0.23	-1.06	18.32*	8.72*
1 × 11	-4.27	-6.80	-3.77	-3.24	1.72	6.80*	-10.10	-12.08	-0.89	-5.79	-33.07	-50.08
2 × 9	1.16	-1.24	-2.73	-4.96	16.42*	12.02*	-1.56	-12.95	6.27*	5.23*	-46.64	-48.06
2 × 10	4.24*	3.62	3.57*	-0.29	-8.72	-12.19	24.07**	14.13*	2.55*	1.37	-23.10	-45.33
2 × 11	-3.24	-5.85	3.99*	2.54*	-19.68	-27.24	10.25*	1.75	-2.32	-8.89	-59.32	-59.82
3 × 9	3.46	-1.11	4.44*	4.45*	14.87*	13.73*	-17.89	-20.12	-4.94	-7.72	10.14*	-13.66
3 × 10	7.76*	9.42*	4.00*	3.09*	5.04	-5.95	23.14*	3.60	-8.72	-11.23	9.20*	-3.12
3 × 11	-3.71	-4.28	-0.86	-0.03	-32.14	-36.87	11.54*	9.44*	2.96*	-5.99	0.96	-22.69
4 × 9	3.78*	1.32	1.21	-1.31	5.48*	3.77*	-8.01	-18.07	0.22	-0.27	-30.69	-40.01
4 × 10	8.25*	2.63	5.22*	1.71	-19.20	-20.54	8.56*	-0.59	-6.42	-7.04	-13.44	-30.36
4 × 11	12.73**	4.76*	6.21*	5.16*	1.03	-6.57	12.09*	0.60	-0.01	-16.31	-30.59	-41.86
5 × 9	11.01*	8.40*	1.11	-2.18	1.10	-3.72	-12.68	-19.07	8.87*	5.65*	-26.07	-27.21
5 × 10	10.18*	9.43*	3.68*	3.47*	-8.10	-12.51	16.57*	2.33	1.57	-1.61	-32.49	-51.67
5 × 11	1.10	-1.66	5.14*	4.86*	-18.54	-17.31	-9.75	-15.65	-15.44	-22.61	-55.47	-56.51
6 × 9	3.63	-8.02	-2.49	-2.96	7.31*	6.81*	3.91	-6.57	-6.39	-6.81	-33.31	-48.40
6 × 10	2.19	-0.25	-6.63	-7.00	-4.70	-4.20	14.87*	3.88	-0.71	-1.35	-38.13	-43.89
6 × 11	3.04	2.85	2.41	-2.74	17.65*	10.97*	23.83*	12.21*	-7.68	-13.47	-30.62	-47.77
7 × 9	1.77	2.42	0.11	-0.46	24.58*	19.99*	-9.82	-17.38	8.29*	7.19*	-7.02	-29.14
7 × 10	1.47	0.25	0.96	-0.48	-16.03	-19.10	0.77	-10.54	-4.57	-5.71	-16.10	-22.41
7 × 11	8.34*	7.37*	4.18*	2.75	1.12	-8.32	-4.45	-11.75	-5.78	-12.16	-1.92	-27.21
8 × 9	6.22*	5.46*	1.36	0.05	36.41**	20.20*	-28.82	-29.45	5.53*	3.52	-14.60	-40.99
8 × 10	8.57*	6.10*	4.37*	2.13	34.12**	18.22*	11.44*	-7.66	3.22*	1.44	17.88*	9.56*
8 × 11	0.00	-4.28	2.13	-4.18	7.16*	-10.55	-10.84	-10.85	-8.59	-12.36	21.63*	-17.72

* Significant at 5% / Significatif au seuil de 5 %. ** Significant at 1% / Significatif au seuil de 1 %.

The crosses with high SCA effects revealed dominance $\times$ dominance types of gene interaction and crosses having high SCA effects involving high $\times$ high combiners indicated additive $\times$ additive types of gene interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr N.D. Banarjee, SRO, Reeling and Spinning, for providing facilities for reeling of cocoons and Mr A.K. Goel, Statistician, for data analysis.

REFERENCES

- ABAOZHIEVA R., MALINOV K. (1989) Mode of inheritance and heterosis effects in some silkworm (*Bombyx mori*) crosses. Genet. Sel., 22(5), 435-440.
- GREKOV D., PETKOV N. (1990) Correlation between some traits and possibilities for prognostication heterosis of F_1 crosses on hybridization of *Bombyx mori* L. Zhivotnov'd Nauki, 27(2), 80-85.
- HONG K.W., SOHN K.W., RYU K.S., KIM K.S., LEE S.P., CHOL S.R., HWANG S.J., KIM K.Y., KNOW Y.H. (1988) Breeding of Eunbackjam, a new high silk-yielding silkworm variety of summer and autumn rearing. Res. Rep. Rural Dev. Admn. (Suweon), 30(3), 119-124.
- JOLLY M.S., BARDAIYAR V.N., NARASIMHANNA M.N., RAJDAN J.L. (1969) Diallel cross analysis of quantitative characters of four races of Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Indian J. Seric., 8, 25-33.
- KEMPTHORNE O. (1957) An Introduction to Genetical Statistics. John Wiley and Sons, Inc., London.
- KEMPTHORNE O., CURNOW R.N. (1961) The partial diallel cross. Biometrics, 17, 229-250.
- KRISHNASWAMI S., MADHAVARAO N.R., SURYANARAYAN S.K., SUNDERMURTHY T.S. (1972). Manual of Sericulture. FAO, Rome, 3, 19-20.
- SIDDIQUI A.A., SENGUPTA A.K., KUMAR A., MOHAPATRA D.P.D., SENGUPTA K. (1988a) Studies on the genetic architecture and gene action involving yield and yield components in diallel populations of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Sericologia, 28(1), 107-113.
- SIDDIQUI A.A., SENGUPTA A.K., DASMOHAPATRA D.P., KUMAR A., SENGUPTA K. (1988b) Genetic analysis of yield and yield components in *Antheraea mylitta* Drury. Indian J. Seric., 27(2), 78-84.

CARACTERES GENETIQUES DE QUALITE DES COCONS CHEZ *ANTHERAEA MYLITTA* D.

A.A. SIDDIQUI*, M.K. SINHA & D.P. DASMOHAPTRA**

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

Huit lignées ont été croisées avec trois témoins selon un schéma lignée × témoins. Les effets non additifs sont prédominants pour le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur de la bave, le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage du cocon. Cependant, on observe des effets additifs pour le diamètre de la bave. Parmi les lignées considérées, GF₃, RS, S₄ et S₁₇ s'avèrent être de bons combineurs pour le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur de la bave, le titre de la bave, le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage du cocon. La plupart des meilleures combinaisons pour les différents caractères proviennent de croisements entre des parents possédant des effets de capacité combinatoire générale élevés × élevés, élevés × faibles et faibles × faibles.

INTRODUCTION

La nature et l'amplitude des actions des gènes sur les caractères quantitatifs ont été étudiées chez le ver à soie tasar *A. mylitta* (Jolly et coll., 1969 ; Siddiqui et coll., 1988a, 1988b). Mais aucune étude n'a encore été effectuée sur les qualités du cocon de cette espèce qui produit de la fibre de soie pour tissus de qualité. Cependant, quelques travaux ont été réalisés sur les caractères qualitatifs de *B. mori* L. (Hong et coll., 1988 ; Abaozhieva et Malinov, 1989 ; Grekov et Petkov, 1990). Nous avons entrepris cette étude car le fait de connaître la capacité combinatoire ainsi que la performance *per se* des parents, des hybrides et les réaction hétérotiques permet de sélectionner des parents et des hybrides adaptés lors de la mise au point de programmes de sélection systématiques.

MATERIELS ET METHODES

On a sélectionné huit parents femelles, à savoir GE₁, GE₂, GF₃, N₁, N₂, L₈, S₄ et S₁₇, et trois parents mâles, N₅, Raily et RS, de la banque génétique du *Central Tasar Research and Training Institute* de Ranchi. Les femelles ont été croisées avec chacun des mâles selon le schéma lignée × témoin. L'élevage des 24 hybrides, des huit lignées et des trois témoins a été réalisé selon la méthode des blocs aléatoires et répété quatre fois au cours de l'élevage commercial de 1988-89. Chaque répétition est composée du nombre de larves levées pour une ponte saine. Dix cocons ont été prélevés au hasard et dévidés en utilisant la même bassine de dévidage et le même tireur de soie. Les données portent sur le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur de la bave, le titre de la bave, le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage. Le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage ont été déterminés suivant la méthode de Krishnaswami et coll. (1972).

L'analyse de variance et les effets de la capacité combinatoire générale (GCA) et spécifique (SCA) ont été estimés d'après la méthode de Kempthorne (1957). Le degré moyen de dominance a

* Adresse actuelle : Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, Kamrup, Assam, Inde.

** Regional Sericultural Research Station, Koraput, Orissa, Inde.

été calculé d'après la formule de Kempthorne et Curnow (1961). L'hétérosis par rapport aux parents moyens et aux meilleurs parents a été estimée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs, les fourchettes et les moyennes obtenues pour les sept caractères qualitatifs chez les parents et les hybrides sont présentées dans le tableau I.

L'analyse de variance fait apparaître des différences significatives entre les génotypes pour les six caractères (Tableau II). L'analyse de variance pour la capacité combinatoire et pour tous les caractères est présentée dans le tableau III. La variation due aux lignées fait apparaître des différences significatives pour ce qui concerne le poids de la coque, la longueur de la bave et le pourcentage de dévidabilité tandis que la variation due aux témoins est significative uniquement pour la longueur de la bave. L'interaction entre les lignées et les témoins est significative pour la longueur de la bave, le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage du cocon.

Le rapport $\delta^2 A / \delta^2 D$ (Tableau III) obtenu pour le poids de la coque, la longueur de la bave, le pourcentage de dévidabilité et le pourcentage de qualité du dévidage indique que les gènes non additifs jouent un rôle prédominant dans la transmission héréditaire de ces caractères et que le titre de la bave est contrôlé par des gènes additifs. Le degré de dominance ($\delta^2 D / \delta^2 A^{0.5}$) est de type surdominant (> 1) pour le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur de la bave et le pourcentage de qualité du dévidage. Abaozhieva et Malinov (1989) ont observé que la transmission héréditaire du poids du cocon, du poids de la coque et du poids du fil de soie est surdominante tandis que la longueur du fil est héritée de façon additive chez le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L.

La contribution des lignées à la somme totale des carrés due aux hybrides est supérieure à celle obtenue pour les témoins et l'interaction lignée $\times$ témoin uniquement pour ce qui concerne le poids de la coque. Le fait que la contribution de l'interaction lignée $\times$ témoin soit plus élevée que celle des lignées et des témoins pour le poids de la coque, la longueur de la bave, le titre de la bave et le pourcentage de dévidabilité des cocons dénote des estimations supérieures de la variance due à la SCA.

Les effets de la SCA des parents sont présentés dans le tableau IV. Les parents qui, d'après leurs effets SCA intéressants et leur performance *per se* pour les caractères spécifiques, s'avèrent être de bons combineurs généraux sont : N₂, GF₃, S₄ et RS pour le poids de la coque, N₂ et GF₃ pour la richesse soyeuse, L₈, Raily, S₄ et S₁₇ pour la longueur de la bave, S₁₇, GE₁, GE₂, Raily et RS pour le pourcentage de dévidabilité et RS, N₅, GF₃, S₄ et S₁₇ pour le pourcentage de qualité du dévidage ; ils peuvent donc être utilisés pour hybridation afin d'obtenir des ségrégues intéressants. Hong et coll. (1988) ont également observé des effets SCA élevés pour le poids de la coque et le pourcentage de soie grège chez le ver à soie du mûrier, variété Eunbackjam.

Les effets SCA et l'hétérosis par rapport aux parents moyens et aux meilleurs parents sont présentés dans les tableaux V et VI. Une bonne SCA n'a, en elle-même, aucune valeur pratique sauf si la performance *per se* des hybrides dépasse celle des parents moyens et des meilleurs parents. Les hybrides ont donc été jugés sur la base de leurs effets SCA *per se* et de leur réaction hétérotique pour la richesse soyeuse du cocon et de ses autres composants. Certains croisements donnent une performance *per se* et des effets SCA supérieurs mais une hétérosis négligeable et négative par rapport aux parents moyens et aux meilleurs parents. Certains croisements donnent une performance *per se* médiocre mais des effets SCA et une hétérosis élevés par rapport aux parents moyens et aux meilleurs parents. Les croisements donnant les meilleurs résultats sur le plan de la performance *per se*, des effets SCA et de la réponse hétérotique sont : GF₃ $\times$ Raily, N₁ $\times$ RS, N₂ $\times$ N₅, N₂ $\times$ Raily, L₈ $\times$ RS, S₄ $\times$ RS et S₁₇ $\times$ Raily pour le poids de la coque, GF₃ $\times$ N₅, GF₃ $\times$ Raily, N₁ $\times$ RS, N₂ $\times$ RS, S₄ $\times$ RS et S₁₇ $\times$ Raily pour la richesse soyeuse, GE₁ $\times$ RS, GE₂ $\times$ N₅, GE₃ $\times$ N₅, N₁ $\times$ RS, L₈ $\times$ N₅, S₄ $\times$ RS, S₁₇ $\times$ N₅ et S₁₇ $\times$ Raily pour la longueur de la bave, GE₁ $\times$ Raily, GF₃ $\times$ RS, N₁ $\times$ RS, L₈ $\times$ N₅ et L₈ $\times$ RS.

RS pour le titre de la bave, GE₁ $\times$ RS, GF₃ $\times$ RS, N₂ $\times$ N₅, S₄ $\times$ N₅ et S₁₇ $\times$ Raily pour le pourcentage de dévidabilité et GE₁ $\times$ N₅ et S₁₇ $\times$ RS pour le pourcentage de qualité du dévidage du cocon.

La comparaison des effets SCA des croisements avec les effets GCA des parents utilisés dans les quatre meilleurs croisements pour le poids de la coque révèle que tous les croisements présentant des effets SCA élevés sont issus de combineurs élevé $\times$ élevé ($S_4 \times RS$), faible $\times$ élevé ($N_1 \times RS$, $L_8 \times RS$) et faible $\times$ faible ($GE_1 \times N_5$) ; de même, pour ce qui concerne la richesse soyeuse, les croisements présentant des effets SCA élevés sont issus de combineurs faible $\times$ faible ($GE_1 \times N_5$, $L_8 \times Raily$) et élevé $\times$ faible ($GF_3 \times N_5$) et, pour ce qui concerne la longueur de la bave, les croisements présentant des effets SCA élevés sont issus de combineurs faible $\times$ faible ($GE_1 \times RS$), élevé $\times$ faible ($L_8 \times RS$, $S_4 \times Raily$) et élevé $\times$ élevé ($S_{17} \times Raily$). Pour ce qui concerne le titre de la bave, les croisements $GE_1 \times Raily$ et $S_{17} \times Raily$ donnent faible $\times$ faible et $L_8 \times RS$ donne élevé $\times$ élevé. Les croisements $GF_3 \times RS$ et $N_1 \times RS$ sont des combinaisons faible $\times$ faible et $N_2 \times N_5$ sont des combinaisons faible $\times$ élevé pour le pourcentage de dévidabilité, tandis que les croisements $GE_2 \times Raily$ et $GE_1 \times Raily$ sont du type faible $\times$ faible, $N_2 \times N_5$ est du type faible $\times$ élevé et $S_{17} \times RS$ est du type élevé $\times$ élevé pour le pourcentage de qualité du dévidage.

Les croisements présentant des effets SCA élevés révèlent une interaction de gènes de type dominance $\times$ dominance et les croisement présentant des effets SCA élevés et issus de parents élevé $\times$ élevé dénotent une interaction de gènes de type additif $\times$ additif.

EFFECT OF INOCULATION WITH *ACAULOSPORA LAEVIS*, *BACILLUS MEGATHERIUM* VAR. *PHOSPHATICUM* AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* USING TWO SOURCES OF PHOSPHORUS ON THE GROWTH AND LEAF YIELD OF MULBERRY

D.S. CHANDRASHEKAR*¹, H. SHEKAR SHETTY¹ & R.K. DATTA²

1. Department of Studies in Applied Botany, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore 570 006, India.
2. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

The vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (VAM), Acaulospora laevis, Bacillus megatherium var. phosphaticum and Azospirillum brasilense, in mutual symbiosis between microscopic soil fungi and roots of most terrestrial host plants are able to take and translocate phosphate (P) to the host by exploring the soil between the P-depleted rhizosphere. Azospirillum brasilense fixes atmospheric nitrogen in the soil, which in turn will be absorbed by the plant. The results of the field experiments conducted in alkaline soil showed that the treatment of combined inoculation of Bacillus megatherium var. phosphaticum + Azospirillum brasilense and Acaulospora laevis with single superphosphate application recorded a maximum leaf yield of 31075 kg/ha followed by the treatment of Bacillus megatherium var. phosphaticum + Acaulospora laevis + rock phosphate with 29630 kg/ha. The growth parameters improved in the above treatments compared to individual inoculation and control. The synergistic effect of these microorganisms are beneficial to the growth of mulberry.

Keywords: Mulberry, VAM, *Acaulospora*, *Bacillus*, *Azospirillum*, rock phosphate, single superphosphate.

INTRODUCTION

It is now a well established fact that vesicular arbuscular fungi (VAM) in symbiotic association with higher plants increase the growth and productivity (Tinker, 1978; Gianninazzi *et al.*, 1989, 1990). The symbiotic system of these fungi has to be exploited to save the costly phosphatic fertilisers (Abbott and Robson, 1982a, 1982b). According to Mosse (1973), 75% of the phosphorus applied to crops is not utilised by them but converted to forms unavailable to plants. It has been estimated that in soils of high pH a major portion of the fertiliser applied becomes unusable (fixed) via chemical reactions. The synergistic effect of free-living nitrogen-fixing bacteria, VAM fungi and phosphatic solubilisers have been investigated by many workers and their studies reveal that they cause improvement in plant growth (Barea *et al.*, 1973; Bagyaraj and Menge, 1978; Gaskins and Hubbel, 1979; Okon, 1982).

A field trial was undertaken to evaluate the synergistic effect of *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, *Acaulospora laevis* and *Azospirillum brasilense* on the growth and leaf yield of mulberry (*Morus alba* L.) in the black clayey soil of the Regional Sericultural Research Station, Salem (Tamil Nadu). Preliminary studies conducted in nursery experiments with different genera of VAM fungi and *Azospirillum brasilense* (unpublished) prompted the present work to utilise the best genera

* To whom correspondence should be addressed.

and strains as a source of biofertiliser for a large-scale trial with two forms of phosphorus, i.e., single superphosphate and rock phosphate.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was conducted in a medium, black clayey soil at the Regional Sericultural Research Station, Salem, under irrigated conditions during 1992-1993. A total of five crop harvests were carried out during this period. Rainfall during this period was 658 mm, the soil pH 9.3, electrical conductivity 0.045 mohms, organic carbon 0.68%, available N 300 kg/ha, available P 4 kg/ha and K 260 kg/ha. The soil samples were collected at 0, 30, 60 and 90 cm depths and assessed for organic carbon and available nitrogen by Jackson's (1958) method and for P by the method of Olseon *et al.* (1954). The experiment was laid out in a randomised block design with three replicates, in a plot size of 7 m × 5 m. The treatments were : T1, *Acaulospora laevis* + single superphosphate (SSP); T2, *Acaulospora laevis* + rock phosphate (RP); T3, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + SSP; T4, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + RP; T5, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + SSP; T6, *Bacillus megatherium* + *Acaulospora laevis* + RP; T7, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + SSP; T8, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + RP; T9, SSP (alone); T10, RP (alone). The recommended package of practices for mulberry cultivation of 300 kg N, 120 kg P and 120 kg K per hectare was followed for application in five split doses. The phosphatic fertiliser dosage was @ 120 kg/ha (in two split doses). The carrier-based (lignite) culture of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* obtained with a cell count of 1×10^9 cells/g from the Microbiology Department, Tamil Nadu Agricultural University, Regional Sericultural Station, Paiyur, were used in the trials. The cultures were bulked with farmyard manure or sterile soil @ 25 kg per packet of culture (200 g). The cultures of *Acaulospora laevis* were obtained with a spore load of 500 spores/100 g soil or as sand mixed with root bits of maize or pearl millet. The application was at the rate of 500 g/sq. m. The variety of mulberry was Kanva 2. The spacing adopted was 90 cm between rows and 90 cm between plants. Five plants were selected randomly from the replicates for the growth parameters and the leaf yield was recorded. The method of application of inoculants was by scooping the soil in the furrow to expose 2-3 cm all along and later covered by the soil. The inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* was done for each crop after leaf harvest or pruning. They were applied 10 days after the application of inorganic fertiliser so that the inoculum did not come in direct contact with the inorganic fertilisers.

The data were subjected to statistical analysis by the analysis of variance and the critical difference between the means was calculated at P 0.05 (Cochran and Cox, 1957).

RESULTS

The results (Table I) revealed that a marked increase in the leaf yield of combined inoculation treatment T7, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + single superphosphate, recorded a leaf yield of 31075 kg/ha and growth parameters like number of branches (10.0), length of branches (892.0 cm) and total number of leaves per plant (222.0) were recorded. This was followed by treatment T6, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + rock phosphate, which recorded 29630 kg/ha leaf yield and the corresponding growth observations like number of branches (9.0), length of branches (1786.0 cm) and number of leaves per plant (195.0) were recorded. The total biomass production in treatments T9, single superphosphate (alone), and T10, rock phosphate (alone), was significantly higher when compared to treatments T1, *Acaulospora laevis* + single superphosphate, with 23673 kg/ha and T2, *Acaulospora laevis* + rock phosphate, with 23340 kg/ha. The corresponding growth parameters were also lower than in T9 and T10 treatments. It was observed that VAM fungus alone with superphosphate was more effective than the rock phosphate treatment.

Table 1. Studies on the inoculation of *Acaulospora laevis*, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* and *Azospirillum brasilense* using two forms of phosphorus on the growth and leaf yield (kg/ha) of mulberry (*Morus alba* L.).

Tableau 1. Effet de l'inoculation d'*Acaulospora laevis*, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* et *Azospirillum brasilense* combinée avec deux formes de phosphore sur la croissance et le rendement en feuilles (kg/ha) du mûrier (*Morus alba* L.).

Treatment	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV	Crop V	Total of 5 crops	Number of branches	Length of branches per plant (cm)	Number of leaves
Traitement	1ère récolte	2e récolte	3e récolte	4e récolte	5e récolte	Total des 5 récoltes	Nombre de branches	Longueur des branches (cm)	Nombre de feuilles par plant
T1	4590	6615	4003	4120	4345	23673	8.0	563.3	178.3
T2	4223	6562	3824	4125	4606	23340	6.3	325.0	83.3
T3	6545	6517	3974	6055	6100	29191	6.6	744.0	185.0
T4	6132	6764	4412	5702	5652	28662	8.0	466.0	115.0
T5	6169	6751	4118	5577	6175	28790	8.0	636.0	158.0
T6	6294	6441	5343	5502	6050	29630	9.0	786.0	195.0
T7	5738	6673	5866	6100	6698	31075	10.0	892.0	222.0
T8	5272	7449	4223	5378	5478	27800	8.3	690.3	172.0
T9	6187	6030	4153	4780	5278	26428	8.6	772.0	192.0
T10	5236	5857	3988	4955	5104	25140	8.0	433.0	107.0
CD at 5%	NS	676	412	510	461	462	3.1	20.0	1.8

T1: *Acaulospora laevis* + single superphosphate / *A. laevis* + superphosphate simple.

T2: *Acaulospora laevis* + rock phosphate / *A. laevis* + phosphate de chaux naturel.

T3: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + single superphosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + superphosphate simple.

T4: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + rock phosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + phosphate de chaux naturel.

T5: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + single superphosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + *A. laevis* + superphosphate simple.

T6: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + rock phosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + *A. laevis* + phosphate de chaux naturel.

T7: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + single superphosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + *A. laevis* + *A. brasilense* + superphosphate simple.

T8: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + rock phosphate / *B. megatherium* var. *phosphaticum* + *A. laevis* + *A. brasilense* + phosphate de chaux naturel.

T9: Single superphosphate (alone) / Superphosphate simple (seul).

T10: Rock phosphate (alone) / phosphate de chaux naturel (seul).

DISCUSSION

Increased leaf yield, number of branches and length of branches may be attributed to the earlier reports wherein it is shown that the nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum* and *Azotobacteria* benefit inoculated plants by fixing atmospheric nitrogen (Cohen *et al.*, 1980; Dart and Wani, 1982; Okon, 1982; Berkum and Bohlool, 1980; Alagawadi and Gaur, 1988; Lin *et al.*, 1983). Krishna (1985)

emphasised the importance of rock phosphate as most suitable phosphorus nutrient which is utilised by mycorrhizal plants. By enhancing root formation and uptake by the growth hormones secreted, it is possible to increase availability of phosphorus to plants both from soil and added phosphate by establishing a large population of efficient P solubilisers/mobilisers in the root region (Brown, 1974; Tien *et al.*, 1979). The total biomass production and yield increased significantly due to combined inoculation of VAM fungi, *Phosphobacteria* and *Azospirillum brasilense*, which is superior to individual inoculation. The inclusion of *Azospirillum brasilense* in treatment T7 has contributed to the synergistic effect of the diazotroph with VAM fungi and phosphobacteria. The evolution of tripartite system (host-VAM-diazotroph) no doubt contributes significantly to the economy of phosphates and nitrogen in natural environments particularly in fertile areas (Tilak, 1993). VAM fungi stimulate plants for uptake of zinc, copper, sulphur, potassium and calcium although not as markedly as phosphorus mobilisation (Cooper and Tinker, 1978). Bolon *et al.* (1987) compared three P compounds differing in solubility (KH_2PO_4 , colloidal iron phosphate and crystalline iron phosphate) as sources of P to mycorrhizal infection: these were found to vary with different sources of P. The physical association between mycorrhizal fungi and organic matter (Warner, 1984) coupled with phosphate production by the fungus further suggests an active role of mycorrhiza in mineralisation of P (Dodd *et al.*, 1987). The probable explanation for the increased uptake by mycorrhizal plants is that the mycorrhiza explores the soil volume more thoroughly and so finds more of the point sources of P. Hence the present data are an evidence indicating the role of VAM fungi, *Phosphobacteria* and *Azospirillum*, as benefactor biofertilisers. Further, maximisation of leaf yield of mulberry per unit area can be increased with economically feasible proposition, tapping rock phosphate and single superphosphate.

REFERENCES

- ABBOTT L.K., ROBSON A.D. (1982a) The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Aust. J. Agri. Res.*, 33, 389-408.
- ABBOTT L.K., ROBSON A.D. (1982b) Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Aust. J. Agri. Res.*, 33, 1049-1059.
- ALAGAWADI A.R., GAUR A.C. (1988) Associative effect of rhizobium and phosphate-solubilising bacteria and their influence on yield and nutrient uptake of chickpea. *Plant Soil*, 105, 241-246.
- BAGYARAJ D.J., MENGE A. (1978) Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and the effects on the rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytol.*, 80, 567-570.
- BAREA J.M., BROWN M.E., MOSSE B. (1973) Association between VA-mycorrhiza and *Azotobacter*. *Rothmsted Exp. Sta. Ann. Rep.*, 1, 82-86.
- BERKUM P. van, BOHLOOL B.B. (1980) Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.*, 44, 491-517.
- BOLON N.S., ROBSON A.D., BARROW N.J. (1987) Effects of phosphorus application and mycorrhizal inoculation on root characteristics of sub clover and rye grass in relation to phosphorus uptake. *Plant Soil*, 104, 294-298.
- BROWN M.E. (1974) Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 12, 181-197.
- COCHORAN W.G., COX G.M. (1957) *Experimental designs*. Second Ed., New York, John Wiley and Sons, Inc.
- COHEN E., OKON Y., KIGEL J., NUR I., HENNIS Y. (1980) Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.*, 66, 746-749.
- DART P.J., WANI S.P. (1982) Non symbiotic nitrogen fixation and soil fertility. In *Non Symbiotic Nitrogen Fixation and Organic Matter in the Tropics*. Transactions of the 12th International Congress of Soil Science, New Delhi, 8-16 February, Symposia Papers, 1, 3-27.
- DODD J.C., BURTON C.C., BURNS R.G., JEFFERIES P. (1987) Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 107, 163-172.

- GASKINS M.H., HUBBEL D.H. (1979) Response of non leguminous plants to root inoculation with free living diazotrophic bacteria. *In* The Soil Root Interface. J.L. Harley and R.S. Russel eds., Academic Press, London, pp. 175-180.
- GIANNINAZZI S., TROUVELOT A., GIANNINAZZI-PEARSON V. (1989) Conceptual approaches in agriculture for the rational use of VA endomycorrhizae in agriculture possibilities and limitations. *Agri. Ecosys. Environ.*, 29, 153-161.
- GIANNINAZZI S., GIANNINAZZI-PEARSON V., TROUVELOT A. (1990) Potentialities and procedures for use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. *In* Biotechnology for Fungi for Improving Plant Growth. J.M. Whipps and B. Lumsden eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 41-54.
- JACKSON M.L. (1958) Soil chemical analysis Engle wood cliffs, N.J. Prentice Hall, Inc., pp. 151-153, 331-334.
- KRISHNA K.R. (1985) Vesicular arbuscular mycorrhiza for efficient use of fertilizer phosphorus. *Proc. Soil Biol. Symp.*, 167-177.
- LIN W., OKON Y., HARDY R.W.F. (1983) Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1775-1779.
- MOSSE B. (1973) Advances in the study of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15, 171-196.
- OKON Y. (1982) Recent progress in research on biological nitrogen fixation with non-leguminous crops. *Phosphorus Agric.*, 82, 3-8.
- OLSEON S.R., COLE U.V., WATANABE F.S., DEAN L.A. (1954) Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. United States Dept. of Agriculture, Circular No. 939.
- TILAK K.V.B.R. (1993) Associative effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae with nitrogen fixers. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.*, B59, No. 3&4, pp. 325-332.
- TIEN GASKINS M.H., HUBBEL D.M. (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1016-1024.
- TINKER P.B. (1978) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiol. Veg.*, 16, 743-749.
- WARNER A. (1984) Colonisation of organic matter by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans. British Mycol. Soc.*, 82, 352-353.

EFFET DE L'INOCULATION D'*ACAULOSPORA LAEVIS*, DE *BACILLUS MEGATHERIUM* VAR. *PHOSPHATICUM* ET D'*AZOSPIRILLUM BRASILENSE* COMBINÉE AVEC DEUX SOURCES DE PHOSPHORE SUR LA CROISSANCE ET LE RENDEMENT EN FEUILLES DU MURIER

D.S. CHANDRASHEKAR*¹, H. SHEKAR SHETTY¹ & R.K. DATTA²

1. Department of Studies in Applied Botany, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore 570 006, Inde.
2. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, Inde.

Les champignons mycorhizes arbusculaires vésiculaires (MAV) Acaulospora laevis, Bacillus megatherium var. *phosphaticum* et *Azospirillum brasilense* en symbiose avec les champignons microscopiques du sol et les racines de la plupart des plantes hôtes terrestres sont capables d'absorber et de transloquer le phosphate (P) vers l'hôte en explorant le sol de la rhizosphère lorsque le phosphate est épuisé. *Azospirillum brasilense* fixe, dans le sol, l'azote atmosphérique qui sera ensuite absorbé par la plante. Les résultats d'expériences réalisées en sol alcalin montrent que le traitement du sol avec une inoculation combinée de *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, d'*Azospirillum brasilense* et *Acaulospora laevis* avec une seule application de superphosphate donne un rendement en feuilles maximal de 31 075 kg/ha, devant le traitement *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + phosphate de chaux naturel, qui donne un rendement de 29 630 kg/ha. Ces traitements permettent d'améliorer les paramètres de croissance par rapport à l'inoculation individuelle et au témoin. L'effet synergique de ces micro-organismes favorise la croissance du mûrier.

INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que les champignons mycorhizes arbusculaires vésiculaires (MAV) en symbiose avec les plantes supérieures favorisent la croissance et la productivité (Tinker, 1978 ; Gianninazzi et coll., 1989, 1990). Le système symbiotique de ces champignons est exploité afin de réduire l'utilisation, onéreuse, des engrais phosphatés (Abbott et Robson, 1982a, 1982b). D'après Mosse (1973), 75 % du phosphore appliqué sur les cultures ne sont pas utilisés par celles-ci mais sont convertis sous des formes inutilisables par les plantes. On a estimé que, dans les sols à pH élevé, une proportion importante des engrais devient inutilisable (fixée) du fait des réactions chimiques. L'effet synergique des bactéries indépendantes qui fixent l'azote, des champignons MAV et des solubilisants phosphatés a été étudié par de nombreux chercheurs et leurs observations ont montré qu'ils favorisaient la croissance des plantes (Barea et coll., 1973 ; Bagyaraj et Menge, 1978 ; Gaskins et Hubbel, 1979 ; Okon, 1982).

Une expérience a été réalisée sur le terrain afin d'évaluer l'effet synergique de *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, *Acaulospora laevis* et *Azospirillum brasilense* sur la croissance et le rendement en feuilles du mûrier (*Morus alba* L.) dans le sol glaiseux noir de la *Regional Sericultural Research Station* de Salem (Tamil Nadu). Des expériences préliminaires (non publiées) réalisées en pépinière avec différents genres de champignons MAV et *Azospirillum brasilense* ont permis de

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

sélectionner pour cette étude les genres et les souches les plus appropriées comme source d'engrais biologique pour un test à grande échelle utilisant deux formes de phosphore, le superphosphate simple et le phosphate de chaux naturel.

MATERIELS ET METHODES

Une expérience a été réalisée en terrain irrigué glaiseux noir moyen à la *Regional Sericultural Research Station* de Salem en 1992-1993. Au total, cinq récoltes ont été effectuées pendant cette période. La pluviosité au cours de cette période a été de 658 mm ; les caractéristiques du sol sont les suivantes : pH 9,3, conductivité électrique 0,045 mohms, carbone organique 0,68 %, N disponible 300 kg/ha, P disponible 4 kg/ha et K 260 kg/ha. Les échantillons de sol ont été prélevés à des profondeurs de 0, 30, 60 et 90 cm ; leur teneur en carbone organique et en azote disponible a été évaluée selon la méthode de Jackson et la teneur en P selon la méthode d'Olseon et coll. (1954). L'expérience a été réalisée selon la méthode des blocs aléatoires avec trois répétitions, taille des parcelles : 7 m × 5 m. Les traitements effectués sont les suivants : T1 *Acaulospora laevis* + superphosphate simple (SPS), T2 *Acaulospora laevis* + phosphate de chaux naturel (PR), T3 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + SPS, T4 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + PR, T5 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + SPS, T6 *Bacillus megatherium* + *Acaulospora laevis* + PR, T7 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + SPS, T8 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + PR, T9 SPS uniquement, T10 PR uniquement. On a suivi les méthodes culturales recommandées pour la culture du mûrier, soit 300 kg N, 120 kg P et 120 kg K par hectare en cinq doses égales. Le dosage des engrais phosphatés est de 120 kg/ha en deux doses égales. On a utilisé des cultures sur support (lignite) d'*Azospirillum brasilense* et de *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, à raison de 1×10^9 cellules/g, fournies par le Département de Microbiologie de l'Université du Tamil Nadu, *Regional Sericultural Research Station* de Paiyur. Les cultures ont été mélangées avec du fumier de ferme ou du sol stérile à raison de 25 kg par sachet de culture (200 g). Les cultures d'*Acaulospora* proviennent d'une concentration de spores de 500 spores/100 g de sol ou de sol mélangé avec des fragments de racines de maïs ou de millet perlé. Le traitement a été appliqué à raison de 500 g/m². La variété de mûrier traitée est Kanva 2. Un espacement de 90 cm entre les rangées et entre les plants a été adopté. Cinq plants ont été sélectionnés au hasard dans chaque répétition ; les paramètres de croissance et le rendement en feuilles ont été relevés. Les champignons ont été inoculés en excavant la terre afin d'exposer 2 à 3 cm sur toute la longueur des sillons qui ont ensuite été recouverts de terre. *Azospirillum brasilense* et *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* ont été inoculés après chaque récolte ou après chaque taille. Ils ont été appliqués 10 jours après les engrais inorganiques pour éviter le contact direct de ceux-ci avec l'inoculum.

Les données ont été soumises à une analyse de variance et l'intervalle de confiance entre les moyenne a été calculé au seuil de P 0,05 (Cochran et Cox, 1957).

RESULTATS

Les résultats (Tableau I) montrent que l'inoculation combinée du traitement T7 (*Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + *Azospirillum brasilense* + superphosphate simple) donne l'augmentation maximale pour le rendement en feuilles (31 075 kg/ha) et, pour les paramètres de croissance, le nombre de branches est de 10,0, la longueur des branches de 892,0 cm et le nombre total de feuilles par plant de 222,0 ; vient ensuite le traitement T6 (*Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* + *Acaulospora laevis* + phosphate de chaux naturel) qui donne un rendement en feuilles de 29 630 kg/ha et, pour les paramètres de croissance, les résultats enregistrés sont : 9,0 pour le nombre de branches, 1 786,0 cm pour la longueur des branches et 195,0 pour le nombre de feuilles par plant. La production totale de biomasse des traitements T9 (superphosphate simple uniquement) et T10 (phosphate de chaux naturel uniquement) est significativement supérieure à celle obtenue avec les traitements T1 (*Acaulospora laevis* + superphosphate simple) avec 23 673 kg/ha et T2 (*Acaulospora laevis* + phosphate de chaux naturel) avec 23 340 kg/ha. Les paramètres de croissance correspondants sont également inférieurs à ceux obtenus avec les traitements T9 et T10. Un seul

champignon MAV combiné avec du superphosphate est plus efficace que le traitement avec du phosphate de chaux naturel.

DISCUSSION

L'augmentation du rendement en feuilles, du nombre de branches et de la longueur des branches peut être attribuée au fait que, comme cela a été démontré dans des études antérieures, les bactéries fixant l'azote *Azospirillum* et *Azotobacteria* aident les plantes inoculées à fixer l'azote atmosphérique (Cohen et coll., 1980 ; Dart et Wani, 1982 ; Okon, 1982 ; Berkum et Bohlool, 1980 ; Alagawadi et Gaur, 1988 ; Lin et coll., 1983). Krishna (1985) a démontré que le phosphate de chaux naturel est l'élément nutritif phosphoré le plus adapté utilisé par les plantes. En stimulant la formation des racines et l'ingestion par certaines hormones de croissance sécrétées, il est possible d'augmenter la quantité de phosphore disponible pour les plantes dans le sol et de phosphate ajouté en établissant une population importante de solubilisateurs/mobilisateurs de P efficaces dans la zone des racines (Brown, 1974 ; Tien et coll., 1979). La production totale de biomasse et le rendement augmentent de manière significative après inoculation combinée de champignons MAV, de phosphobactéries et d'*Azospirillum brasilense*, les résultats étant supérieurs à ceux obtenus avec une inoculation individuelle. L'inclusion d'*Azospirillum brasilense* dans le traitement T7 contribue à l'effet synergique du diazotrophe avec les champignons MAV et les phosphobactéries. La mise au point d'un système tripartite (hôte-MAV-diazotrophe) contribue sans aucun doute à l'économie des phosphates et de l'azote en milieu naturel, en particulier dans les zones fertiles (Tilak, 1993). Les champignons MAV stimulent l'ingestion par les plantes de zinc, de cuivre, de soufre, de potassium et de calcium, de manière néanmoins moins prononcée que la mobilisation de phosphore (Cooper et Tinker, 1978). Bolon et coll. (1987) ont comparé trois composés P dont la solubilité est différente (KH_2PO_4 , phosphate de fer colloïdal et phosphate de fer cristallin) comme source d'infestation mycorhizique et ont observé que celle-ci différait en fonction des sources de P. L'association physique des champignons mycorhizes et de la matière organique (Warner, 1984) combinée avec la production de phosphate par le champignon suggère que les mycorhizes jouent un rôle actif dans la minéralisation du P (Dodd et coll., 1987). L'augmentation de l'ingestion par les plantes mycorhizées peut probablement s'expliquer par le fait que les mycorhizes explorent le sol de façon plus complète et trouvent donc davantage de sources de P. Les données présentées ici mettent clairement en évidence le rôle bénéfique des champignons MAV, des phosphobactéries et d'*Azospirillum* comme engrais biologiques. De plus, l'accroissement du rendement en feuilles par unité de surface peut être optimisé selon une proposition économiquement faisable en exploitant le phosphate de chaux naturel et le superphosphate simple.

IN VITRO STUDIES ON THE ISOLATION AND SCREENING OF CERTAIN RHIZOSPHERE FUNGI FOR BIOLOGICAL CONTROL OF BROWN SPOT OF MULBERRY (*MORUS* SPP.)

S. BALASUBRAMANIAN¹, F. PAULRAJ², S. MAŞILAMANI³, V. THIAGARAJAN³ & R.K. DATTA⁴

1. Indo-US Nilgiri Tahr Project, Nilgiri Wild Life and Environment Association, Udhagamandalam, India.
2. Department of Botany, Government Arts College, Udhagamandalam, India.
3. Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, P.B. No. 21, Coonoor 643 101, Nilgiris District, Tamil Nadu, India.
4. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

Eight rhizosphere fungi, i.e., *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus versicolor*, *Gliocladium virens*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium stoloniferum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* and a sterile mycelium, were isolated from disease-free mulberry plants' rhizosphere soil. Moist heat at 30 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C was passed through the columns of treated soil samples and the thermophilic nature of each rhizosphere fungus was studied. Screening was made for antagonistic activity of rhizosphere fungi against *Cercospora moricola* using in vitro dual culture techniques by which successful antagonists, i.e., *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*, were identified.

Keywords: Biological control, mulberry, *Morus* spp., fungal disease, leaf spot disease, brown spot disease, rhizosphere fungi, *Cercospora moricola*.

INTRODUCTION

Mulberry is affected by several diseases caused by fungi, bacteria, mycoplasma, viruses and nematodes. Among the different pathogens, fungi are the predominant ones. About a dozen fungal diseases have been reported, of which the brown spot disease caused by *Cercospora moricola*, powdery mildew caused by *Phyllactinia corylea*, leaf blight caused by *Alternaria alternata*, leaf rust caused by *Cerotelium fici*, violet root rot by *Helicobasidium mompa*, white root rot caused by *Rosellinia necatrix* and twig blight caused by *Gibberella moricola* are of economic importance.

Among the fungal diseases, brown spot caused by *Cercospora moricola* (Fig. 1) is proved to be the most destructive one and it reduces the leaf yield by 10 to 30 per cent and sometimes even more under adverse conditions. Many workers studied the control measures of the brown spot disease by spraying fungicides. Siddaramaiah *et al.* (1978) studied control measures of leaf spot and proved that three sprays of Bavistin (0.025% to 0.05%) at an interval of 15 days effectively controlled the disease.

Several environmental hazards are associated with the use of chemicals for the control of plant diseases (Delp, 1977). Indiscriminate use of fungicides disturbs the biological balance occurring around the plant (Campbell, 1986). The pathogen becomes resistant to chemicals due to repeated spraying (Campbell, 1989). To avert these problems, some of the common saprophytic fungi occurring naturally around the plants are employed to control different plant diseases. Many workers have used saprophytes as biocontrol agents for various plant pathogens (Sinha, 1965; Mishra and Tewari, 1976; Upadhyay and Rai, 1983). Two hundred and ten species of fungi were reported to be mycoparasites

by Campbell (1989) who suggested that some of the species could also be employed as biocontrols for different fungal diseases. Usually biocontrol of leaf-borne diseases is studied with phylloplane microorganisms. But many workers (Baker, 1987; Hoitnik and Fahy, 1986; Schipper *et al.*, 1987) proved soil as a potent source of antagonistic microorganisms.

In the present study, biocontrol methods of *Cercospora moricola* (Cooke) Sacc., a member of the class Deuteromycetes, causing the brown spot disease of mulberry (*Morus* spp.), were investigated using certain antagonistic fungi isolated from the rhizosphere of the mulberry plant.



Fig. 1: Conidiophores and conidia of *C. moricola* (Olympus BH 2; 40 ×).

Fig. 1 : Conidiophores et conidies de *C. moricola* (Olympus BH 2 ; 40 ×).

MATERIALS AND METHODS

The Regional Sericultural Research Station, Coonoor, Nilgiris District, Tamil Nadu, was selected as the experimental site. The Station is located in the Western Ghats of India between 11° and 22° north latitude and 76°15' and 77° east latitude at an altitude of 1850 meters above mean sea level.

i) Isolation and culturing of pathogen:

Mulberry leaves infected by *Cercospora moricola* were collected in sterile bags from the mulberry garden and brought to the laboratory for isolation of the pathogen. The spots were carefully cut with a sterile blade and surface sterilisation was done with 0.5% mercuric chloride solution for 1-2 minutes. Treated leaf bits were rinsed with distilled water and five leaf bits were placed in a Petri dish containing sterile Czapek Dox agar medium (Booth, 1971). Six such replicates were maintained. The plates were incubated at 25 ± 1 °C. The pathogen appeared after 5 days, was isolated and maintained as a pure culture in slants and agar plates for further studies.

ii) Isolation and culturing of rhizosphere fungi:

The soil close to the roots of disease-free mulberry plants was dug out with a sterile trowel to a depth of 10-15 cm and collected in sterile test tubes which were immediately closed with a sterile cork to prevent contamination. The test tubes containing the soil samples were placed in a glass chamber and kept under sunlight for 3 hours. The soil was then brought to the laboratory and transferred into sterile narrow glass tubes under aseptic conditions and the extraneous organisms, i.e., pathogens, bacteria, nematodes and fast-growing fungi, were killed by passing aerated steam of 30 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C one after another for 10 minutes from a steam generator. This was done not only to eliminate extraneous organisms but also to determine the thermophilic nature of the rhizosphere fungi (Baker and Snyder, 1965).

Ten grams of treated soil were diluted to 1:100 times through serial dilution in a sterile conical flask containing distilled water (Onions, 1971). One ml of the dilution was poured into a 9 cm sterilised Petri plate containing Czapek Dox agar medium. Six replicates were maintained. The inoculated plates were incubated in an oven under 25 ± 1 °C for 7 days. Plates were examined from the seventh day onwards. Developing fungal colonies were recorded and the isolated fungal species were maintained as pure culture in slants and Petri plates for further studies.

iii) Dual culturing of test fungi with *C. moricola*:

Fungi isolated from the rhizosphere soil were tested for their antagonism against *Cercospora moricola* *in vitro* by dual culture techniques (Dennis and Webster, 1971). A mycelial disc of 9 mm diameter of the test fungus from the pure culture was cut out with a sterile cork borer and placed towards the periphery of a Petri dish containing 15 ml of Czapek Dox agar medium. A 9 mm mycelial disc of *C. moricola* was cut and placed at the opposite side of the Petri plate. Three replicates were maintained for each treatment. A plate inoculated with *C. moricola* at the centre was maintained as control. The plates were incubated in an oven at 25 ± 1 °C. The radial growth of the pathogen and rhizosphere fungi was measured at an interval of 5 days. The zone of inhibition was measured when the pathogen covered the entire plate in the control.

RESULTS AND DISCUSSION

i) Frequency and percentage of test fungi occurrence:

The fungi isolated by the dilution plating technique were classified into 5 classes on the basis of the frequency of their occurrence (Subramanian and Vital, 1979; Sudha, 1978). Species with 81-100% frequency of occurrence were grouped as dominant; 61-80%, common; 41-60%, frequent; 21-40% occasional and 1-20%, rare (Table I). All the eight species of fungi were isolated from the soil exposed to a moist heat of 30 °C and 40 °C. *Aspergillus giganteus*, *Trichoderma viride* and *Penicillium stoloniferum* remained dominant in both samples. From the soil exposed to 50 °C moist heat, 6 species were isolated. *Gliocladium virens* and the sterile mycelium did not appear in the culture. Only 5 species of fungi were isolated from the soil treated with a moist heat of 60 °C. Non-appearance of *Gliocladium virens*, *Trichoderma viride* and sterile mycelium in the culture plates prepared from the soil samples exposed to 60 °C showed that they were sensitive to a temperature above 50 °C. Similar conditions were also observed by Buxton (1957) in pea and by Kamal and Singh (1974) in sugarcane. In this context, it can be mentioned that the disease-free condition of the plant from which the sample was collected may be due to the presence of these fungi.

ii) Interaction of test fungi with *C. moricola*:

The results obtained for the eight species of fungi tested for their antagonism against *C. moricola* by dual culture technique were presented in Table II and Figure 2. Among the eight species tested for their antagonism, *T. harzianum* (Fig. 3) and *T. viride* were found to be highly antagonistic towards *C. moricola*. The mycelium of *T. harzianum* and *T. viride* covered the entire dual culture plates (90 mm) within 10 days. This was followed by *G. virens* (Fig. 4) and on the fifteenth day the mycelium of the fungus covered the entire plate. The average zone of inhibition was 2 cm for *P. implicatum* and

Table I. Survival of fungi isolated from the mulberry rhizosphere soil treated with moist heat (mean values).

Tableau I. Survie des champignons isolés à partir du sol de la rhizosphère du mûrier traité à la chaleur humide (valeurs moyennes).

Rhizosphere fungi Champignons de la rizosphère	30 °C			40 °C			50 °C			60 °C		
	NC	O (%)	F (%)	NC	O (%)	F (%)	NC	O (%)	F (%)	NC	O (%)	F (%)
1. <i>Aspergillus giganteus</i>	4.5	15.7	100	3.8	19.0	100	1.7	18.3	66	1.5	18.7	83
2. <i>Aspergillus versicolor</i>	3.5	12.2	100	1.7	8.2	66	1.0	12.2	50	1.5	27.0	66
3. <i>Gliocladium virens</i>	2.2	7.6	83	0.7	3.3	50	-	-	-	-	-	-
4. <i>Penicillium implicatum</i>	2.3	8.2	50	4.8	19.8	83	2.3	8.1	66	2.3	29.0	83
5. <i>Penicillium stoliniferum</i>	2.2	7.6	83	4.0	19.8	66	1.5	18.3	66	1.3	22.9	66
6. <i>Trichoderma viride</i>	7.0	24.5	100	3.7	18.0	83	2.0	24.5	66	-	-	-
7. <i>Trichoderma harzianum</i>	4.7	16.7	100	1.7	9.0	66	1.5	18.3	66	0.2	2.0	17
8. Sterile mycelium	2.2	7.6	83	0.5	2.4	33	-	-	-	-	-	-
8. <i>Mycélium stérile</i>												

NC: Number of colonies / Nombre de colonies.

O: Occurrence / Présence.

F: Frequency / Fréquence.

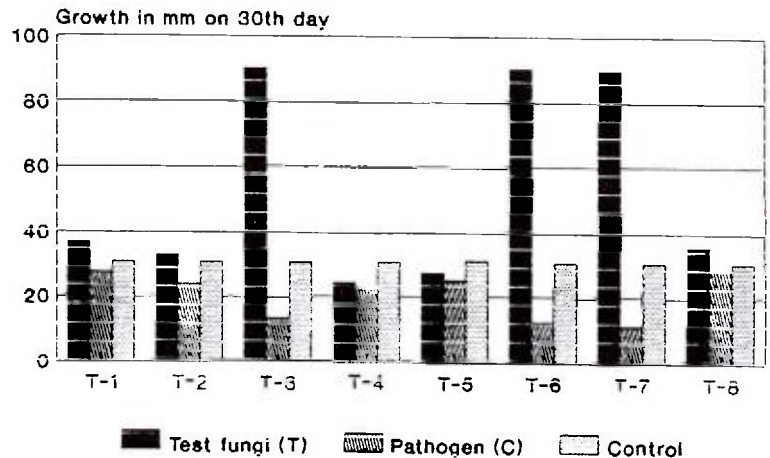
Table II. Dual culture: inhibitory effect of mulberry rhizosphere fungi on the mycelial growth of *C. moricola*.**Tableau II. Culture jumelée : effet inhibiteur des champignons de la rhizosphère du mûrier sur la croissance des mycéliums de *C. moricola*.**

Test fungi	Mean growth in mm after days												Observations after the completion of growth
	5		10		15		20		25		30		
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	
<i>Champignons testés</i>	<i>Croissance en mm après</i>												<i>Observations en fin de croissance</i>
	5 jours		10 jours		15 jours		20 jours		25 jours		30 jours		
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	
1. <i>Aspergillus giganteus</i>	10	13	14	22	16	28	21	36	27	37	27	37	12 mm i.z.
2. <i>Aspergillus versicolor</i>	10	13	14	25	18	29	22	33	24	33	24	33	20 mm i.z.
3. <i>Gliocladium virens</i>	10	15	13	79	13	90	-	-	-	-	-	-	O
4. <i>Penicillium implicatum</i>	10	12	13	19	19	21	20	22	23	24	23	24	20 mm i.z.
5. <i>Penicillium stoliniferum</i>	10	13	14	21	17	22	22	24	25	26	25	27	13 mm i.z.
6. <i>Trichoderma viride</i>	10	18	12	90	-	-	-	-	-	-	-	-	O
7. <i>Trichoderma harzianum</i>	10	18	11	90	-	-	-	-	-	-	-	-	O
8. Sterile mycelium	10	13	14	22	19	29	22	33	27	36	29	36	5 mm i.z.
8. <i>Mycélium stérile</i>													
9. Control / Témoin	10	-	14	-	19	-	23	-	28	-	31	-	

C: *Cercospora moricola*. T: Test fungi / Champignons testés. i.z.: Inhibition zone / Zone d'inhibition. O: Overgrown / Recouvrement total.

Fig. 2: Inhibitory effect of rhizosphere fungi on *C. moricola*.**Fig. 2: Effet inhibiteur des champignons de la rhizosphère sur *C. moricola*.**

T-1: *Aspergillus giganteus*
 T-2: *Aspergillus versicolor*
 T-3: *Gliocladium virens*
 T-4: *Penicillium implicatum*
 T-5: *Penicillium stoliniferum*
 T-6: *Trichoderma viride*
 T-7: *Trichoderma harzianum*
 T-8: Sterile mycelium
 T-8: Mycélium stérile



A. versicolor, 1.3 cm for *P. stoloniferum*, 1.2 cm for *A. giganteus* and 0.5 cm for the sterile mycelium. The growth of the antagonistic fungi over the colonies of *C. moricola* may be due to mycoparasitism as reported by Park and Kim (1989)

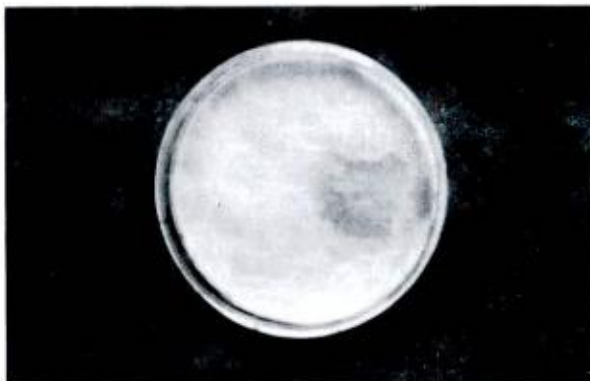
Fig. 3: Dual culture plate of *Trichoderma harzianum* and *Cercospora moricola*.

Fig. 3 : Culture jumelée de *Trichoderma harzianum* et de *Cercospora moricola*.



Fig. 4: Dual culture plate of *Gliocladium virens* and *Cercospora moricola*.

Fig. 4 : Culture jumelée de *Gliocladium virens* et de *Cercospora moricola*.



Inhibition of the pathogen in the presence of antagonistic fungi was not by competition for general nutrients but perhaps something more specific (Warren, 1972). This hypothetical principle termed as 'phytoalexin' (PA), a designation which refers to its biological action only and does not include any suggestion as to its chemical nature (Müller, 1958). Phytoalexins are fungistatic or antibiotic principles yet to be understood (Bernard, 1909). The rhizosphere microflora is likely to produce phytoalexins as a result of the infection of the host by microorganisms, thereby rendering the host resistant to parasites. The thermophilic studies made in the earlier part of investigation revealed that the propagules of *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* were found to tolerate temperatures ranging from 40-50 °C. It became obvious that, while using these antagonistic fungi as foliar spray, the temperature may not affect their growth or the survival of the fungi. Since the physical nature of the environments in field experiments is often unknown, the effect

of antagonists may need to be assessed under field conditions. Further studies in this line in a series of environments are in progress.

CONCLUSION

During our studies, eight rhizosphere fungi of disease-free mulberry plants were isolated and screened for their effect on the brown spot pathogen (*Cercospora moricola*) of mulberry. *In vitro* experiments were carried out to study the interactions of rhizosphere fungi with *C. moricola* using dual culture techniques. Among the eight rhizosphere fungi, *Gliricium virens*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* were found to be more antagonistic towards *C. moricola* during the course of investigation. Further investigations on field trials are being carried out to evaluate the biocontrol efficacy of the screened rhizosphere fungi to control the brown spot disease of mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to Dr Udhayan, Professor and Head of the Department of Botany, Bharathiar University, Coimbatore, for confirming the identification of fungi and Mr B. Nagaraj, Senior Research Officer, Regional Sericultural Research Station, for his assistance. Thanks are also due to Shri S. Sekar, Stenographer of this station, for typing this manuscript neatly.

REFERENCES

- BAKER K.F. (1987) Evolving concept of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 25, 57-85.
- BAKER K.F., SNYDER W.C. (eds.) (1965) Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens. Univ. California Press, Berkeley, USA.
- BERNARD N. (1909) Ann. Sci. Nat. Bot., 9, 1-196.
- BOOTH C. (1971) Methods in Microbiology. Vol. 4, Academic Press, New York, 795 pp.
- BUXTON E.W. (1957) Differential rhizosphere effect of three pea cultivars on physiological races of *Fusarium oxysporium* form species pisi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 38, 104-154.
- CAMPBELL R. (1986) The search for biological agents, a pragmatic approach. Biological Agriculture and Horticulture, 3, 317-327.
- CAMPBELL R. (1989) Introduction to plant pathology and microbial ecology on biological control of microbial plant pathogens. Cambridge Univ. Press, New York, pp. 1-35.
- DENNIS C., WEBSTER J. (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Tran. Br. Mycol. Soc., 57, 363-369.
- DELP C.J. (1977) Privately supported disease management activities. In Plant Diseases. Vol. 1, Ed: J.G. Horsfall and E.B. Cowling, New York Academic Press, pp. 381-392.
- HOITNIK H.A.J., FAHY P.C. (1986) Basis for control of soil borne plant pathogens with compost. Annual Review of Phytopathology, 24, 93-144.
- KAMAL, SINGH H.P. (1974) On microfungi from root region of ten sugarcane varieties. Indian Phytopathol., 27, 347-354.
- MISHRA R.H., TEWARI R.P. (1976) Studies on biological control of *Puccinia graminis tritici*. In Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Ed. C.H. Dickson and I.F. Preece, Academic Press, London, 599 pp.
- MÜLLER K.O. (1958) Studies on phytoalexins. I. The formation and the immunological significance of phytoalexins produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fruticola* and *Phytophthora infestans*. Aust. J. Biol. Sci., 2, 275-300.
- ONIONS A.H.S. (1971) In Methods in Microbiology. Vol. 4, ed. C. Booth, Academic Press, London and New York, pp. 113-152.
- PARK H.H., KIM H.K. (1989) Biological control of *Phytophthora* crown and root rot of greenhouse pepper with *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter agglomerans* by improved methods of application. Korean J. Plant Pathol., 5, 1-12.

- SCHIPPER B., BAKKER A.W., BAKKER P.H.A.M. (1987) Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and their effect on cropping of potatoes. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 339-358.
- SIDDARAMAIAH A.L., PADAGANUR G.M., KRISHNA PRASAD K.S., GOVINDAN R. (1978) Control of mulberry leaf spot caused by *C. moricola*. *Indian J. Seric.*, 17(1), 23-27.
- SINHA (1965) Microbiological complex of the phyllosphere and disease control. *Indian Phytopathol* 18, 1-20.
- SUBRAMANIAN C.V., VITAL B.P.R. (1979) Studies on litter fungi. II. Fungal colonization of *Atlantia monophylla* leaves and litter. *Beinefte* 63, Zur Nova Hedwigia, 361-369.
- SUDHA K. (1978) A study of mycoflora of leaves and litter. Ph.D. Thesis, Univ. of Madras.
- UPADHYAY R., RAI B. (1983) Mycoparasitism with reference to biological control of plant diseases. *In* Recent Advances in Plant Pathology. Ed. A. Husain, Print House, Lucknow, pp. 48-72.
- WARREN R.C. (1972) Interference by common leaf saprophytic fungi with the development of *Phoma betae* lesions on sugar beet leaves. *Ann. Appl. Biol.*, 72, 137-144.

ETUDES *IN VITRO* SUR L'ISOLEMENT ET LA SELECTION DE CERTAINS CHAMPIGNONS DE LA RHIZOSPHERE POUR LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA TACHE MARRON DU MURIER (*MORUS SPP.*)

S. BALASUBRAMANIAN¹, F. PAULRAJ², S. MASILAMANI³, V. THIAGARAJAN³ & R.K. DATTA⁴.

1. Indo-US Nilgiri Tahr Project, Nilgiri Wild Life and Environment Association, Udhagamandalam, Inde.

2. Department of Botany, Government Arts College, Udhagamandalam, Inde.

3. Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, P.B. No. 21, Coonoor 643 101, Nilgiris District, Tamil Nadu, Inde.

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

Huit champignons de rhizosphère, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus versicolor*, *Gliocladium virens*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium stoloniferum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* et un mycélium stérile, ont été isolés dans le sol de la rhizosphère de plants de mûrier sains. On a fait circuler de la vapeur chaude à 30 °C, 40 °C, 50 °C et 60 °C sur des colonnes d'échantillons de sol traités et on a étudié la nature thermophile de chaque champignon de la rhizosphère. La sélection porte sur l'activité antagoniste des champignons de la rhizosphère contre *Cercospora moricola* en utilisant des techniques de cultures jumelées qui ont permis d'identifier les antagonistes appropriés ; ceux-ci sont : *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride*.

INTRODUCTION

Le mûrier est affecté par un grand nombre de maladies provoquées par des champignons, des bactéries, des mycoplasmes, des virus et des nématodes. Les champignons comptent parmi les agents pathogènes les plus importants. Une douzaine de maladies fongiques ont été observées : parmi celles-ci, la tache marron provoquée par *Cercospora moricola*, l'oïdium du mûrier provoqué par *Phyllactinia corylea*, la flétrissure foliaire provoquée par *Alternaria alternata*, la rouille foliaire provoquée par *Cerotelium fici*, le pourrissement violet des racines provoqué par *Helicobasidium mompa*, le pourrissement rouge des racines provoqué par *Rosellinia necatrix* et la flétrissure des branches provoquée par *Gibberella moricola* sont les plus importantes sur le plan économique.

Parmi les maladies fongiques, la maladie de la tache marron provoquée par *Cercospora moricola* (Fig. 1) est la plus destructive, elle peut entraîner une diminution du rendement en feuilles de 10 à 30 %, voire davantage dans des conditions défavorables. De nombreux chercheurs ont étudié les mesures de lutte contre la maladie de la tache marron par vaporisation de fongicides. Siddaramaiah et coll. (1978) ont étudié des mesures de lutte contre la tache foliaire et ont démontré que trois vaporisations de Bavistine (0,025 % à 0,05 %) à 15 jours d'intervalle permettaient d'éliminer cette maladie.

L'utilisation de produits chimiques pour lutter contre les maladies des plantes peut entraîner des risques pour l'environnement (Delp, 1977). L'utilisation abusive de fongicides perturbe l'équilibre biologique autour de la plante (Campbell, 1986). L'agent pathogène devient résistant aux substances chimiques du fait des vaporisations répétées (Campbell, 1989). Pour éviter ces problèmes, on utilise certains des champignons saprophytes communs, présents naturellement autour des plantes, pour

lutter contre les maladies des plantes. De nombreux chercheurs ont utilisé les saprophytes comme agents de lutte biologique contre différents agents pathogènes des plantes (Sinha, 1965 ; Mishra et Tewari, 1976 ; Upadhyay et Rai, 1983). Campbell (1989) a identifié deux cent dix espèces de champignons mycoparasites ; il a suggéré que certaines de ces espèces pouvaient être utilisées comme agents de lutte biologique contre différentes maladies fongiques. La lutte biologique contre les maladies portées par les feuilles est normalement étudiée avec des micro-organismes du phylloplane. Cependant, plusieurs chercheurs (Baker, 1987 ; Hoinik et Fahy, 1986 ; Schipper et coll., 1987) ont démontré que le sol peut constituer une source potentielle de micro-organismes antagonistes.

Dans cette étude, les méthodes de lutte biologique contre *Cercospora moricola* (Cooke) Sacc., membre de la classe des Deutéromycètes et responsable de la maladie de la tache marron chez le mûrier (*Morus* spp.), ont été étudiées en utilisant certains champignons antagonistes isolés dans la rhizosphère des plants de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

La *Regional Sericultural Research Station* de Coonoor (District de Nilgiris, Tamil Nadu) a été choisie comme site expérimental. La station est située dans les Ghats occidentaux de l'Inde entre 11° et 22° de latitude nord et 76°15' et 77° de longitude est à une altitude de 1 850 m.

1) Isolement et culture de l'agent pathogène :

Des feuilles de mûrier infestées par *Cercospora moricola* de la plantation de mûrier ont été prélevées dans des sachets stériles et transférées en laboratoire afin d'isoler l'agent pathogène. Les taches ont été soigneusement découpées avec une lame stérile et la stérilisation de surface a été réalisée avec une solution de chlorure de mercure à 0,5 % pendant 1 à 2 minutes. Les fragments de feuille traités ont été rincés dans de l'eau distillée et cinq fragments ont été placés dans une boîte de Pétri contenant un milieu agar Czapek Dox stérile (Booth, 1971). Six répétitions ont été réalisées. Les boîtes ont été incubées à 25 ± 1 °C. L'agent pathogène est apparu après 5 jours, il a été isolé et maintenu sous forme de culture pure sur des lames et des boîtes d'agar pour la suite des expériences.

2) Isolement et culture des champignons de la rhizosphère :

Le sol autour des racines des plants de mûrier sains a été extrait avec un déplantoir stérile à une profondeur de 10 à 15 cm et déposé dans des éprouvettes stériles immédiatement fermées avec un bouchon stérile pour empêcher toute contamination. Les éprouvettes contenant les échantillons de sol ont été placées en chambre vitrée et exposées à la lumière solaire pendant 3 heures. Le sol a ensuite été transféré en laboratoire et déposé dans des éprouvettes stériles en conditions stériles et les organismes étrangers, c'est-à-dire les agents pathogènes, les bactéries, les nématodes et les champignons à croissance rapide, ont été tués en faisant circuler de la vapeur à 30 °C, 40 °C, 50 °C et 60 °C individuellement pendant 10 minutes dans un générateur de vapeur. Ceci n'a pas été fait seulement pour tuer les organismes étrangers mais également pour déterminer la nature thermophile des champignons de la rhizosphère (Baker et Snyder, 1965).

Dix grammes de sol traité ont été dilués 100 fois par dilution en série dans un flacon conique stérile contenant de l'eau distillée (Onions, 1971). Un ml de la dilution a été versé dans une boîte de Pétri stérilisée contenant un milieu agar Czapek Dox. Six répétitions ont été faites. Les boîtes inoculées ont été incubées à l'étuve à 25 ± 1 °C pendant 7 jours. Les boîtes ont été examinées après sept jours. On a enregistré les colonies fongiques en cours de développement et les espèces fongiques isolées ont été maintenues sous forme de culture pure sur des lames et des boîtes de Pétri pour la suite des expériences.

3) Culture jumelée des champignons testés avec *C. moricola* :

On a testé l'antagonisme *in vitro* des champignons isolés dans le sol de la rhizosphère contre *Cercospora moricola* selon la méthode des cultures jumelées (Dennis et Webster, 1971). Un disque mycélien de 9 mm de diamètre a été découpé dans le champignon testé en culture pure à l'aide d'un emporte-pièce et placé à la périphérie d'une boîte de Pétri contenant 15 ml de milieu agar Czapek Dox. Un disque mycélien de 9 mm de *C. moricola* a été découpé et placé sur le côté opposé de la boîte

de Pétri. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement. Une boîte inoculée avec *C. moricola* au centre a été maintenue comme témoin. Les boîtes ont été incubées à l'étuve à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. La croissance radiale de l'agent pathogène et des champignons de rhizosphère a été mesurée à 5 jours d'intervalle. La zone d'inhibition a été mesurée lorsque l'agent pathogène a entièrement recouvert la boîte témoin.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Fréquence et pourcentage de présence des champignons testés :

Les champignons isolés par la technique de dilution ont été répartis en cinq catégories en fonction de leur fréquence d'occurrence (Subramanian et Vital, 1979 ; Sudha, 1978). Le classement de la fréquence d'occurrence obtenue pour chacune des espèces est le suivant : 81 à 100 % : espèce dominante, 61 à 80 % espèce commune, 41 à 60 % espèce fréquente, 21 à 40 % espèce occasionnelle et 1 à 20 % espèce rare (Tableau I). Les huit espèces de champignons ont été isolées dans un sol exposé à des chaleurs humides de 30°C et 40°C ; *Aspergillus giganteus*, *Trichoderma viride* et *Penicillium stoloniferum* sont dominants dans les deux échantillons. On a isolé 6 espèces dans le sol exposé à une chaleur humide de 50°C ; *Gliocladium virens* et le mycélium stérile n'apparaissent pas dans cette culture. Seulement 5 espèces ont été isolées dans le sol exposé à une chaleur humide de 60°C . Le fait que *Gliocladium virens*, *Trichoderma viride* et le mycélium stérile n'apparaissent pas dans les cultures préparées avec des échantillons de sol exposés à 60°C indique qu'ils sont sensibles à une température supérieure à 50°C . Des résultats similaires ont été relevés par Buxton (1957) chez le pois et par Kamal et Singh (1974) chez la canne à sucre. Dans ce contexte, il convient de rappeler que l'absence de maladie chez la plante d'où provient l'échantillon peut être due à la présence de ces champignons.

2) Interaction des champignons testés avec *C. moricola* :

Les résultats obtenus pour les huit espèces de champignons testés pour leur antagonisme à *C. moricola* par la méthode des cultures jumelées sont présentés dans le tableau II et la figure 2. Sur les huit espèces testées, *T. harzianum* (Fig. 3) et *T. viride* sont les plus antagonistes à *C. moricola*. Le mycélium de *T. harzianum* et de *T. viride* recouvre entièrement les boîtes de culture jumelée (90 mm) en 10 jours, devant *G. virens* (Fig. 4) dont le mycélium recouvre entièrement la boîte en 15 jours. La zone moyenne d'inhibition est de 2 cm pour *P. implicatum* et *A. versicolor*, de 1,3 cm pour *P. stoloniferum*, de 1,2 cm pour *A. giganteus* et de 0,5 cm pour le mycélium stérile. La croissance des champignons antagonistes aux colonies de *C. moricola* pourrait être due au mycoparasitisme, comme l'ont observé Park et Kim (1989).

L'inhibition de l'agent pathogène en présence des champignons antagonistes n'est peut-être pas due à la compétition pour les éléments nutritifs généraux mais peut être pour quelque chose de plus spécifique (Warren, 1972). Ce principe hypothétique est appelé « phytoalexine » (PA), désignation qui fait référence à son action biologique et ne contient aucune proposition quant à sa nature chimique (Müller, 1958). Les phytoalexines sont des principes fongistatiques ou antibiotiques qui sont encore mal connus (Bernard, 1909). La flore microbienne de la rhizosphère est susceptible de produire des phytoalexines du fait de l'infestation de l'hôte par les micro-organismes, rendant ainsi l'hôte résistant aux parasites. Les études thermophiles réalisées dans la première partie de ces travaux révèlent que les propagules de *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* tolèrent des températures de 40 à 50°C . Il est donc évident que, lorsque l'on utilise ces champignons antagonistes en vaporisation foliaire, la température n'affecte pas leur croissance ou la survie des champignons. Etant donné que la nature physique de l'environnement dans les expériences sur le terrain est souvent indéterminée, il est peut-être nécessaire d'évaluer l'effet des antagonistes sur le terrain. Des études sur ce sujet dans différents environnements sont en cours.

CONCLUSION

Dans cette étude, huit champignons de rhizosphère de plants de mûrier sains ont été isolés et sélectionnés pour leur effet sur l'agent pathogène de la tache marron (*Cercospora moricola*) du mûrier. Des expériences *in vitro* ont été réalisées pour observer les interactions des champignons de la

rhizosphère avec *C. moricola* selon la technique des cultures jumelées. Parmi les huit champignons de la rhizosphère, *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* sont les plus antagonistes à *C. moricola*. D'autres expériences sur le terrain sont en cours pour évaluer l'efficacité des champignons de rhizosphère sélectionnés dans la lutte biologique contre la maladie de la tache marron du mûrier.

INFLUENCE OF COCOON COOKING CONDITIONS AND REELING SPEED ON THE REELING TENSION, TENACITY AND ELONGATION OF RAW SILK

SUBHAS V. NAIK¹, C. TAKABAYASHI² & T.H. SOMASHEKAR^{1*}

1. Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore - 560 068, India.

2. National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-4-8 Goda, Okaya, Nagano Prefecture 394, Japan.

The influence of cocoon reeling conditions and reeling speed on the reeling tension, tenacity and elongation of raw silk has been studied. The study was carried out using bivoltine hybrid cocoons with three cooking conditions and six reeling speeds. It was observed that the cooking condition and reeling speed have a significant influence on the reeling tension, tenacity and elongation of raw silk. A significant increase in reeling tension and tenacity of raw silk, and significant decrease in elongation of raw silk were observed as the reeling speed increased from 60 m/min. to 160 m/min. in all the three cooking conditions. The reeling tension due to undercooked cocoons was observed to be higher than that due to medium-cooked cocoons, and the reeling tension due to overcooking was significantly less than the reeling tension due to medium-cooking at all the reeling speeds. It was also observed that both undercooking and overcooking affected the elongation of raw silk.

Keywords: Cocoon cooking, reeling speed, exfoliation tension, reeling tension, tenacity, elongation.

INTRODUCTION

Maintaining the reeling tension within the standard levels is one of the important process controls in reeling technology and has a direct bearing on the tenacity and elongation of raw silk (Shimada and Ogiwara, 1970). Since tenacity and elongation are important properties of raw silk and play a decisive role in the performance of raw silk during preparatory operations and weaving, it is essential to control the reeling tension.

The reeling tension is influenced by many factors, i.e., the basic thread passage in the reeling machine, reeling speed, croissure length maintained during reeling, cocoon cooking, etc. A series of studies have been conducted in Japan with respect to the influence of croissure angle and reeling speed on the reeling tension (Nakagawa, 1950; Umezawa and Azuma, 1979). But information available regarding the influence of variation in cooking conditions on the reeling tension and elongation of raw silk is scanty. In order to investigate the influence of cooking conditions and reeling speed individually and in combination on reeling tension, tenacity and elongation of raw silk, the present basic study has been carried out.

MATERIALS AND METHODS

1. Raw material:

Bivoltine hybrid cocoons, namely Shungetsu × Hosho race (spring cocoons), were used for the study.

* Author to whom correspondence may be addressed.

2. Drying conditions:

The cocoons were dried in a batch type hot air drier following a temperature profile of 115 °C to 50 °C for a period of 5 hr, achieving around 43% degree of drying.

3. Cocoon cooking:

Cocoon cooking was carried out using a three-pan cooking device. By varying the cocoon cooking temperature and time, three cooking conditions, i.e., undercooking, medium cooking and overcooking, were achieved. The temperature and time used to achieve the different cooking conditions were as follows:

a. Retting conditions:

Initially the cocoons were pre-treated in water at 50 °C for 1.5 min. duration.

b. High temperature for permeation:

After retting treatment, the cocoons were treated with water at 90 °C for 1.5 min.

c. Permeation conditions:

The cocoons were then immediately immersed in water at 65 °C for a period of 1 min. for permeation of water in the cocoon.

d. Cooking conditions:

After permeation treatment, the cocoons were cooked at 90 °C for 2 min. to achieve undercooking condition, at 95.5 °C for 4 min. to achieve medium cooking condition and at 97 °C for 8 min. to achieve overcooking condition.

e. Adjustment temperature and time:

i. In the case of undercooking, the temperature was brought down from 90 °C to 80 °C gradually in 2 min. by adding water.

ii. In the case of medium cooking and overcooking, the cooking temperature (95.5 °C in the case of medium cooking and 97 °C in the case of overcooking) was brought down to about 94-93 °C gradually in 1.5 min. Then water was added gradually to bring the temperature to 85 °C in 1 min. After keeping the cocoons at 85 °C for 2 min., addition of water was increased gradually so that in a period of 1.5 min. the temperature was brought down to 50 °C. The cocoons were kept at 50 °C for 1 min. and then removed from the cooking bath for brushing. The total period of adjustment was 7 min. for both medium cooking and overcooking. After cocoon cooking the cooking condition was confirmed by visual examination and by measuring the cocoon cooking degree and water content in the cocoon shell (Takabayashi, 1985), and the results are shown in Fig. 1 and 2.

4. Brushing:

Cooked cocoons were brushed mechanically in 80 °C hot water. The groping efficiency was noted down.

5. Reeling:

Reeling of cocoons was carried out on an automatic test reeling machine to produce 26/28 denier using six different reeling speeds. The different reeling speeds used were, 60 m/min., 80 m/min., 100 m/min., 120 m/min., 140 m/min., and 160 m/min.

The reeling basin water temperature was maintained constantly at 40 °C and croissure length of 8 cm was maintained during reeling for all the speeds.

6. Reeling tension:

The reeling tension was measured using a 'continuous reeling tension measuring instrument' (model 1500, manufactured by Eiko-Sokki, Co. Ltd., Japan) and tension graphs were obtained from the tension meter. The tension was measured between the last croissure pulley and the reel traverse. From the graphs, the tension in the thread was measured when the raw silk thread is inside the denier indicator and when the raw silk thread is outside the denier indicator.

7. Testing:

The samples of reeled silk were tested for tenacity and elongation on Tensilon UTM (manufactured by Shimazu Seisakusho Co. Ltd., Japan). Fifty samples were tested for each reeling speed. The data collected were statistically analysed using 2-way analysis of variance.

RESULTS AND DISCUSSION

Analyses of the variance of cocoon cooking condition on the cooking degree and water content in the cocoon shell are given in Tables I and II; while the analyses of variance of the influence of cocoon cooking condition and reeling speed on the reeling tension, tenacity and elongation are given in Tables III and IV.

Table I. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition on the cocoon cooking degree.

Tableau I. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson sur le degré de cuisson des cocons.

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>
A: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	46.328	2	23.164	63.446**
E: Error / <i>Ecart</i>	9.858	27	0.365	
Total	56.186	29		

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

Table II. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition on the water content in the cocoon shell of bivoltine cocoons.

Tableau II. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson sur le contenu en eau de la coque des cocons bivoltins.

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>
A: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	104757	2	52378.3	17.989**
E: Error / <i>Ecart</i>	78613.5	27	2911.61	
Total	183370	29		

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

Influence of cocoon cooking condition on cocoon cooking degree:

From Tables I and II and Figures 1 and 2, it can be observed that the cocoon cooking condition has a significant influence on the cocoon cooking degree and water content in the cocoon shell. It can be inferred that cooking temperatures and time selected for the study resulted in cooking the cocoons to undercooking, medium cooking and overcooking conditions (Takabayashi, 1985). This was confirmed by visual examination as well.

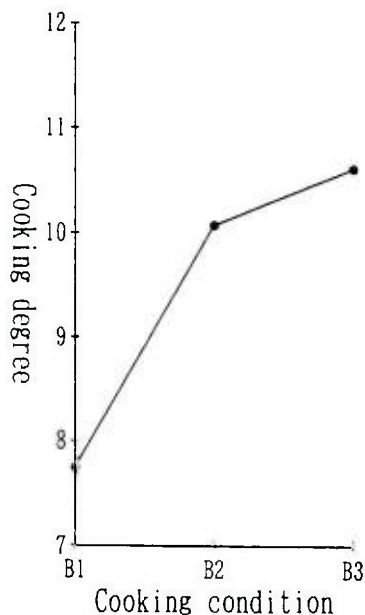


Fig. 1: Influence of cooking condition on the cooking degree.

B1: Undercooking. B2: Medium cooking.
B3: Overcooking.

Fig. 1 : Influence du mode de cuisson sur le degré de cuisson.

B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

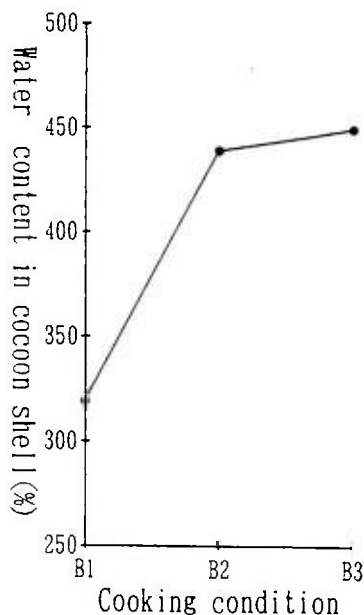


Fig. 2: Influence of cooking condition on the water content in the cocoon shell.

B1: Undercooking. B2: Medium cooking. B3: Overcooking.

Fig. 2 : Influence du mode de cuisson sur le contenu en eau de la coque.

B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on the reeling tension:

From Figures 3 and 4 it can be seen that the reeling tension due to undercooking is higher than the reeling tension of medium-cooked cocoons and overcooked cocoons in all the speed ranges; whereas the reeling tension of overcooked cocoons is significantly lower than that of undercooked cocoons and medium-cooked cocoons in all the speed ranges. From Figures 3 and 4 it can also be seen that as the reeling speed increases, the reeling tension also increases in all the three cooking conditions.

From Tables III and IV it can be inferred that changes in the cocoon cooking condition and reeling speed have a significant influence on the reeling tension. The influence of both cooking condition and reeling speed on the reeling tension is significant at the 1% level. From Tables III and IV it is observed that contribution of the reeling speed on the reeling tension is 14.86% (when the thread is out of the

denier indicator, i.e., indicator in idle position) and 21.65% (when the thread is inside the denier indicator, i.e., indicator in active position); whereas the contribution of the cooking condition on the reeling tension is 81.08% (when the denier indicator is in idle position) and 76.29% (when the denier indicator is in active position). The results of the contribution ratio analysis indicate that the influence of the cocoon cooking condition on the reeling tension is higher than that of the reeling speed (for the parameters selected for the study).

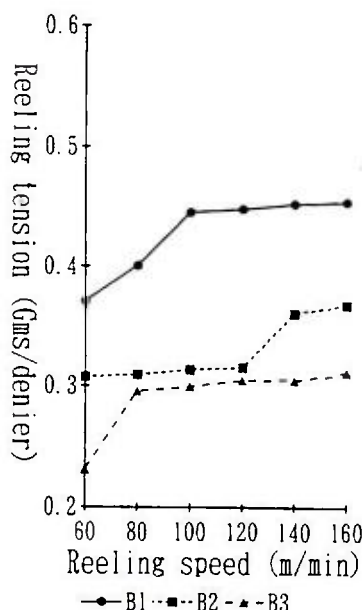


Fig. 3: Influence of cooking condition and reeling speed on the reeling tension (raw silk thread outside the denier indicator).
B1: Undercooking. B2: Medium cooking.
B3: Overcooking.

Fig. 3 : Influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage (fil à l'extérieur du détecteur de titre).
B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

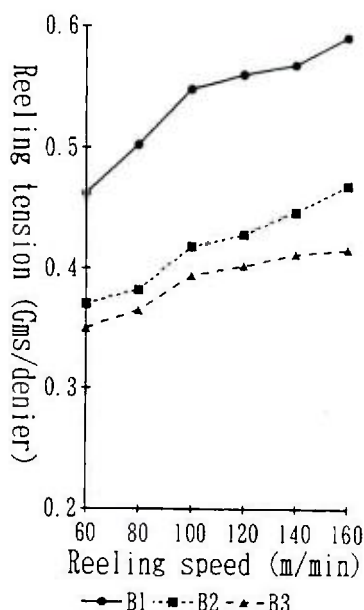


Fig. 4: Influence of cooking condition and reeling speed on the reeling tension (raw silk thread inside the denier indicator).
B1: Undercooking. B2: Medium cooking. B3: Overcooking.

Fig. 4 : Influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage (fil à l'intérieur du détecteur de titre).
B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

Higher reeling tension in the case of undercooked cocoons as compared to that of medium-cooked cocoons and overcooked cocoons can be attributed to undersoftening of the sericin of the cocoon filament layers. It is to be noted that the cocoon consists of many (several hundred thousands) crossover points between the cocoon filament layers due to the nature in which silkworms spin (8 or S shape) their cocoons. Smooth unwinding of the cocoon filament from the cocoon shell depends on the easing of the agglutination force between the cocoon filament and the cocoon shell using the best possible cooking conditions. If the cocoons are undercooked, the sericin will not be softened and swollen to the required level. Due to this agglutination force between the cocoon filament and the cocoon shell, the cocoon shell will not be reduced to the required level and hence the increase

in the filament unwinding tension. Higher filament unwinding tension in turn increases the overall reeling tension.

Overcooking leads to oversoftening of sericin, the agglutination force between the cocoon filament and the cocoon shell, hence the exfoliation tension of a cocoon filament, will be on the lower side as compared to that of undercooked cocoons and medium-cooked cocoons. Thus, the total reeling tension will be reduced in the case of overcooked cocoons. But it is to be noted that overcooking of cocoons will reduce the raw silk yield and affect certain quality characteristics of raw silk. Therefore, the option of reducing the reeling tension by overcooking the cocoons is not advisable.

Table III. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition and reeling speed on the reeling tension (thread outside the denier indicator).

Tableau III. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage (fil à l'extérieur du tâteur de titre).

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value	Contribution ratio (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>	<i>Taux de contribution (%)</i>
A: Reeling speed / <i>Vitesse de dévidage</i>	0.011	5	0.002	7.409**	14.86
B: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	0.06	2	0.03	97.782**	81.08
E: Error / <i>Ecart</i>	0.003	10	0		
Total	0.074	17			

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

Table IV. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition and reeling speed on the reeling tension (thread inside the denier indicator).

Tableau IV. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage (fil à l'intérieur du tâteur de titre).

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value	Contribution ratio (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>	<i>Taux de contribution (%)</i>
A: Reeling speed / <i>Vitesse de dévidage</i>	0.021	5	0.004	29.163**	21.65
B: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	0.074	2	0.037	263.171**	76.29
E: Error / <i>Ecart</i>	0.001	10	0		
Total	0.097	17			

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

From Figures 3 and 4 it can be seen that as the reeling speed increases, the reeling tension also increases. This is due to the fact that, as the reeling speed increases, the oscillating movement of the cocoon during reeling increases and leads to variation in the cocoon filament exfoliation angle. Hence the cocoon exfoliation tension increases, leading to varying/increasing total reeling tension (Takabayashi, 1993). There is a relation between the reeling speed and the reeling tension, as shown in the following equation (Nakagawa, 1950),

$$T = A + dV^n$$

where,

T = raw silk tension during reeling (g/10 denier)

A = tension regardless of silk reeling speed (g/10 denier)

d = speed coefficient (g/10 denier)

V = silk reeling speed (m/min.)

n = speed exponent

Influence of cooking condition and reeling speed on the tenacity and elongation of raw silk:

From Figures 5 and 6 it can be seen that, as the reeling speed increases, the tenacity of raw silk increases, whereas the elongation of raw silk decreases in all the three cooking conditions. This can be attributed to the fact that as the reeling speed increases, the reeling tension increases (Fig. 3 and 4), leading to orientation of fibrils in the fibroin of a cocoon filament. Better orientation of fibrils in the fibroin results in increasing the tenacity and decreased elongation of raw silk.

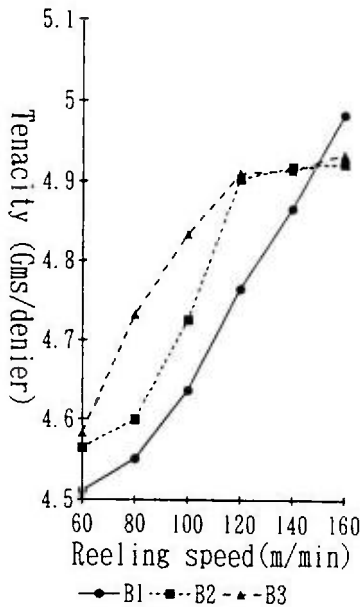


Fig. 5: Influence of cooking condition and reeling speed on the tenacity of raw silk.

B1: Undercooking. B2: Medium cooking.
B3: Overcooking.

Fig. 5 : Influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la ténacité de la soie grège.

B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

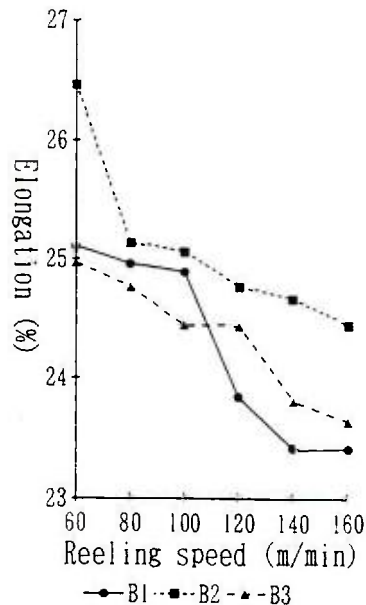


Fig. 6: Influence of cooking condition and reeling speed on the elongation of raw silk.

B1: Undercooking. B2: Medium cooking. B3: Overcooking.

Fig. 6 : Influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur l'allongement de la soie grège.

B1 : Cuisson insuffisante. B2 : Cuisson moyenne.
B3 : Cuisson excessive.

From Tables V and VI it is observed that changes in the cooking condition and reeling speed have a significant influence on the tenacity and elongation of raw silk. From Table V it can be observed that the influence of the reeling speed and cooking condition on the tenacity of raw silk is significant at the 1% and 5% levels, respectively. Contribution of reeling speed on the tenacity of raw silk is 82.83%, whereas that of cooking condition on the tenacity of raw silk is 5.80%, indicating that the

Table V. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition and reeling speed on the tenacity of raw silk.

Tableau V. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la ténacité de la soie grège.

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value ratio	Contribution (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>	<i>Taux de contribution (%)</i>
A: Reeling speed / <i>Vitesse de dévidage</i>	0.372	5	0.074	26.719**	82.83
B: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	0.031	2	0.015	5.520*	5.8
E: Error / <i>Ecart</i>	0.028	10	0.003		
Total	0.431	17			

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

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

Table VI. Results of the analysis of variance of the effect of cocoon cooking condition and reeling speed on the elongation of raw silk.

Tableau VI. Résultats de l'analyse de variance de l'effet du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur l'allongement de la soie grège.

Factor	Sum of squares	Degree of freedom	Mean of squares	F value ratio	Contribution (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>Valeur F</i>	<i>Taux de contribution (%)</i>
A: Reeling speed / <i>Vitesse de dévidage</i>	6.11	5	1.222	12.044**	58.33
B: Cooking condition / <i>Mode de cuisson</i>	2.484	2	1.242	12.243**	23.75
E: Error / <i>Ecart</i>	1.015	10	0.101		
Total	9.609	17			

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

reeling speed has more impact than the cooking condition on the tenacity of raw silk. From Table VI it is observed that the influence of both reeling speed and cooking condition on the elongation of raw silk is significant at the 1% level. Contribution of the reeling speed on the elongation of raw silk is 58.33%, whereas the contribution of the cooking condition on the elongation of raw silk is 23.75%.

From Figure 6 it can be seen that the elongation of raw silk of undercooked cocoons is less than that of raw silk of medium-cooked cocoons in all the speed ranges selected for this study. This is due to the fact that the reeling tension of undercooked cocoons (Fig. 3 and 4) is higher than that of medium-cooked cocoons. The stress developed during reeling in the raw silk of undercooked cocoons can be expected to be higher than the stress in the raw silk of medium-cooked cocoons due to the higher reeling tension in the case of undercooked cocoons. Thus the elongation of raw silk of undercooked cocoons has reduced as compared to the elongation of raw silk of medium-cooked cocoons. In addition, stress relaxation in the raw silk on the reel can be expected to be more in the case of raw silk of undercooked cocoons as compared to the stress relaxation in the case of raw silk of medium-cooked cocoons due to higher reeling tension in the former case. This seems to have contributed to the reduction of elongation of raw silk of undercooked cocoons.

From Figure 6 it can be observed that elongation of raw silk of overcooked cocoons is also lower than that of raw silk of medium-cooked cocoons, even though the reeling tension in the case of overcooked cocoons (Fig. 3 and 4) is significantly lower than the reeling tension of medium-cooked cocoons. This can be attributed to the fact that the cocoon filaments can be stretched easily in overcooked condition. Because the overcooked raw silk of overcooked cocoons suffers more under the stress than the raw silk of medium-cooked cocoons, presumably leading to better orientation of fibrils in the fibroin of cocoon filaments of overcooked cocoons. This may be the reason for the reduction of elongation of the raw silk in the case of overcooked cocoons.

CONCLUSIONS

From the above analysis it may be concluded that cocoon cooking condition and reeling speed have a significant influence on the reeling tension, tenacity and elongation of raw silk. Cooking of the cocoons to the optimum level and selection of proper reeling speed (depending on the cocoon cooking condition and quality of cocoons) are the essential requirements for controlling the reeling tension and for producing raw silk with good tenacity and elongation properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors may wish to thank Mrs Takako Miyazima and Eiko Miyazaki for assistance in testing and analysis.

REFERENCES

- SHIMADA J., OGIWARA K. (1970) Studies on control of raw silk reeling tension. (I) Relation between raw silk reeling tension and tensile strength, elongation and shrinkage of raw silk. *J. Sericult. Sci. Japan*, 39(5), 359-362.
- NAKAGAWA F. (1950) Studies on reeling tension. 1st ed., pp. 24-64, Technical Report No. 23, Sericulture and Silk Board of the Ministry of Agriculture and Forestry, Japan.
- UMEZAWA H., AZUMA T. (1979) Reeling tension and quality of silk. *J. Filature and Silk Tech. Res. Japan*, 19, 31-35.
- TAKABAYASHI C. (1985) Studies on the measurement and control of the state of cooked cocoons in the filature process. *Bull. Sericult. Exp. Sta., Tsukuba*, 29(5), 563-615.
- TAKABAYASHI C. (1993) Dynamic analysis of the exfoliation tension of a cocoon filament and verification by simulation experiment. *J. Sericult. Sci. Japan*, 62(1), 20-29.

INFLUENCE DU MODE DE CUISSON DES COCONS ET DE LA VITESSE DE DEVIDAGE SUR LA TENSION AU DEVIDAGE, LA TENACITE ET L'ALLONGEMENT DE LA SOIE GREGE

SUBHAS V. NAIK¹, C. TAKABAYASHI² & T.H. SOMASHEKAR^{2*}

1. Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore - 560 068, Inde.

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

On a étudié l'influence du mode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage, la ténacité et l'allongement de la soie grège. Cette étude a été réalisée avec des cocons hybrides bivoltins soumis à trois types de cuisson et six vitesses de dévidage. Le type de cuisson et la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la tension au dévidage, la ténacité et l'allongement de la soie grège. On observe une augmentation significative de la tension au dévidage et de la ténacité de la soie grège et une diminution significative de l'allongement de la soie grège lorsque la vitesse de dévidage passe de 60 m/mn. à 160 m/mn. pour les trois types de cuisson. La tension au dévidage des cocons insuffisamment cuits est supérieure à celle des cocons soumis à une cuisson intermédiaire ; la tension au dévidage des cocons soumis à une cuisson excessive est nettement inférieure à celle des cocons soumis à une cuisson intermédiaire, quelle que soit la vitesse de dévidage. Les modes de cuisson insuffisant et excessif affectent l'allongement de la soie grège.

INTRODUCTION

Le maintien et le contrôle de la tension au cours du dévidage dans les normes constituent des processus importants de la technologie du dévidage et ont une influence directe sur la ténacité et l'allongement de la soie grège (Shimada et Ogiwara, 1970). La ténacité et l'allongement étant des propriétés importantes de la soie grège et jouant un rôle prépondérant dans la performance de la soie grège au cours des opérations préparatoires et du tissage, il est indispensable de maîtriser la tension au dévidage.

La tension au dévidage est influencée par de nombreux facteurs : le passage du fil de base dans la dévideuse, la vitesse de dévidage, la longueur de la croisure maintenue au cours du dévidage, la cuisson des cocons, etc. Une série d'expériences sur l'influence de l'angle de croisure et la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage a été réalisée au Japon (Nakagawa, 1950 ; Umezawa et Azuma, 1979). Cependant, on dispose de peu d'informations sur l'influence des variations du mode de cuisson des cocons sur la tension au dévidage et l'allongement de la soie grège. Ce travail de recherche a été réalisé afin d'étudier séparément l'influence du mode de cuisson des cocons et celle de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage, la ténacité et l'allongement de la soie grège.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel de base :

Des cocons hybrides bivoltins de la race Shungetsu × Hosho (cocons de printemps) ont été utilisés pour cette étude.

2. Conditions de séchage :

Les cocons ont été séchés dans un dessiccateur à air chaud en vrac selon un programme de température de 115 °C à 50 °C pendant 5 heures, qui permet un degré de séchage d'environ 43 %.

3. Cuisson des cocons :

La cuisson des cocons a été réalisée dans un appareil à trois bassines. Trois modes de cuisson, cuisson insuffisante, cuisson intermédiaire et cuisson excessive, ont été obtenus en modifiant la température et la durée de cuisson. La température et la durée sélectionnées pour obtenir les différents types de cuisson sont les suivantes :

a. Conditions de rouissage :

Les cocons ont été préalablement traités dans l'eau à 50 °C pendant 1,5 mn.

b. Haute température en vue de l'infiltration :

Après rouissage, les cocons ont été traités à l'eau à 90 °C pendant 1,5 mn.

c. Conditions d'infiltration :

Les cocons ont été immédiatement immergés dans de l'eau à 65 °C pendant 1 mn. afin de permettre l'infiltration de l'eau.

d. Conditions de cuisson :

Après l'infiltration, les cocons ont été cuits à 90 °C pendant 2 mn. pour la cuisson insuffisante, à 95,5 °C pendant 4 mn. pour la cuisson intermédiaire et à 97 °C pendant 8 mn. pour la cuisson excessive.

e. Ajustement de la température et de la durée :

i. Pour les cocons soumis à la cuisson insuffisante, la température a été ramenée de 90 °C à 80 °C progressivement en 2 mn. en ajoutant de l'eau.

ii. Pour les cocons soumis aux cuissons intermédiaire et excessive, la température de cuisson (95,5 °C pour la cuisson intermédiaire et 97 °C pour la cuisson excessive) a été ramenée à environ 94-93 °C progressivement en 1,5 mn. De l'eau a ensuite été ajoutée progressivement pour faire descendre la température à 85 °C en 1 mn. Après avoir maintenu les cocons à 85 °C pendant 2 mn., l'addition d'eau a été augmentée progressivement, faisant ainsi descendre la température à 50 °C en 1,5 mn. Les cocons ont été maintenus à 50 °C pendant 1 mn. puis enlevés de la bassine de cuisson pour le battage. La durée totale de la période d'ajustement est de 7 mn. pour les deux types de cuisson. Une fois terminée, la cuisson a été confirmée par examen visuel et en mesurant le degré de cuisson et le contenu en eau de la coque (Takabayashi, 1985). Les résultats sont présentés dans les figures 1 et 2.

4. Battage :

Les cocons cuits ont été brossés mécaniquement dans de l'eau à 80 °C. L'efficacité de purgeage a été relevée.

5. Dévidage :

Le dévidage des cocons a été réalisé sur une dévideuse automatique permettant de produire du fil de 26/28 deniers en utilisant six vitesses de dévidage. Les vitesses de dévidage sélectionnées sont : 60 m/mn., 80 m/mn., 100 m/mn., 120 m/mn., 140 m/mn. et 160 m/mn.

L'eau de la bassine de dévidage a été maintenue à une température constante de 40 °C et la longueur de la croisure à 8 cm pour toutes les vitesses.

6. Tension au dévidage :

La tension au dévidage a été mesurée à l'aide d'un « instrument de mesure continu de la tension au dévidage » (modèle 1500, fabriqué par Eiko-Sokki, Co. Ltd., Japon) et les graphiques de tension ont été dessinés à l'aide d'un tensiomètre. La tension a été mesurée entre la dernière poulie et la traverse du guindre. La tension du fil a été mesurée d'après les graphiques lorsque le fil est à l'intérieur du tâteur de denier et lorsqu'il est à l'extérieur.

7. Tests :

On a testé la ténacité et l'allongement des échantillons de soie dévidés sur un appareil Tensilon UTM (fabriqué par Shimazu Seisakusho Co. Ltd., Japon). Cinquante échantillons ont été testés pour chaque vitesse de dévidage. Les données relevées ont été soumises à une analyse de variance bidimensionnelle.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses de variance du mode de cuisson des cocons sur le degré de cuisson et le contenu en eau de la coque soyeuse sont présentées dans les tableaux I et II. Les analyses de variance de l'influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage, la ténacité et l'allongement sont données dans les tableaux III et IV.

Influence du mode de cuisson des cocons sur le degré de cuisson :

A la lecture des tableaux I et II et des figures 1 et 2, on observe que le mode de cuisson a une influence significative sur le degré de cuisson des cocons et sur le contenu en eau de la coque soyeuse. On en conclut que les températures et les durées de cuisson sélectionnées pour cette étude donnent effectivement des cuissons insuffisante, intermédiaire et excessive (Takabayashi, 1985). Ceci a été confirmé par examen visuel des cocons.

Influence du mode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la tension au dévidage :

A la lecture des figures 3 et 4, on observe que la tension au dévidage des cocons insuffisamment cuits est supérieure à celle des cocons soumis aux cuissons intermédiaire et excessive, quelle que soit la vitesse de dévidage ; tandis que la tension de dévidage des cocons soumis à une cuisson excessive est nettement inférieure à celles des cocons soumis aux cuissons insuffisante et intermédiaire, quelle que soit la vitesse de dévidage. Les figures 3 et 4 montrent également que l'accroissement de la vitesse de dévidage s'accompagne d'une augmentation de la tension au dévidage, quel que soit le mode de cuisson.

Les tableaux III et IV montrent que la modification du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la tension au dévidage. L'influence du mode de cuisson et celle de la vitesse de dévidage sont significatives au seuil de 1 %. A la lecture de ces tableaux, on observe que la contribution de la vitesse de dévidage à la tension au dévidage est de 14,86 % (lorsque le fil est à l'extérieur du tâteur de deniers, c'est-à-dire lorsque le tâteur est arrêté) et de 21,65 % (lorsque le fil est à l'intérieur du tâteur de deniers, c'est-à-dire lorsqu'il est en marche) ; tandis que la contribution du mode de cuisson sur la tension au dévidage est de 81,08 % (lorsque le tâteur est arrêté) et de 76,29 % (lorsque le tâteur est en marche). Les résultats de l'analyse du rapport de contribution indiquent que l'influence du mode de cuisson des cocons sur la tension au dévidage est supérieure à celle de la vitesse de dévidage (pour les paramètres sélectionnés dans cette étude).

L'augmentation de la tension au dévidage obtenue pour les cocons soumis à la cuisson insuffisante par rapport à celle obtenue pour les cocons soumis aux cuissons intermédiaire et excessive peut être attribuée à un mauvais assouplissement de la sérécine des couches de bave du cocon. Il faut rappeler que le cocon est composé de nombreux (plusieurs centaines de milliers) points de chevauchement entre les couches de bave du cocon qui sont dus à la façon (en forme de 8 ou de S) dont le ver à soie file son cocon. La régularité du dévidage de la bave du cocon sur la coque soyeuse dépend du relâchement de la force d'agglutination entre la bave du cocon et la coque soyeuse,

relâchement obtenu en utilisant les conditions de cuisson les plus adaptées. Si les cocons sont insuffisamment cuits, la sérécine ne sera pas assouplie et gonflée au niveau requis. Du fait de la force d'agglutination entre la bave du cocon et la coque soyeuse, la coque soyeuse ne sera pas réduite au niveau requis, ce qui entraînera une augmentation de la tension au dévidage de la bave.

Une cuisson excessive provoque un assouplissement trop élevé de la sérécine : la force d'agglutination entre la bave du cocon et la coque soyeuse – par extension, la tension à l'exfoliation de la bave du cocon – sera donc inférieure à celle des cocons soumis à une cuisson insuffisante ou intermédiaire. Ainsi, la tension globale au dévidage diminuera pour les cocons soumis à une cuisson excessive. Il convient de noter toutefois que la cuisson excessive entraîne une diminution du rendement en soie grège et affecte certaines caractéristiques qualitatives de la soie grège. Il est donc déconseillé de choisir la cuisson excessive pour diminuer la tension au dévidage.

A la lecture des figures 3 et 4, on observe que l'augmentation de la vitesse de dévidage s'accompagne d'une augmentation de la tension au dévidage. Ceci est dû au fait que, lorsque la vitesse de dévidage augmente, l'oscillation du cocon au cours du dévidage augmente : ce qui entraîne une variation de l'angle d'exfoliation de la bave du cocon. C'est pourquoi la tension à l'exfoliation du cocon augmente, d'où une variation ou une augmentation de la tension générale au dévidage (Takabayashi, 1993). Il existe une relation entre la vitesse de dévidage et la tension au dévidage, comme le montre l'équation suivante (Nakagawa, 1950) :

$$T = A + dV^n$$

T = tension de la soie grège au cours du dévidage (g/10 deniers)

A = tension quelle que soit la vitesse de dévidage (g/10 deniers)

d = coefficient de vitesse (g/10 deniers)

V = vitesse de dévidage (m/mn.)

n = exposant de vitesse

Influence du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage sur la ténacité et l'allongement de la soie grège :

A la lecture des figures 5 et 6, on observe que la ténacité de la soie grège augmente en même temps que la vitesse de dévidage, tandis que l'allongement de la soie grège diminue pour les trois types de cuisson. Ceci peut être attribué au fait que l'augmentation de la vitesse de dévidage entraîne un accroissement de la tension au dévidage (Fig. 3 et 4) : ce qui provoque l'orientation des fibrilles dans la fibroïne de la bave du cocon. Une meilleure orientation des fibrilles dans la fibroïne se traduit par une augmentation de la ténacité et une diminution de l'allongement de la soie grège.

Les tableaux V et VI montrent que la modification du mode de cuisson et de la vitesse de dévidage a une influence significative sur la ténacité et l'allongement de la soie grège. Les données du tableau V révèlent que l'influence de la vitesse de dévidage et celle de la cuisson des cocons sur la ténacité de la soie grège sont significatives aux seuils de 1 % et de 5 % respectivement. La contribution de la vitesse de dévidage sur la ténacité de la soie grège est de 82,83 %, tandis que celle du mode de cuisson est de 5,80 % ; ce qui indique que la vitesse de dévidage a davantage d'impact que le mode de cuisson sur la ténacité de la soie grège. Les données présentées dans le tableau VI montrent que l'influence de la vitesse de dévidage et celle du mode de cuisson sur l'allongement de la soie grège sont significatives au seuil de 1 %. La contribution de la vitesse de dévidage sur l'allongement est de 58,33 %, tandis que la contribution du mode de cuisson est de 23,75 %.

A la lecture de la figure 6, on observe que l'allongement de la soie grège obtenu avec les cocons soumis à une cuisson insuffisante est inférieur à celui obtenu avec les cocons soumis à une cuisson intermédiaire, à toutes les vitesses de dévidage sélectionnées pour cette étude. Ceci est dû au fait que la tension au dévidage des cocons insuffisamment cuits (Fig. 3 et 4) est supérieure à celle des cocons soumis à une cuisson intermédiaire. L'étirement occasionné au cours du dévidage pour la soie grège des cocons insuffisamment cuits est probablement supérieur à celui occasionné pour la soie grège des cocons soumis à une cuisson intermédiaire en raison de la tension de dévidage plus élevée chez les cocons insuffisamment cuits. L'allongement de la soie grège obtenu avec les cocons insuffisamment cuits est donc inférieur à celui obtenu avec les cocons soumis à une cuisson intermédiaire. De plus,

le relâchement de l'étirement dans la soie grège sur le guindre est probablement plus élevé avec les cocons insuffisamment cuits qu'avec les cocons soumis à la cuisson intermédiaire en raison de la tension de dévidage plus forte dans le premier cas. Ceci semble contribuer à la diminution de l'allongement de la soie grège des cocons insuffisamment cuits.

A la lecture de la figure 6, on observe que l'allongement de la soie grège obtenu avec les cocons soumis à la cuisson excessive est également inférieur à celui obtenu avec les cocons soumis à la cuisson intermédiaire, bien que la tension au dévidage obtenue avec les cocons trop cuits (Fig. 3 et 4) soit nettement plus faible que celle obtenue avec les cocons soumis à la cuisson intermédiaire. Ceci peut être attribué au fait que la bave du cocon s'étire facilement dans le cas de la cuisson excessive. La soie grège, trop cuite, des cocons soumis à la cuisson excessive subit un étirement plus important que celle des cocons soumis à la cuisson intermédiaire ; ce qui se traduit probablement par une meilleure orientation des fibrilles dans la fibroïne de la bave des cocons soumis à la cuisson excessive. Ceci pourrait être la cause de la diminution de l'allongement de la soie grège obtenue avec la cuisson excessive.

CONCLUSIONS

De l'analyse qui précède, on en conclut que le mode de cuisson des cocons et la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la tension au dévidage, la ténacité et l'allongement de la soie grège. La cuisson des cocons à un degré optimal et la sélection d'une vitesse de dévidage appropriée (en fonction du mode de cuisson et de la qualité des cocons) sont des conditions indispensables à la maîtrise de la tension au dévidage et à la production d'une soie grège présentant de bonnes propriétés de ténacité et d'allongement.

FACTORS INFLUENCING THE FORMATION OF ADVENTITIOUS BUDS ON MULBERRY COTYLEDONS*

Y. WANG, A.Y. CHEN & G.F. NI

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China.

A good regeneration system is necessary for Agrobacterium-mediated transformation. Mulberry cotyledons are good explants to receive foreign genes carried on Ti plasmid. In order to raise the induction rate of adventitious buds on mulberry cotyledons, factors influencing the formation of adventitious buds were studied by means of orthogonal design. The results showed that, 1) a medium containing MS mineral salts, 8p vitamins, 3.0 mg/l of 6-benzylaminopurine, 0.3 mg/l of indole-3-acetic acid, 30 g/l of fructose or glucose, 500 mg/l of lactalbumine hydrolysate, solidified with 6 g/l of agar powder was most favourable for inducing adventitious buds on mulberry cotyledons, with this medium, the induction rate reached over 80%; 2) during the initial culture of the cotyledons, illumination at an intensity of 500 to 1000 lux is desirable; 3) cotyledons isolated from mulberry seeds that had undergone preculture on 1/2 MS medium for 4 to 6 days led to the highest rate of organogenesis. The adventitious buds formed healthy roots in subculture medium and subsequently rooted well in rooting medium.

Keywords: Mulberry, cotyledon, adventitious bud, induction.

Abbreviations used: BAP: 6-benzylaminopurine, CH: casein hydrolysate, CM: coconut milk, F: fructose, G: glucose, IAA: indole-3-acetic acid, IBA: indolebutyric acid, LH: lactalbumine hydrolysate, MS: Murashige and Skoog's medium, 8p: Kao and Michayluk's medium, S: Sucrose, SH: Schenk and Hildebrandt's medium.

INTRODUCTION

Agrobacterium-mediated gene transfer is an effective method for preparing transgenic plants. There are hundreds of transgenic plants that have been obtained through this method. Plant leaves, cotyledons and hypocotyls are the most frequently used explants in *Agrobacterium*-mediated transformation studies.

Generally, the regeneration rate of plantlets from explants that have been treated with *Agrobacterium* will be reduced. Therefore, in order to have a high transformation frequency, a good regeneration system is required. It was considered that a regeneration rate as high as 80-90% from the explant used for gene introduction is preferable (Jia and Cao, 1992).

In mulberry, the authors reported that mulberry cotyledons could form adventitious buds (Wang *et al.*, 1995). Our recent studies on transient transformation with mulberry young leaves, cotyledons, hypocotyls and stem segments showed that cotyledons are the best explants to receive exotic genes. However, the number of transgenic plants obtained was low due to the low regeneration frequency in cotyledons.

In order to raise the induction rate of adventitious buds on mulberry cotyledons so as to establish a good regeneration system for transgenic studies in mulberry, factors influencing the formation of

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China.

adventitious buds were comparatively studied. The induction rate of adventitious buds on mulberry cotyledons has been increased to 84%.

MATERIALS AND METHODS

Mature seeds of mulberry (*Morus alba* L.) cv. Fengchi were harvested, washed, dried at room temperature and stored at 5 °C in May 1995. For use, they were taken out and soaked in water at room temperature for 24 hours. Then, they were rinsed in tap water for 30 minutes and subsequently sterilised with 70% ethanol for 5 minutes and 0.1% mercury chloride for 15 minutes followed by washing with sterile water 4 times. Finally, they were blotted dry on a sterile filter paper and inoculated onto hormone-free ½ MS medium (Murashige and Skoog, 1962).

The seeds on the ½ MS medium were taken out and dissected to obtain cotyledons under aseptic conditions. The cotyledons were inoculated immediately onto the media or onto two layers of sterile filter paper placed on the media.

The media used to induce adventitious buds on the cotyledons contained MS mineral salts (Table I), different compositions of plant hormones, vitamin preparations, carbohydrates and other additives. Ingredients of vitamin preparations are listed in Table II. Except MS mineral salts, other components were designed according to the orthogonal table L16 (4⁵). The concentrations of different components are listed in Table III.

Table I. Contents of mineral salts of MS medium.

Tableau I. Contenu en sels minéraux du milieu MS.

Mineral salt <i>Sel minéral</i>	Concentration (mg/l) <i>Concentration (mg/)</i>
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ * H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄	0.25
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.3
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27.8

The medium used for the subculture of the adventitious buds was MS medium supplemented with 1.0 mg/l of BAP and 0.5 mg/l of IAA. Rooting medium was ½ MS medium containing 0.5 mg/l of IBA. All the media were solidified with 0.6% agar powder posterior to the adjustment of their pH values to 5.8. Autoclaving was conducted under 121 °C for 15 to 20 minutes.

Table II. Ingredients (in mg/l) of vitamin preparations.**Tableau II. Ingrédients (en mg/l) des préparations vitaminées.**

Ingredient / <i>Ingrédient</i>	MS	SH	B5	8p
Inositol	100	1000	100	100
Nicotinic acid / <i>Acide nicotinique</i>	0.5	5.0	1.0	1.0
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	1.0	1.0
Thiamine HCl	0.1	5.0	10.0	10.0
Glycine	2.0	-	-	-
Calcium pantothenate / <i>Pantothénate de calcium</i>	-	-	-	0.5
Folic acid / <i>Acide folique</i>	-	-	-	0.2
Aminobenzoic acid / <i>Acide aminobenzoïque</i>	-	-	-	0.01
Biotin / <i>Biotine</i>	-	-	-	0.005
Choline chloride / <i>Chlorure de choline</i>	-	-	-	0.5
Riboflavin / <i>Riboflavin</i>	-	-	-	0.1
Vitamin C / <i>Vitamine C</i>	-	-	-	1.0
Vitamin A / <i>Vitamine A</i>	-	-	-	0.005
Vitamin D ₃ / <i>Vitamine D₃</i>	-	-	-	0.005
Vitamin B ₁₂ / <i>Vitamine B₁₂</i>	-	-	-	0.01

Table III. Design of four levels for five different factors.**Tableau III. Composition de quatre niveaux pour cinq facteurs différents.**

Level	BAP (mg/l)	IAA (mg/l)	Vitamin preparation	Carbohydrate (g/l)	Additive (mg/l)
<i>Niveau</i>	<i>BAP</i> (mg/l)	<i>IAA</i> (mg/l)	<i>Préparation vitaminée</i>	<i>Hydrates de carbone (g/l)</i>	<i>Additif (mg/l)</i>
1	0	0	MS	G, 30	0
2	1.0	0.1	SH	F, 30	CM, 30 ml/l
3	2.0	0.3	B5	S, 30	LH, 500
4	3.0	0.5	8p	G, 15; S, 15	CH, 500

Culture of the explants was at 25 ± 1 °C, illumination under 1000-1500 lux with a photoperiod of 12 hours/day.

RESULTS

Influence of medium components on the formation of adventitious buds:

Seeds that had been precultured on the $\frac{1}{2}$ MS medium for 4-5 days were taken to isolate cotyledons. The 16 media prepared according to the design of L16 (4^3) were inoculated with 18-22 cotyledons for each and repeated 3 times.

Two days after the inoculation, all cotyledons turned from milky white to light green in colour and became fully green on the fourth day. Meanwhile, their length increased from 1.5-2 mm to 3.5-4 mm. Two weeks later, some of the explants formed adventitious buds at the base parts. After 4 weeks, the buds grew to 5-8 mm high (Table IV).

Table IV. Development of cotyledons and formation of adventitious buds in different media.

Tableau IV. Développement des cotylédons et formation des bourgeons adventifs en fonction des différents milieux.

Medium No.	Medium component (mg/l)					Induction rate (%)			Average height of adventitious buds (mm)
	BAP	IAA	VP	C(H ₂ O)	Add	1	2	3	
<i>Milieu</i>	<i>Composants du milieu (mg/l)</i>					<i>Taux d'induction (%)</i>			<i>Hauteur moyenne des bourgeons adventifs (mm)</i>
	<i>BAP</i>	<i>IAA</i>	<i>VP</i>	<i>C(H₂O)</i>	<i>Add</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
1	0	0	MS	G	0	0	0	0	-
2	0	0.1	SH	F	CM	0	0	0	-
3	0	0.3	B5	S	LH	0	0	0	-
4	0	0.5	8p	GS	CH	0	0	0	-
5	1.0	0	SH	S	CH	40.0	41.2	42.2	8
6	1.0	0.1	MS	GS	LH	25.0	25.0	30.0	8
7	1.0	0.3	8p	G	CM	50.0	58.3	45.0	8
8	1.0	0.5	B5	F	0	42.8	40.0	30.0	8
9	2.0	0	B5	GS	CM	25.0	27.3	35.0	8
10	2.0	0.1	8p	S	0	38.9	42.9	30.0	8
11	2.0	0.3	MS	F	CH	62.5	43.8	45.0	8
12	2.0	0.5	SH	G	LH	50.0	43.8	30.0	8
13	3.0	0	8p	F	LH	71.4	57.1	73.7	5
14	3.0	0.1	B5	G	CH	41.2	56.3	36.8	5
15	3.0	0.3	SH	GS	0	42.9	50.0	75.0	5
16	3.0	0.5	MS	S	CM	50.0	33.3	52.6	5

VP: vitamin preparation / *préparation vitaminée*. C(H₂O): carbohydrate / *hydrates de carbone*. Add: additive / *additif*.

Table IV indicates that the difference of hormone composition and nutrient content in the medium had an obvious influence on the induction of adventitious buds, among which the concentration of BAP showed the greatest effect. When the medium did not contain BAP, no adventitious bud was induced (Media No. 1-4). As the concentration of BAP rose, the induction rate was increased steadily (Media No. 5-16). Except the additive, other factors were found to have a significant influence on the induction, too (Table V).

In order to determine whether a significant difference between various levels of the same factor existed, the average induction rates of various additions of BAP, IAA, vitamins and carbohydrate, and of each medium were analysed by means of Duncan's new multiple range test. The results are shown in Table VI and Table VII.

Table V. Variance analysis to the effect of medium components on the formation of adventitious buds.

Tableau V. Analyse de variance de l'effet des composants des milieux sur la formation de bourgeons adventifs.

Source of variance	Degree of freedom	Sum of squares	Sum of mean squares	F value
<i>Source de variance</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Somme des carrés moyens</i>	<i>Valeur F</i>
Replication / Réplicat	2	38.38	9.19	0.47
BAP	3	19221.56	6407.19	327.06**
IAA	3	919.99	306.66	15.65**
VP	3	901.19	300.40	15.33**
C(H ₂ O)	3	843.89	281.30	14.36**
Add	3	94.19	31.97	1.60
Error / Ecart	30	587.65	19.59	
Total	47	22586.85		

VP: vitamin preparation / préparation vitaminée. C(H₂O): carbohydrate / hydrates de carbone. Add: additive / additif.

It is shown in Table VI that the addition of BAP at 3.0 mg/l is greatly favourable to the formation of adventitious buds. Its average induction rate was significantly higher than BAP at 1.0 or 2.0 mg/l, while the average induction rates of the media where no BAP was included were significantly lower than those which contained BAP. Among 4 levels of IAA addition, 0.1 mg/l yielded the lowest result whereas 0.3 mg/l yielded a remarkably higher result than the rest. Of the 4 vitamin preparations, 8p showed the best results followed by SH, both of which had extremely significant high induction rates over MS and B5. Concerning carbohydrate, fructose was the best. Its average induction rate was significantly higher than the other. Meanwhile, glucose also showed good results to the induction. Its average induction rate was not significantly lower than that of fructose. Their average induction rates were significantly higher than those of sucrose and sucrose-glucose combination. The inclusion of certain additive such as CM, CH and LH had no significant influence on the induction, yet an order of the induction rates was given as 35.08%, 34.08%, 32.71% and 31.88% for LH, CH, CM and no additives, respectively.

Among the 16 media, No. 13 and No. 15 were the best. Their average induction rates reached 67.4% and 60.0%, respectively, significantly higher than other media. No. 7 and No. 11 took the second place, their average induction rates were significantly higher than those of No. 5, No. 8 and No. 10. Of all the media, No. 1-4 were the worst in which no adventitious bud was induced. The rates of media No. 6 and No. 9 were relatively low, only 26.7% and 29.1%, respectively. Those of No. 12, No. 14 and No. 16 were slightly lower than those of No. 7 and No. 11, and were slightly higher than those of No. 5, No. 8 and No. 10.

Table VI. New multiple range test to the average induction rates of BAP, IAA, vitamin preparation and carbohydrate.

Tableau VI. Nouveau test multiple pour les taux moyens d'induction du BAP, de l'IAA, des préparations vitaminées et des hydrates de carbone.

Factor	Level	Average induction rate (%)	Significance	
			P = 0.05	P = 0.01
<i>Facteur</i>	<i>Niveau</i>	<i>Taux moyen d'induction (%)</i>	<i>Signification</i>	
			<i>P = 0,05</i>	<i>P = 0,01</i>
BAP (mg/l)	3.0	54.36	a	A
	2.0	40.77	b	B
	1.0	39.13	b	B
	0	0	c	C
IAA / AIA (mg/l)	0.3	39.38	a	A
	0	34.41	b	B
	0.5	32.29	b	B
	0.1	27.18	c	C
VP	8p	38.94	a	A
	SH	35.84	a	A
	MS	30.60	b	B
	BS	27.87	b	B
C(H ₂ O)	F	38.86	a	A
	G	35.53	b	A
	S	30.93	c	B
	GS	27.93	c	B

VP: vitamin preparation / *préparation vitaminée*. C(H₂O): carbohydrate / *hydrates de carbone*.

To sum up, the optimum combination of the factors for inducing adventitious buds from mulberry cotyledons is BAP 3.0 mg/l, IAA 0.3 mg/l, 8p vitamin preparation, fructose 30 g/l and LH 500 mg/l, among which fructose may be substituted with glucose owing to the high cost (the price of fructose is about 30 times to that of glucose) and the slight difference in their effect (not significant at the P=0.01 level). The further comparison test of these two sugars also proved this (Table VIII). In Table VIII, although the average induction rate of glucose was lower than that of fructose, it reached 80%. Hence, when enormous explants are used, the inclusion of glucose may be a good choice.

Influence of illumination during the initial culture on the formation of adventitious buds:

In *Agrobacterium*-mediated transformation operations, a coculture of *Agrobacterium* with the explant is required. The coculture is normally conducted on a medium with one or two layers of filter paper and requires approximately 3-4 days. Within these days, the development of the explant is very important to the forthcoming transformation. It is understood that the tissue with vigorous cell division is likely to receive exotic genes and regenerate transgenic plantlets.

Table VII. New multiple range test to the average induction rate of different media.

Tableau VII. Nouveau test multiple pour les taux moyens d'induction en fonction des différents milieux.

Medium No.	Average induction rate (%)	Significance	
		P = 0.05	P = 0.01
<i>Milieu</i>	<i>Taux moyen d'induction (%)</i>	<i>Signification</i>	
		P = 0,05	P = 0,01
13	67.4	a	A
15	60.0	b	AB
7	51.1	c	B
11	50.4	c	B
12	46.3	cd	BC
16	45.3	cd	BC
14	44.8	cd	BC
5	41.1	d	BC
8	41.1	d	C
10	37.3	d	C
9	29.1	e	D
6	26.7	e	D
1	0	f	E
2	0	f	E
3	0	f	E
4	0	f	E

As we have observed, the newly isolated mulberry cotyledons are milky white and turn fully green after 4 days if they are put under light. From this, we understand that illumination during the initial culture of mulberry cotyledons is of vital importance to the formation of chloroplasts. In order to find out the adequate illumination for the initial culture of mulberry cotyledons, we inoculated mulberry cotyledons onto the medium placed with two layers of filter paper and put them under illumination with light intensities of 0, 500, 1000, 2000 and 3000 lux, respectively for 4 days, and then transferred them onto fresh medium to induce adventitious buds. Twenty cotyledons were used for each treatment. Development of the explant and the formation of adventitious buds were observed and recorded (Table IX).

Table IX indicates that illumination under 1000 lux was the most favourable to the formation of adventitious buds followed by 500 lux, dark, 2000 lux and 3000 lux. Dark condition seemed favourable to the initial development. Four days after the inoculation, the explant grew to 3.9 mm, whereas those under light ranged from 3.6-3.8 mm. The reason may be that under dark condition cotyledons did not become green thus the nutrients absorbed were mainly used for vegetative growth, whereas under light condition cotyledons turned green, thus a part of the nutrients absorbed were used for differential growth. Vegetative growth was relatively slower.

After the explants were transferred onto the fresh medium and put under illumination under 1500 lux, the growth of dark-treated cotyledons slowed down. They were only 7.2 mm on the 30th day, 1.8-2.5 mm shorter than those from other treatments. Cotyledons from the 2000 and 3000 lux treatments grew the fastest. They reached 9.4-9.7 mm at day 30. However, their induction rates,

30%-35%, were not the highest. Cotyledons from 500 and 1000 lux treatments led to the highest rates of organogenesis (47.4% and 60.0% respectively) with the length of 9.0-9.1 mm. It appears that in order to induce adventitious buds from mulberry cotyledons, a moderate vegetative growth is to be maintained. A too fast or too slow growth of the explant is equally unfavourable to the differentiation.

Table VIII. The induction rates under favourable conditions.

Tableau VIII. Taux d'induction obtenus dans des conditions favorables.

Carbohydrate used	Replication	Number of cotyledons inoculated	Number of cotyledons forming adventitious buds	Induction rate (%)	Average induction rate (%)
<i>Hydrates de carbone utilisés</i>	<i>Répétition</i>	<i>Nombre de cotylédons inoculés</i>	<i>Nombre de cotylédons formant des bourgeons adventifs</i>	<i>Taux d'induction (%)</i>	<i>Taux moyen d'induction (%)</i>
Fructose 30 g/l	1	38	33	86.8	84.0
	2	42	36	85.7	
	3	44	35	79.5	
Glucose 30 g/l	1	40	30	75.0	80.3
	2	42	35	83.3	
	3	40	33	82.5	

Other ingredients of the media were MS mineral salts, 8p vitamin preparation, BAP 3.0 mg/l, IAA 0.3 mg/l, LH 500 mg/l and agar powder 6 g/l with a pH value of 5.8 prior to autoclaving. Culture period: 30 days.

Autres ingrédients entrant dans la composition des milieux : MS sels minéraux, 8p préparation vitaminée, BAP 3,0 mg/l, AIA 0,3 mg/l, LH 500 mg/l et poudre d'agar 6 g/l, pH 5,8 avant stérilisation à l'autoclave. Durée de la culture : 30 jours.

Influence of preculture of mulberry seeds on the formation of adventitious buds:

To determine the influence of preculture of the seeds on the formation of adventitious buds, we used mulberry seeds that had been precultured on ½ MS medium for 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 and 20 days to isolate cotyledons and observed the formation of adventitious buds on them (Table X).

It can be seen in Table X that the cotyledons from seeds precultured for various days had different potential to form adventitious buds. In general, when the preculture lasted fewer days (e.g. 0-8 days), the induction rates were relatively high (55.6-70.0%). When the preculture took more than 10 days, the induction rate was obviously reduced. It was only 10% when seeds were precultured for 16 and 20 days. Judging from the size and colour of the cotyledons used, those which were relatively small (1.5-2.5 mm) and had not yet turned green (e.g. preculture of 0-8 days) were more likely to form adventitious buds. When cotyledons grew bigger (3.0-10 mm) and turned greenish or green (e.g. preculture of 10-20 days), the formation of adventitious buds was difficult. Of all the treatments, 4-6 days of preculture gave the best result. Although the induction rate was the highest when seeds were directly used to isolate the explant, a few cotyledons were contaminated. This was due to the difficulty to eliminate all microorganisms during surface sterilisation. To avoid this problem, seeds

that had been precultured for 4 days were used. Another advantage of it was that the seed shells were ruptured, allowing easier dissection. If seeds that had been precultured less than 4 days were used, it was more difficult to isolate cotyledons and contamination often occurred.

Table IX. Influence of illumination during the initial culture on the formation of adventitious buds.

Tableau IX. Influence de la luminosité au cours de la culture initiale sur la formation de bourgeons adventifs.

Light intensity from day 1 to day 4 (lux)	At day 4		Light intensity from day 5 to day 30 (lux)	At day 30	
	Colour of cotyledons	Length of cotyledons (mm) (mean $\pm$ SE)		Length of cotyledons (mean $\pm$ SE)	Induction rate (%)
<i>Intensité lumineuse du jour 1 au jour 4 (lux)</i>	<i>Après 4 jours</i>		<i>Intensité lumineuse du jour 5 au jour 30 (lux)</i>	<i>Après 30 jours</i>	
	<i>Couleur des cotylédons</i>	<i>Longueur des cotylédons (mm) (moyenne $\pm$ SE)</i>		<i>Longueur des cotylédons (moyenne $\pm$ SE)</i>	<i>Taux d'induction (%)</i>
0	Y	3.9 $\pm$ 0.1	1500	7.2 $\pm$ 0.4	42.1
500	G	3.8 $\pm$ 0.2	1500	9.1 $\pm$ 0.5	47.4
1000	G	3.8 $\pm$ 0.2	1500	9.0 $\pm$ 0.4	60.0
2000	G	3.6 $\pm$ 0.2	1500	9.7 $\pm$ 0.5	35.0
3000	G	3.6 $\pm$ 0.2	1500	9.4 $\pm$ 0.4	30.0

SE: Standard error / *Ecart type*. Y: Yellow / *Jaune*. G: Green / *Vert*.

The medium contained MS mineral salts and vitamins, BAP 3.0 mg/l, IAA 0.1 mg/l and glucose 30 g/l, solidified with 6 g/l agar powder.

Ce milieu contient des sels minéraux MS et des vitamines, du BAP 3,0 mg/l, de l'IAA 0,1 mg/l et du glucose 30 g/l et est solidifié avec 6 g/l de poudre d'agar.

Subculture of the adventitious buds and regeneration of the plantlets:

The adventitious buds obtained from the above culture were transferred onto subculture medium. Most of them grew to 3 cm high after 30-40 days and were consequently transferred onto rooting medium. All shoots rooted well and formed healthy root systems after another 30-40 days. After being transplanted into the soil, all the regenerated plantlets developed well.

DISCUSSION

In this experiment, the influence of factors such as concentrations of BAP, IAA, vitamin preparations, carbohydrates and some other additives on the formation of adventitious buds from mulberry cotyledons were studied through L16 (4³) orthogonal design. The optimum conditions that could result in an induction rate of 84% were determined. Thus, a good regeneration system has been established for transgenic studies in mulberry. With this system, we have increased the transformation frequency considerably in our transgenic studies.

Table X. Influence of preculture of the seeds on the formation of adventitious buds from mulberry cotyledons.**Tableau X. Influence de la préculture des graines sur la formation de bourgeons adventifs à partir de cotylédons de mûrier.**

Days of preculture	While inoculated		Number of cotyledons inoculated	Number of cotyledons contaminated	Number of cotyledons forming adventitious buds	Induction rate (%)
	Length of cotyledons (mm)	Colour of cotyledons				
Jours de préculture	Pendant l'inoculation		Nombre de cotylédons inoculés	Nombre de cotylédons contaminés	Nombre de cotylédons formant des bourgeons adventifs	Taux d'induction (%)
	Longueur des cotylédons (mm)	Couleur des cotylédons				
0	1.5-2.0	MW	20	5	14	70.0 (93.3)
2	1.5-2.0	MW	20	3	12	60.0 (70.6)
4	1.5-2.0	MW	18	0	12	66.7
6	1.5-2.0	MW	20	0	14	70.0
8	2.0-2.5	Y	18	0	10	55.6
10	3.0-3.5	GS	18	0	7	38.9
12	7.0-9.0	G	20	0	4	20.0
16	9.5-10.0	G	20	0	2	10.0
20	9.5-10.0	G	20	0	2	10.0

MW: Milky white / Blanc laiteux. Y: Yellowish / Jaunâtre. GS: Greenish / Verdâtre. G: Green / Vert.

The medium contained MS mineral salts, 8p vitamin preparation, BAP 3.0 mg/l, IAA 0.3 mg/l, fructose 30 g/l, LH 500 mg/l and agar powder 6g/l (pH 5.8). Figures in brackets under the column 'Induction rate' are calculated based on the number of non-contaminated cotyledons. Culture period: 30 days.

Ce milieu contient : sels minéraux MS, préparation vitaminée 8p, BAP 3,0 mg/l, AIA 0,3 mg/l, fructose 30 g/l, LH 500 mg/l et poudre d'agar 6 g/l (pH 5,8). Les chiffres entre parenthèses dans la colonne « Taux d'induction » ont été calculés sur la base du nombre de cotylédons non contaminés. Durée de la culture : 30 jours.

In this study, mature mulberry seeds were used. This helps to avoid the unavailability of the materials as it often happens when immature mulberry seeds are used. Although cotyledons isolated from immature seeds have a higher potential to form adventitious buds (Wang *et al.*, 1995, and unpublished), the seeds are available only in the middle of May and are not supposed to be stored, whereas the mature seeds can be stored under 5 °C for 1 to 2 years and be used at any time, being a good material for genetic transformation studies.

Based on these results, it is considered that the developmental state of cotyledons has a close relation to the formation of adventitious buds. For instance, when cotyledons were isolated from seeds that had been precultured for 10-20 days, their induction rates were quite low (Table X). At that time, the cotyledons had turned greenish or green, implying that they had completed the development and production of chloroplasts and had become a partially differentiated explant. When seeds that had been precultured for less than 8 days were used, the cotyledons were still milky white or yellowish, their cells and tissues were not differentiated compared to the green cotyledons. Thus, they were more likely to respond to the induction of nutritional and environmental factors, and to develop and differentiate in the direction we expected. The illumination test might also prove this point. The

induction rates were lower when the explants were exposed to 2000-3000 lux light (Table IX). It was most possibly because under the strong light enormous chloroplasts formed in the cotyledons and resulted in fast vegetative growth as if the explants had been still *in planta*.

Additionally, based on the results of vitamin preparations and carbohydrates, it is considered that the induction of adventitious buds requires rich and easy-to-absorb organic substances. For example, 8p vitamin preparation is a mixture of 14 substances such as biotin, choline chloride, aminobenzoic acid and calcium pantothenate. Its average induction rate was the highest. SH vitamin preparation contains inositol 10 times to MS and B5 media do. Its average induction rate was also high. Both fructose and glucose are monosaccharose. They can be absorbed and utilised directly by the explant. They led to higher rates of organogenesis (Table VI). LH, CH and CM are proteins with relatively complex components. They are difficult to be absorbed and utilised by the cotyledons. Thus, the addition of them had no significant influence on the formation of adventitious buds. However, they can stabilise the pH value in the medium. Therefore, an adequate amount of LH may be added to the medium.

It was observed that as the concentration of BAP increased, the average induction rate also rose. However, when BAP was increased to 3.0 mg/l, the adventitious buds were shorter than those from 1.0-2.0 mg/l BAP. Subculturing of the buds also showed that those from the treatment of BAP 3.0 mg/l grew slower than the others. Therefore, the concentration of BAP to be used can be decided according to different objectives. If one expects to obtain adventitious buds, 3.0 mg/l of BAP may be used; while a certain number of adventitious buds and early regeneration of plantlets are expected, adoption of BAP at 1.0-2.0 is recommended.

Although we have examined the above factors, there are still many others remaining for further studies. Firstly, besides IAA, what is the influence of other auxins such as NAA (α -naphthylacetic acid)? Then, can the induction rate be further increased by using other cytokinins such as KT (kinetin) and ZT (zeatin) or by employing different combinations of hormones? In addition, concerning the influence of illumination, our experiment has only dealt with its influence during the initial culture period. No test was conducted on its influence in the whole process of organogenesis. A more complete experiment may also consider the influence of different temperatures and photoperiods on the formation of adventitious buds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Prof. Y.L. Pan and Prof. M.B. Zhang, mulberry breeders of this Institute, for their kind presentation of the mulberry seeds for this study.

REFERENCES

- GAMBORG O.L., WETTER, L.R. (1975) Callus and cell culture. *In* Plant Tissue Culture Methods. pp. 1-9. National Research Council of Canada, Saskatoon.
- JIA S.R., CAO D.S. (1992) Transgenic plants. *Chinese Bull. Botany*, 9(2), 3-15.
- KAO K.N., MICHAYLUK M.R. (1975) Nutritional requirements for the growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126, 105-110.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- SCHENK R.U., HILDEBRANDT A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Botany*, 50, 199-204.
- WANG Y., CHEN A.Y., NI G.F. (1995) Adventitious bud formation and plant regeneration from mulberry cotyledons. *Canye Kexue*, 21, 122-123.

FACTEURS INFLUENCANT LA FORMATION DE BOURGEONS ADVENTIFS SUR LES COTYLEDONS DE MURIER*

Y. WANG, A.Y. CHEN & G.F. NI

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, Chine.

*Un système de régénération efficace est nécessaire à la transformation génétique induite par **Agrobacterium**. Les cotylédons de mûrier sont de bons explants pour recevoir des gènes étrangers transférés par le plasmide Ti. Afin d'améliorer le taux d'induction de bourgeons adventifs sur les cotylédons de mûrier, on a étudié les facteurs influençant la formation de cotylédons de mûrier suivant un plan orthogonal. Les résultats mettent en évidence les points suivants : 1) un milieu contenant des sels minéraux MS, des vitamines 8p, 3,0 mg/l de 6-benzylaminopurine, 0,3 mg/l d'acide indol-3-acétique, 30 g/l de fructose ou de glucose, 500 mg/l d'hydrolysate de lactalbumine, solidifié avec 6 g/l de poudre d'agar est tout à fait favorable à l'induction de bourgeons adventifs sur les cotylédons de mûrier ; ce milieu permet d'obtenir un taux d'induction de plus de 80 % ; 2) une luminosité de 500 à 1 000 lux est souhaitable pendant la culture initiale des cotylédons ; 3) les cotylédons isolés à partir de semences de mûrier soumises à une préculture sur un milieu MS ½ pendant 4 à 6 jours donnent le taux d'organogenèse maximal. Les bourgeons adventifs forment des racines saines dans le milieu de sous-culture et racinent bien dans le milieu de racinement.*

Abréviation utilisées : BAP : 6-benzylaminopurine, CH : hydrolysate de caséine, CM : lait de coco ; F : fructose, G : glucose, AIA : acide indol-3-acétique, AIB : acide indolbutyrique, LH : hydrolysate de lactalbumine, MS : milieu de Murashige et Skoog, 8p : milieu de Kao et Michayluk, S : saccharose, SH : milieu de Schenk et Hildebrandt.

INTRODUCTION

Le transfert des gènes à l'aide d'*Agrobacterium* est une méthode efficace pour préparer des plants transgéniques. Des centaines de plants transgéniques ont été obtenus par cette méthode. Les explants les plus couramment utilisés dans les études de transformation à l'aide d'*Agrobacterium* sont les feuilles, les cotylédons et les hypocotyles.

En général, le taux de régénération des plantules diminue lorsque les explants sont préalablement traités avec *Agrobacterium*. Il est donc nécessaire, si l'on souhaite obtenir un taux de transformation élevé, de disposer d'un système adéquat de régénération. Il est admis que le taux de régénération doit atteindre 80 à 90 % pour des explants utilisés pour l'introduction de gènes (Jia et Cao, 1992).

Les auteurs ont observé que les cotylédons de mûrier peuvent former des bourgeons adventifs (Wang et coll., 1995). Nos études récentes sur la transformation transitoire de jeunes feuilles, de cotylédons, d'hypocotyles et de fragments de tiges de mûrier ont montré que les cotylédons sont les explants les plus adaptés pour recevoir des gènes exotiques. Cependant, le nombre de plants transgéniques obtenus est faible en raison d'une fréquence de régénération médiocre des cotylédons.

Afin d'améliorer le taux d'induction de bourgeons adventifs sur les cotylédons de mûrier et de mettre au point un système de régénération adapté à la transgénèse chez le mûrier, les facteurs

* Projet financé par la Fondation des sciences naturelles de Chine.

influençant la formation de bourgeons adventifs ont été soumis à une étude comparative. Le taux d'induction des bourgeons adventifs sur les cotylédons de mûrier a pu être porté à 84 %.

MATERIELS ET METHODES

Des graines matures de mûrier (*Morus alba* L.) cv. Fengchi ont été récoltées, lavées, séchées à température ambiante et stockées à 5 °C en mai 1995. Pour les expériences, elles ont été prélevées et trempées dans l'eau à température ambiante pendant 24 heures. Elles ont ensuite été rincées à l'eau du robinet pendant 30 minutes puis stérilisées avec de l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes et du chlorure de mercure à 0,1 % pendant 15 minutes avant d'être lavées à l'eau stérile quatre fois. Elles ont enfin été séchées avec un papier filtre stérile et inoculées sur un milieu MS ½ sans hormones (Murashige et Skoog, 1962).

Les graines déposées sur le milieu MS ½ ont été prélevées et disséquées afin d'obtenir les cotylédons dans des conditions stériles. Les cotylédons ont été inoculés immédiatement dans les milieux ou sur deux couches de papier filtre stérile placé sur les milieux.

Les milieux utilisés pour l'induction des bourgeons adventifs sur les cotylédons contiennent des sels minéraux MS (Tableau I), différentes compositions d'hormones végétales, de préparation vitaminées, d'hydrates de carbone et autres additifs. Les ingrédients des préparations vitaminées sont décrits dans le tableau II. A l'exception des sels minéraux MS, les composants ont été dosés selon le plan orthogonal L16 (4³). Les concentrations des différents composants sont données dans le tableau III.

La sous-culture des bourgeons adventifs a été effectuée dans un milieu MS additionné de 1,0 mg/l de BAP et de 5 mg/l d'AIA. Le milieu de racinement est le milieu MS ½ contenant 0,5 mg/l d'AIB. Tous les milieux ont été solidifiés avec 0,6 % de poudre d'agar après ajustement des pH à 5,8. La stérilisation à l'autoclave a été réalisée à 121 °C pendant 15 à 20 minutes.

Les explants ont été cultivés à 25 ± 1 °C, sous une luminosité de 1 000 à 1 500 lux et une photopériode de 12 heures/jour.

RESULTATS

Influence des composants du milieu sur la formation de bourgeons adventifs :

Les graines pré-cultivées sur le milieu MS ½ pendant 4 à 5 jours ont été prélevées pour isoler les cotylédons. Les 16 milieux préparés selon le plan L16 (4³) ont été inoculés avec 18 à 22 cotylédons chacun et ceci a été répété trois fois.

Deux jours après l'inoculation, tous les cotylédons passent d'une couleur blanc laiteux à une couleur vert clair et deviennent entièrement verts le quatrième jour. Dans l'intervalle, leur longueur augmente de 1,5-2 mm à 3,5-4 mm. Deux semaines plus tard, certains des explants forment des bourgeons adventifs sur les parties basales. Après 4 semaines, les bourgeons atteignent une hauteur de 5 à 8 mm (Tableau IV).

Le tableau IV montre que les différences de compositions hormonales et de contenus en éléments nutritifs ont une influence évidente sur l'induction de bourgeons adventifs ; parmi ceux-ci, la concentration en BAP donne l'effet maximal. Lorsque le milieu ne contient pas BAP, aucun bourgeon adventif n'est induit (milieux 1 à 4). L'augmentation de la concentration en BAP entraîne une hausse régulière du taux d'induction (milieux 5 à 16). Les autres facteurs, à l'exception de l'additif, ont également une influence significative sur l'induction (Tableau V).

Afin de déterminer une éventuelle différence significative entre les différentes concentrations pour un même facteur, les taux d'inductions moyens des différentes suppléments de BAP, d'AIA, de vitamines et d'hydrates de carbone ainsi que ceux de chacun des milieux ont été analysés selon le test de Duncan. Les résultats sont présentés dans les tableaux VI et VII.

Le tableau VI montre que l'addition de BAP à 3,0 mg/l favorise fortement la formation de bourgeons adventifs. Le taux d'induction est nettement plus élevé que celui obtenu avec le BAP à 1,0 ou 2,0 mg/l, tandis que les taux d'induction moyens des milieux ne contenant pas de BAP sont nettement plus faibles que ceux contenant du BAP. Sur les quatre concentrations d'AIA, la concentration à 0,1 mg/l donne le résultat le plus faible tandis que la concentration à 0,3 mg/l donne

un résultat nettement supérieur aux autres. Sur les quatre préparations vitaminées, la 8p donne les meilleurs résultats, juste devant SH ; ces deux milieux donnant des taux d'induction fortement significatifs par rapport à MS et B5. Pour ce qui concerne les hydrates de carbone, le fructose donne les meilleurs résultats ; son taux d'induction est nettement supérieur aux autres. Cependant, le glucose donne également de bons résultats, le taux d'induction obtenu n'étant pas significativement inférieur à celui obtenu avec le fructose. Le taux d'induction obtenu avec ces deux composants est significativement supérieur à celui obtenu avec le saccharose et la combinaison saccharose-glucose. L'apport de certains additifs comme le CM, le CH et LH n'ont pas d'influence significative sur l'induction, toutefois les taux d'induction obtenus sont, par ordre croissant, 35,08 %, 34,08 %, 32,71 % et 31,88 % respectivement pour LH, CH, CM et sans additif.

Sur les 16 milieux, les milieux 13 et 15 donnent les meilleurs résultats ; ils entraînent des taux d'induction atteignant respectivement 67,4 % et 60,0 % ; taux significativement supérieurs à ceux obtenus pour les autres milieux. Les milieux 7 et 11 viennent en deuxième position avec des taux d'induction significativement supérieurs à ceux obtenus pour les milieux 5, 8 et 10. Sur l'ensemble des milieux, les milieux 1 à 4 sont les plus médiocres car ils ne donnent aucun bourgeon adventif. Les taux d'induction obtenus pour les milieux 6 et 9 sont relativement faibles, seulement 26,7 % et 29,1 % respectivement. Ceux obtenus pour les milieux 12, 14 et 16 sont légèrement inférieurs à ceux des milieux 7 et 11 et légèrement supérieurs à ceux des milieux 5, 8 et 10.

En conclusion, la combinaison optimale des facteurs induisant la formation de bourgeons adventifs à partir de cotylédons de mûrier est donc : BAP 3,0 mg/l, AIA 0,3 mg/l, préparation vitaminée 8p, fructose 30 g/l et LH 500 mg/l ; étant donné son coût élevé, le fructose peut être remplacé par du glucose (le fructose est environ 30 fois plus cher que le glucose) car leurs effets respectifs ne présentent pas de différence significative (non significatif au seuil de $P = 0,01$), comme le montre le test de comparaison de ces deux sucres (Tableau VIII). Dans le tableau VIII, bien que le taux d'induction moyen obtenu pour le glucose soit inférieur à celui du fructose, il atteint 80 %. Aussi, lorsque l'on utilise de très grands explants, il peut être judicieux d'utiliser le glucose comme apport.

Influence de l'illumination au cours des cultures initiales sur la formation de bourgeons adventifs :

Dans les manipulations de transformation utilisant *Agrobacterium*, il est nécessaire de réaliser une co-culture d'*Agrobacterium* et de l'explant. Cette co-culture s'effectue normalement sur un milieu comportant une à deux couches de papier filtre pendant 3 à 4 jours. Durant ce laps de temps, le développement de l'explant est très important pour la transformation future. On suppose que le tissu présentant une division cellulaire active est susceptible de recevoir des gènes exotiques et de régénérer les plantules transgéniques.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les cotylédons de mûrier récemment isolés sont blanc laiteux et virent au vert après 4 jours s'ils sont exposés à la lumière. Il apparaît donc que l'intensité lumineuse au cours de la culture initiale des cotylédons de mûrier est d'importance capitale pour la formation des chloroplastes. Afin de déterminer le degré de luminosité nécessaire lors de leur culture initiale, nous avons inoculé des cotylédons de mûrier sur un milieu comportant deux couches de papier filtre et les avons exposés à des intensités lumineuses de 0, 500, 1 000, 2 000 et 3 000 lux pendant 4 jours et les avons transféré sur un nouveau milieu pour l'induction des bourgeons adventifs. Vingt cotylédons ont été utilisés pour chaque traitement. Le développement de l'explant et la formation des bourgeons adventifs ont été observés et relevés (Tableau IX).

Le tableau IX indique que l'intensité lumineuse de 1 000 lux est la plus favorable à la formation des bourgeons adventifs, devant les intensités de 500 lux, 0 lux (obscurité), 2 000 lux et 3 000 lux. L'obscurité semble favorable au développement initial. Quatre jours après l'inoculation, l'explant atteint une taille de 3,9 mm, tandis que ceux exposés à la lumière atteignent 3,6 à 3,8 mm. Ceci pourrait être dû au fait que, dans l'obscurité, les cotylédons ne verdissent pas, les éléments nutritifs absorbés sont essentiellement utilisés pour la croissance végétative, tandis que les cotylédons exposés à la lumière deviennent verts et, de ce fait, une partie des éléments nutritifs absorbés est utilisée pour la croissance différentielle. La croissance végétative est relativement plus lente.

Après transfert des explants sur le nouveau milieu et exposition à une intensité lumineuse de 1 500 lux, la croissance des cotylédons placés dans l'obscurité ralentit. Ils mesurent seulement 7,2 mm

au 30^e jour et sont de 1,8 à 2,5 mm plus courts que les cotylédons des autres traitements. La croissance est maximale chez les cotylédons exposés à 2 000 et 3 000 lux : ils atteignent entre 9,4 et 9,7 mm au 30^e jour. Cependant, le taux d'induction obtenu avec ces traitements, entre 30 et 35 %, n'est pas maximal. Les cotylédons exposés à 500 et à 1 000 lux donnent les taux d'organogenèse les plus élevés (respectivement 47,4 % et 60,0 %) avec une longueur de 9,0 à 9,1 mm. Il apparaît que, pour induire des bourgeons adventifs à partir de cotylédons de mûrier, il est nécessaire de maintenir une croissance modérée. Une croissance trop lente ou trop rapide des explants est défavorable à la différenciation.

Influence de la préculture des graines de mûrier sur la formation des bourgeons adventifs :

Afin de déterminer l'influence de la préculture des graines sur la formation des bourgeons adventifs, nous avons utilisé des graines de mûrier préalablement cultivées sur un milieu MS $\frac{1}{2}$ pendant 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 et 20 jours pour isoler les cotylédons et nous avons observé la formation des bourgeons adventifs sur ces cotylédons (Tableau X).

On observe, à la lecture du tableau X, que les cotylédons des graines préculтивées pendant différentes durées présentent des variations de potentiel de formation des bourgeons adventifs. En général, lorsque la préculture ne dure que quelques jours (0 à 8 jours), les taux d'induction sont relativement élevés (55,6 à 70,0 %). Lorsque la préculture dure plus de 10 jours, le taux d'induction diminue de manière évidente : il ne dépasse pas 10 % lorsque les graines sont préculтивées pendant 16 et 20 jours. A en juger par la taille et la couleur des cotylédons utilisés, ceux qui sont relativement petits (1,5 à 2,5 mm) et n'ont pas encore viré au vert (précultures de 0 à 8 jours) sont les plus susceptibles de former des bourgeons adventifs. Lorsque les cotylédons atteignent une taille plus importante (3,0 à 10 mm) et virent au verdâtre ou au vert (précultures de 10 à 20 jours), la formation des bourgeons adventifs devient difficile. Sur l'ensemble des traitements, les précultures de 4 à 6 jours donnent les meilleurs résultats. Bien que le taux d'induction soit maximal lorsque les graines sont utilisées directement pour isoler l'explant, quelques cotylédons sont contaminés : ceci est dû à la difficulté d'élimination de tous les micro-organismes au cours de la stérilisation de surface. Pour éviter ce problème, on a utilisé des graines préculтивées pendant 4 jours. Cette méthode a également l'avantage de fendre les enveloppes des graines : ce qui facilite la dissection. Si l'on utilise des graines préculтивées sur une durée inférieure à 4 jours, il est plus difficile d'isoler les cotylédons et il y a risque de contamination.

Sous-culture des bourgeons adventifs et régénération des plantules :

Les bourgeons adventifs obtenus à l'aide de cette culture ont été transférés sur le milieu de sous-culture. La plupart d'entre eux ont atteint 3 cm en 30 à 40 jours et ont été ensuite transférés sur milieu de racinement. Toutes les pousses racinent bien et forment des systèmes racinaires sains après 30 à 40 jours. Après transplantation dans le sol, toutes les plantules régénérées se sont bien développées.

DISCUSSION

Dans cette expérience, l'influence de facteurs tels que la concentration en BAP, en AIA, en préparations vitaminées, en hydrates de carbone et en certains autres additifs sur la formation des bourgeons adventifs à partir de cotylédons de mûrier a été étudiée selon le plan orthogonal L16 (4^2). Les conditions optimales permettant un taux d'induction de 84 % ont été déterminées. Il a ainsi été possible de mettre au point un système de régénération adapté à la transgénèse chez le mûrier. Nous avons pu, par ce système, améliorer fortement la fréquence de transformation dans nos études transgéniques.

Dans cette étude, nous avons utilisé des graines de mûrier matures. Ceci permet d'éviter le manque de matériels, comme cela se produit souvent lorsque l'on utilise des graines de mûrier immatures. Bien que les cotylédons utilisés à partir de graines immatures aient un potentiel plus élevé pour former des bourgeons adventifs (Wang et coll., 1995, et non publié), ces graines ne sont disponibles que vers le milieu du mois de mai et ne se conservent pas, tandis que les graines matures, qui peuvent être stockées à 5 °C pendant 1 à 2 ans et utilisées à n'importe quel moment, forment un matériel approprié pour les études de transformation génétique.

Sur la base de ces résultats, nous pensons que la phase de développement des cotylédons est en étroite relation avec la formation des bourgeons adventifs. Par exemple, lorsque l'on isole des cotylédons à partir de graines précultivées pendant 10 à 20 jours, le taux d'induction est relativement faible (Tableau X) ; à ce stade, les cotylédons sont devenus verdâtres ou verts, ce qui implique qu'ils ont terminé leur développement et leur production de chloroplastes et sont devenus un explant partiellement différencié. Lorsque l'on utilise des graines précultivées pendant moins de 8 jours, les cotylédons sont encore blanc laiteux ou jaunâtres, leurs cellules et leurs tissus ne sont pas différenciés, contrairement aux cotylédons verts. Elles sont donc davantage susceptibles de répondre à l'induction de facteurs nutritionnels ou environnementaux, de se développer et de se différencier dans la direction souhaitée. Le test de l'intensité lumineuse appuie également cette hypothèse. Les taux d'induction sont plus lents lorsque les explants sont exposés à un éclairage de 2 000 à 3 000 lux (Tableau IX). Ceci est très probablement dû au fait que, sous l'effet d'une intensité lumineuse élevée, des chloroplastes géants se forment dans les cotylédons et entraînent une croissance végétative rapide comme lorsque les explants sont encore *in planta*.

De plus, sur la base des résultats obtenus pour les préparations vitaminées et les hydrates de carbone, on pense que l'induction de bourgeons adventifs nécessite un apport de substances organiques riches et faciles à absorber. Par exemple, la préparation vitaminée 8p, dont le taux d'induction est maximal, est un mélange de 14 substances dont la biotine, le chlorure de choline, l'acide aminobenzoiqique et le pentothénate de calcium. La préparation vitaminée SH, avec laquelle le taux d'induction est également élevé, contient 10 fois plus d'inositol que les milieux MS et B5. Le fructose et le glucose sont des monosaccharides ; ils peuvent être absorbés et utilisés directement par l'explant et donnent des taux supérieurs d'organogenèse (Tableau VI). Le LH, le CH et le CM sont des protéines avec des composants relativement complexes, ils sont difficiles à absorber et à utiliser chez les cotylédons. L'addition de ces ingrédients n'a pas d'influence significative sur la formation des bourgeons adventifs. Cependant, ils permettent de stabiliser la valeur du pH dans le milieu. Il est donc souhaitable de compléter le milieu avec une quantité appropriée de LH.

On a observé que l'augmentation de la concentration en BAP s'accompagne d'une hausse du taux d'induction. Cependant, lorsque la concentration en BAP atteint 3,0 mg/l, les bourgeons adventifs sont plus courts que ceux traités avec des concentrations de 1,0 à 2,0 mg/l de BAP. Le test de sous-culture des bourgeons montre également que les bourgeons issus du traitement à 3,0 mg/l de BAP ont une croissance plus lente que les autres. La concentration en BAP peut donc être décidée en fonction du but recherché. Si l'on souhaite obtenir des bourgeons adventifs, on peut utiliser la concentration de 3,0 mg/l ; tandis que si l'on cherche à obtenir un certain nombre de bourgeons adventifs et une régénération précoce des plantules, il est recommandé d'adopter des concentrations de 1,0 à 2,0 mg/l de BAP.

Bien que nous ayons étudié les facteurs décrits ci-dessus, il reste un grand nombre d'autres éléments à étudier. En premier lieu, outre l'AIA, quelle est l'influence d'autres auxines comme l'ANA (acide α -naphtalène acétique) ? En deuxième lieu, le taux d'induction peut-il être encore amélioré par l'utilisation d'autres cytokinines comme la KT (kinétine) et la ZT (zéatine) ou par l'emploi de différentes combinaisons d'hormones ? En outre, pour ce qui concerne l'influence de la luminosité, notre expérience se limite à son influence au cours de la culture initiale. Aucun test n'a été réalisé sur son influence sur la totalité du processus d'organogenèse. On pourra également, dans une expérience plus complète, étudier l'influence de différentes températures et différentes photopériodes sur la formation des bourgeons adventifs.

INFLUENCE OF MIXTALOL ON THE LEAF YIELD AND GROWTH OF MULBERRY

A.K. TIKU & B.B. BINDROO*

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

The influence of mixtalol, a mixture of naturally occurring, biologically active compounds, was seen on the leaf yield and growth of mulberry. The increase in leaf yield, branch length and leaf area in the plants sprayed with various treatments of mixtalol was observed to have no statistical difference from the control plants sprayed with water alone. However, the increase in the leaf yield in the sprayed plants due to the mixtalol application ranged from 7.98% to 18.15% over control plants. Further, the average internodal length was found to be significantly increased in the mixtalol-sprayed plants over control ones.

Keywords: Mixtalol, triacontanol, mulberry, growth, leaf yield.

INTRODUCTION

There is a range of biologically active compounds occurring in nature. Their role in plant growth regulation has now been well established. These regulatory substances intervene and exert recognisable effects upon the overall course of plant growth and development, but they do so in a characteristically non nutrient way. The substances (both natural and synthetic) include those which have controllable and selective herbicide activity causing a total kill, can stimulate the rooting of cuttings, cause leaf and fruit abscission (Osborne, 1968), are related with fruit setting and artificial phenocarp, with stem elongation or stem retardation (Cathy, 1964), can increase yields (Ries *et al.*, 1978; Qian *et al.*, 1984) or can effect subtle interactions in nature (Rice, 1967). In a broad sense, the chemical substances modulate the behaviour of the cells of a plant within limits otherwise set by its genetic constitution and after its nutritional demands have been met (Steward and Krikorian, 1971).

The leaves of mulberry form the sole food for feeding silk worms to raise the cocoons for production of silk. From the economic point of view, it becomes imperative to devise methods for improving the quality and quantity of the leaves of the host plant, as 60% of the cost of production of the cocoons accounts for the mulberry leaves (Rangaswami *et al.*, 1976). In mulberry, the foliar application of growth regulators has been observed to affect the leaf yield and growth of plants (Jac Wha Lee, 1984; Ohnishi, 1986). Further, the use of long-chain fatty alcohol triacontanol and triacontanol-based product 'Fasal' has been attempted to increase the mulberry leaf production (Ankalgi and Ansari, 1992) considerably.

Mixtalol, a mixture of naturally occurring, biologically active compounds of long-chain aliphatic alcohols (hexacosanol, octacosanol, triacontanol, doctriacontanol, tetratriacontanol and hexatriacontanol) with the empirical formula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{O}$, where $n = \text{C}_{24}$ to C_{34} , has been shown to give very encouraging yield increases in different crops, i.e., rice, wheat, cotton, potato, sugarcane and chillies etc., under a wide range of agroclimatic conditions (Anonymous, 1985). In this paper are reported the results of a study conducted with mixtalol, to observe its effect on leaf yield and growth of mulberry under temperate conditions.

* Present address: Deputy Director and in-charge, Regional Sericultural Research Station, CSB Complex, Miransahib, Jammu - 181 101, India.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was laid on spring pruned dwarf-trained, 8-year-old plants of mulberry, variety Goshocrami (*Morus multicaulis* Poir.), in a randomised block design, replicated three times with a spacing of 1.82 m between plants and rows. The schedule of treatments consisted of three periodic foliar sprays of mixtalol sprayed on 15th May (one-spray schedule), 15th May and 1st June (two-spray schedule), 15th May, 1st June and 15th June (three-spray schedule) and a control (spraying with water alone three times on 15th May, 1st June and 15th June). The net plot size per treatment was 60.19 m². The dilution of the spray used was 25 ml mixtalol in 10 l of water sprayed on the leaves till drenched completely. Standard cultural practices including fertiliser applications followed for mulberry plantations in the Valley were adopted for the trial. The data on leaf harvest and growth parameters were recorded on 15th July.

RESULTS AND DISCUSSION

The variance due to leaf yield and leaf index (Table I) in different treatments was not significant. The significant mean square for branch length (cm) and number of nodes/m revealed that different treatments were truly different. The effects for decrease in number of nodes by virtue of increased internodal lengths per unit length of branch due to the three schedules of mixtalol sprays were not significantly different from each other but the effect was different from the control plants (water sprayed) at the 5% probability level. Similarly, the control plants exhibited significantly shorter branch lengths than the three-spray mixtalol schedule plants, whereas no statistically significant difference existed with the one- and two-spray mixtalol schedule plants.

Table I. Mean squares of four characters of mulberry (random analysis).

Tableau I. Carrés moyens de quatre caractères du mûrier (analyse aléatoire).

Variable	Degree of freedom	Mean squares / Carrés moyens			
		Leaf yield /ha (kg)	Average branch length (cm)	Average leaf index (cm ²)	Number of nodes/m
Variable	Degrés de liberté	Rendement en feuilles/ha (kg)	Longueur moyenne de la branche (cm)	Indice foliaire moyen (cm ²)	Nombre de nœuds/m
Treatments / Traitements	3	9.472	201.659	6427.257	0.984
Residual variation	8	6.499	43.830	4169.240	0.171
Variation résiduelle					
Total	11				
Actual mean / Moyenne réelle		11747.768	143.550	428.862	17.102
CV		7.59	5.71	10.79	3.70

CV: Coefficient of variation / Coefficient de variation.

The difference in the increase of leaf yield due to mixtalol application was not statistically significant from the control (Table II). However, the maximum leaf yield/ha was exhibited by the three-spray schedule (12,541.30 kg) as against that of control plants (10,614.50 kg). It could be seen that the increase in the leaf yield due to mixtalol application on mulberry ranged from 7.98% in the one-spray schedule to 18.15% only in the three-spray schedule over the control. Ankalgı and Ansari (1992), however, registered an increase of 124.29% over the control in the total weight of fresh mulberry leaves in the plants treated with 1 ml/l 1-triacontanol besides a 110.56% increase by using a triacontanol-based product, Fasal. The effect of mixtalol on the yield and average performance of plants of different crops, i.e., rice, wheat, cotton, potato, tomato, chillies and sugarcane, have been reported to range from 8% in cotton to as high as 88% in tomato and this increase in the yields was mainly attributed to the increased photosynthetic rate, enhanced carbon dioxide fixation and decreased

Table II. Effect of mixtalol on the yield and other growth parameters of mulberry.

Tableau II. Effet du mixtalol sur le rendement et sur d'autres paramètres de croissance du mûrier.

Treatment	I Leaf yield/ha (kg)	II Average leaf index (cm ²)	III Average branch length (cm)	IV Average number of nodes/m	V Average internodal length* (cm)
<i>Traitement</i>	<i>Rendement en feuilles /ha (kg)</i>	<i>Indice foliaire moyen (cm²)</i>	<i>Longueur moyenne des branches (cm)</i>	<i>Nombre moyen de noeuds/m</i>	<i>Longueur internodale moyenne (cm)*</i>
No spray / Témoin**	10614.50	363.69	134.93	17.99	7.50
1 spray / 1 vaporisation	11461.66	428.26	141.89	17.04	8.32
2 sprays / 2 vaporisations	12373.61	458.86	142.70	16.88	8.45
3 sprays / 3 vaporisations	12541.30	464.64	154.68	16.50	9.37
CD 5%	NS	NS	12.46	0.78	-
CD 1%	-	-	NS	NS	-

* Value calculated from parameters III and IV / *Valeur calculée à partir des paramètres III et IV.*

** Indicates no spray of mixtalol but spraying of water alone three times / *Vaporisation d'eau uniquement en trois fois.*

NS: Not significant / *Non significatif.*

photorespiration losses by mixtalol application (Anonymous, 1985). Similarly in the present study, the contributing factors towards increase in leaf yield in mixtalol-treated mulberry plants due to stimulation of these vital processes, which lead to a stimulated rate of leaf growth, cannot be ruled out. Interestingly, an increase in the leaf index could also be observed in the mixtalol-treated mulberry plants, which increases steadily if the number of mixtalol sprays is increased (Table II). Further, the remarkable effect of mixtalol by increasing the average branch length with a corresponding decrease in the average number of nodes/unit length (Table II) reflects the increase in the internodal length to be due to the effects as observed in sugarcane (Anonymous, 1985). Studies on the growth

characteristics and yield attributes in mixtalol-treated crops (Anonymous, 1985) revealed that the yield increases are positively correlated with the increase in total dry matter production per unit area. Generally speaking, 90% of the dry weight of the plant is obtained through photosynthesis and it would be desirable if the photosynthetic efficiency against a theoretical upper limit of 6.6% is enhanced. The use of such types of biologically active compounds seems to be a distinct possibility in this direction.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Dr A.R. Trag, i/c Division of Sericulture, SKUAST, for constant encouragement.

REFERENCES

- ANKALGI R.F., ANSARI M.F. (1992) Effect of 1-triacontanol and 'Fasal' on the growth and yield of mulberry, *Morus alba*, and *Bombyx mori*. *Sericologia*, 32(3), 405-410.
- ANONYMOUS (1985) Technical Report. Hindustan Lever Ltd., Bombay.
- CATHY H.M. (1964) Physiology of growth retarding chemicals. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15, 271-302.
- JAE WHA LEE (1984) Effect of foliar spray of kinetin (6-furfurylamino-purine) on the growth of mulberry tree and the metabolic activities in leaves. *Korean J. Sericult. Sci.*, 26(1), 1-20.
- OHNISHI T. (1986) Influence of gibberellin treatment on the growth of mulberry trees under different conditions of soil water content. *J. Sericult. Sci. Japan*, 55(4), 289-292.
- OSBORNE D.J. (1968) Defoliation and defoliants. *Nature*, 219, 564-567.
- QIAN C.T. *et al.* (1984) The influence of the mode of formulation on the biological activity of triacontanol. *Acta Botanica Sinica*, 26(3), 324-327.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R., JOLLY M.S. (1976) *Sericulture Manual. I: Mulberry Cultivation*. FAO Agricultural Services Division, Rome, Bull. 15, 150 pp.
- RICE E.L. (1967) Chemical warfare between plants. *Bios*, 38, 67-74.
- RIES S.K., RICHMAN T.L., WERT V.F. (1978) Growth and yield of crops treated with triacontanol. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 103(3), 361-364.
- STEWART F.C., KRIKORIAN A.D. (1971) *Plants, Chemical and Growth*. Academic Press, New York.

INFLUENCE DU MIXTALOL SUR LE RENDEMENT EN FEUILLES ET LA CROISSANCE DU MURIER

A.K. TIKU & B.B. BINDROO*

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

On a observé l'influence du mixtalol, un mélange de composés naturels biologiquement actifs, sur le rendement en feuilles et la croissance du mûrier. L'augmentation du rendement en feuilles, de la longueur des branches et de la surface foliaire chez les plants traités avec du mixtalol à différentes concentrations n'est pas significative statistiquement par rapport aux plants témoins traités uniquement avec de l'eau. Cependant, l'augmentation du rendement en feuilles chez les plants traités au mixtalol est supérieure de 7,98 % à 18,15 % par rapport aux plants témoins. De plus, la distance internodale moyenne augmente de manière significative chez les plants traités au mixtalol par rapport aux plants témoins.

INTRODUCTION

Il existe un certain nombre de composés biologiquement actifs présents à l'état naturel. Leur rôle dans la régulation de la croissance des plantes est maintenant bien établi. Ces substances régulatrices interviennent et exercent des effets reconnaissables sur le processus global de croissance et de développement des plantes ; leur action caractéristique n'est cependant pas de nature nutritive. Ces substances (naturelles ou synthétiques) comprennent les substances ayant une activité herbicide maîtrisable et sélective entraînant une destruction totale, les substances pouvant stimuler le racinement des boutures et provoquer la différenciation des feuilles et des fruits (Osborne, 1968), les substances qui ont un lien avec la fructification et la phénocarpie artificielle, avec l'allongement ou le retardement de la tige (Cathy, 1964), les substances qui peuvent augmenter les rendements (Ries et coll., 1978 ; Qian et coll., 1984) ou qui peuvent opérer des interactions subtiles dans la nature (Rice, 1967). Globalement, les substances chimiques modulent le comportement des cellules de la plante dans des limites normalement fixées par sa constitution génétique et une fois ses besoins nutritionnels satisfaits (Steward et Krikorian, 1971).

Les feuilles de mûrier constituent la seule nourriture des vers à soie qui sont la base de la production de cocons et de soie. Du point de vue économique, il est impératif de mettre au point des méthodes d'amélioration de la qualité et de la quantité des feuilles de la plante hôte, les feuilles de mûrier correspondant à 60 % du coût de la production des cocons (Rangaswami et coll., 1976). Chez le mûrier, l'application foliaire de régulateurs de croissance affecte le rendement en feuilles et la croissance des plants (Jac Wha Lee, 1984 ; Ohnishi, 1986). De plus, l'utilisation du triacontanol, alcool à chaîne longue, et du Fasal, produit à base de triacontanol, permet d'augmenter considérablement la production de feuilles de mûrier (Ankalgi et Ansari, 1992).

Le mixtalol, un mélange de composés présents à l'état naturel et biologiquement actifs d'alcools aliphatiques à chaîne longue (hexacosanol, octacosanol, triacontanol, doctriacontanol, tetratriacontanol et hexatriacontanol) avec la formule empirique $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{O}$, où $n = \text{C}_{24} \text{ à } \text{C}_{34}$, donne des résultats très encourageants sur le rendement chez plusieurs cultures comme le riz, le blé, le coton, la pomme de terre, la canne à sucre, le piment, etc., dans de nombreux types de conditions agro-climatiques (Anonyne, 1985). Cet article présente les résultats d'une étude portant sur le mixtalol et ses effets sur le rendement en feuilles et la croissance du mûrier en milieu tempéré.

* Adresse actuelle : Deputy Director and in-charge, Regional Sericultural Research Station, CSB Complex, Miransahib, Jammu - 181 101, Inde.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée sur des plants de mûrier nains âgés de 8 ans, taillés au printemps, variété Goshwerami (*Morus multicaulis* Poir.), selon la méthode des blocs aléatoires ; elle a été répétée trois fois avec un espacement de 1,82 m entre les plants et les rangées. Le calendrier des traitements est de trois types de vaporisation foliaire de mixtalol : le 15 mai (une seule vaporisation), le 15 mai et le 1er juin (deux vaporisations), le 15 mai, le 1er juin et le 15 juin (trois vaporisations) et un témoin (vaporisation avec de l'eau uniquement le 15 mai, le 1er juin et le 15 juin). La surface nette des parcelles est de 60,19 m² par traitement. La dilution utilisée est de 25 ml dans 10 l d'eau vaporisés sur les feuilles jusqu'à ce qu'elles soient complètement trempées. On a adopté, pour le test, les pratiques culturales standard, qui comprennent l'application d'engrais selon la méthode suivie pour les plantations de mûrier de la vallée du Cachemire. Les données sur la récolte de feuilles et les paramètres de croissance ont été relevées le 15 juin.

RESULTATS ET DISCUSSION

La variance due au rendement en feuilles et à l'indice foliaire (Tableau I) en fonction des différents traitements n'est pas significative. Les carrés moyens pour la longueur des branches (cm) et le nombre de noeuds/m révèlent que les différents traitements donnent effectivement des résultats différents. Les effets sur la diminution du nombre de noeuds du fait de l'augmentation de la distance internodale par unité de longueur de branche ne diffèrent pas de manière significative entre les différents traitements mais diffèrent fortement avec les plants témoins (vaporisés avec de l'eau) au seuil de 5 %. De même, les plants témoins donnent une longueur de branches nettement inférieure à celle obtenue pour les plants traités en trois vaporisations tandis qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les plants traités en deux vaporisations et ceux traités en une seule vaporisation.

Le rendement en feuilles après l'application de mixtalol n'est pas significativement différent de celui obtenu pour le témoin (Tableau II). Cependant, le rendement en feuilles/ha est maximal pour les plants traités en trois vaporisations (12 541,30 kg) par rapport aux plants témoins (10 614,50 kg). L'augmentation du rendement en feuilles due à l'application de mixtalol sur le mûrier varie de 7,98 % chez les plants traités une fois à 18,15 % chez les plants traités trois fois par rapport aux témoins. Ankalgi et Ansari (1992) ont enregistré une augmentation du poids total de feuilles fraîches de 124,29 % par rapport au témoin chez les plants traités avec 1 ml/l de 1-triacontanol et une augmentation de 110,56 % après traitement avec le Fasal, produit à base de triacontanol. L'effet du mixtalol sur le rendement et la performance moyenne des plants chez différentes cultures comme le riz, le blé, le coton, la pomme de terre, la tomate, le piment ou la canne à sucre varie de 8 % chez le coton à 88 % chez la tomate ; cette augmentation des rendements est attribuée principalement à l'augmentation du taux de photosynthèse, de la fixation de dioxyde de carbone et à la diminution de pertes de photorespiration après application de mixtalol (Anonyme, 1985). Dans cette étude, on ne peut écarter ces facteurs, qui contribuent à l'augmentation du rendement en feuilles chez les plants de mûrier traités au mixtalol du fait de la stimulation de ces processus vitaux qui entraîne une accélération du taux de croissance des feuilles. Il est intéressant de noter que l'indice foliaire des plants traités au mixtalol augmente de façon constante lorsque l'on augmente le nombre de vaporisations (Tableau II). De plus, l'effet sensible du mixtalol, qui donne une augmentation de la longueur des branches s'accompagnant d'une diminution du nombre de noeuds par unité de longueur (Tableau II), montre que l'augmentation de la distance internodale est due aux effets observés chez la canne à sucre (Anonyme, 1985). Des études sur les caractères de la croissance et les attributs du rendement chez les cultures traitées au mixtalol (Anonyme, 1985) ont montré que l'augmentation du rendement est étroitement corrélée avec l'augmentation de production de matières sèches totales par unité de surface. De manière générale, 90 % du poids sec de la plante sont obtenus par la photosynthèse et il serait souhaitable de porter l'efficacité de la photosynthèse au-delà d'une limite théorique supérieure de 6,6 %. L'utilisation des composés biologiquement actifs semble avoir des applications possibles dans cette voie.

STUDIES ON PROPAGATION EFFICIENCY OF MULBERRY (*MORUS* SPP.) AT PLOIDY LEVEL

A. TIKADER, K. VIJAYAN, B.N. ROY & T. PAVANKUMAR

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

Propagation studies on diploid, triploid and tetraploid mulberry varieties showed maximum survival percentage (71.81) in triploids, followed by diploids (66.67) and tetraploids (59.17). The highest root/shoot ratio in length was observed in triploids (0.92) followed by tetraploids (0.73) and diploids (0.67). But the root/shoot ratio was highest in tetraploids (0.58) followed by triploids (0.53) and diploids (0.20) on a dry weight basis.

Keywords: Mulberry, propagation, ploidy, survival, root, shoot.

INTRODUCTION

Mulberry sericulture is based on the mulberry leaf. Among the different factors, the mulberry leaf contributes more than one third (33%) for cocoon production. The events of mulberry sericulture begin with cultivation of suitable and best fit mulberry variety(ies) for an ecozone. Vegetative propagation efficiency is one of the desirable traits of superior varieties (Das *et al.*, 1969). Other than the yield, the nutritive value, hence quality, of triploid varieties rules superior to others (Das *et al.*, 1974).

Cuttings of triploid varieties could be propagated with ease and speedily without a need for chemical treatment (Dorcus *et al.*, 1992). Variation in vegetative propagation of mulberry varieties with reference to ploidy level is reported since mulberry cultivation region specifically holds importance for West Bengal conditions.

MATERIALS AND METHODS

Uniform size cuttings from six varieties of diploids, i.e., *M. indica*, S1, Philippines, S799, China white and S162, triploids, i.e., Tr1 (Berhampore-5 $\times$ NT1), Tr4 (T3 $\times$ S1), Tr5 (T3 $\times$ S1), Tr15 (T19 $\times$ S1), C1720 (T1 $\times$ S15), C1735 (*M. indica* $\times$ T8) and tetraploids (colchiploids), i.e., T1 (*M. indica* $\times$ S1), T3 (*M. indica* $\times$ S1), T7 (*M. indica* $\times$ S1), T8 (*M. indica* $\times$ S1), T20 (*M. indica* $\times$ S1) and T34 (China white $\times$ S3799), were planted in earthen pots (55 cm $\times$ 25 cm) as well as in nursery beds in three replications each in two different seasons preferred by farmers (June and September). Six-month-old twigs from different selected varieties were used for preparation of cuttings. Seventy-five cuttings were planted in each replication in nursery beds.

The length and diameter of the cuttings were 15 ± 1 cm and 1.3-1.5 cm, respectively, with 4-5 well-developed active buds. To study growth of roots and shoots in potted plants, soil was prepared by mixing cow dung and sand with normal soil in equal proportions. Five cuttings were planted in each pot in three replications.

Saplings of 90 days old were uprooted carefully without damaging the root system and washed in running water to remove soil particles from the root zone. The length and weight of roots and shoots were recorded. The root and shoot portions were oven-dried separately at 80 °C for 24 hours to estimate the root/shoot ratio by dry weight basis, as suggested by Susheelamma *et al.* (1986) and Bhat *et al.* (1992).

RESULTS AND DISCUSSION

The data on sprouting were recorded at different intervals up to 30 days and survival rate recorded after 90 days. The maximum survival rate was recorded in triploids (71.81%) followed by diploids (66.67%) and tetraploids (59.17%) as shown in Table I. The analysis of variance reveals that season, observation date, ploidy level and interaction between season $\times$ ploidy were significant ($P < 0.01$). The interaction between date of observation $\times$ ploidy was significant ($P < 0.05$) (Table II).

Table I. Mean survival rate of different genotypes.

Tableau I. Taux de survie moyen de différents génotypes.

Genotypes <i>Génotypes</i>	Survival rate (%) after 90 days / <i>Taux de survie (%) après 90 jours</i>		
	June <i>Juin</i>	September <i>Septembre</i>	Mean <i>Moyenne</i>
Diploids / <i>Diploïdes</i>			
<i>M. indica</i> HP	70.00	66.67	68.34
S1	76.66	70.00	73.33
Philippine	46.67	75.33	61.00
S799	70.00	67.33	68.67
S162	55.00	54.00	54.50
China white	61.66	86.37	74.17
Mean / <i>Moyenne</i>	63.33	70.00	66.67
CV %	19.53		
Triploids / <i>Triploïdes</i>			
Tr1	58.33	61.00	59.67
Tr4	85.66	76.00	80.83
Tr5	86.66	71.33	78.99
Tr15	90.00	60.00	75.00
C1720	78.33	57.33	66.49
C1735	75.66	57.33	66.49
Mean / <i>Moyenne</i>	79.10	64.52	71.81
CV %	18.64		
Tetraploids / <i>Tétraploïdes</i>			
T1	80.00	70.00	75.00
T3	74.00	66.66	70.33
T7	71.33	70.66	71.00
T8	61.66	28.66	45.16
T20	52.33	56.66	54.49
T34	46.33	31.66	39.00
Mean / <i>Moyenne</i>	64.29	54.05	59.17
CV %	29.42		

CV: Coefficient of variation / *Coefficient de variation*.

The mean performance of shoot length varies from 41.67 to 55.0 cm in diploids, 50.67 to 70.33 cm in triploids and 41.00 to 82.00 cm in tetraploids.

The mean performance of root length varies from 19.60 to 37.00 cm in diploids, 41.33 to 78.67 cm in triploids and 32.83 to 58.33 cm in tetraploids. The root/shoot length varies from 0.45 to 0.84, 0.63 to 1.51 and 0.59 to 0.93 and root/shoot dry weight from 0.11 to 0.41, 0.34 to 0.65 and 0.42 to 0.95 in diploids, triploids and tetraploids, respectively (Table III). Yang and Yang (1991) and Dwivedi (1992) reported that the triploid hybrid is superior by having a higher number of branches and rooting behaviour but exhibits morphologically features intermediate between diploids and autotetraploids, which also supports the present findings. Devi *et al.* (1989) reported that varieties like K2, local and S-54 show early sprouting while Sujanpur and Goshoerami show late sprouting. Similarly, the leaf quality was superior in Goshoerami, Sujanpur, BC₂S9, Tr4 and Tr10.

Table II. Mean sprouting and survival percentage at different ploidy levels.

Tableau II. Bourgeonnement et taux de survie moyens en fonction du degré de ploïdie.

Ploidy level	Season	Sprouting habit			Survival in 90 days	Mean season × ploidy
		10 days	20 days	30 days		
Degré de ploïdie	Saison	Bourgeonnement à			Survie à 90 jours	Saison × ploïdie moyenne
		10 jours	20 jours	30 jours		
Diploid / Diploïdie	June / juin	61.90	81.67	87.14	63.33	75.25
	Sept.	70.24	84.76	83.10	70.00	
	Mean / Moyenne	66.07	83.22	85.12	66.67	
Triploid / Triploïdie	June / juin	50.95	80.95	86.90	79.10	67.54
	Sept.	39.29	65.95	72.62	64.52	
	Mean / Moyenne	45.12	73.45	79.76	71.80	
Tetraploid / Tétraploïdie	June / juin	51.90	79.52	84.29	64.29	61.90
	Sept.	33.57	62.86	64.76	54.05	
	Mean / Moyenne	42.74	71.19	74.52	59.17	
CD (P = 0.05)						
Season / Saison		4.13				
Observed day / Date d'observation		5.84				
Ploidy / Ploïdie		5.06				
Season × ploidy / Saison × ploïdie		7.16				
Obs. day × ploidy / Date d'obs. × ploïdie		10.12				

Table III. Mean performance of growth parameters of different ploidies of mulberry (average of 2 seasons).

Tableau III. Performance moyenne des paramètres de croissance du mûrier en fonction du niveau de ploïdie (moyenne de 2 saisons).

Ploidy	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root/shoot	
			Length	Dry wt.
<i>Ploïdie</i>	<i>Longueur des racines (cm)</i>	<i>Longueur des pousses (cm)</i>	<i>Racine/pousse</i>	
			<i>Longueur</i>	<i>Poids sec</i>
Diploids / Diploïdie				
<i>M. indica</i> HP	19.60	43.23	0.45	0.21
S1	35.83	43.33	0.84	0.14
Philippine	37.00	55.00	0.64	0.11
S799	27.33	42.33	0.65	0.41
S162	31.33	45.33	0.68	0.22
China white	30.33	41.67	0.73	0.13
Mean / <i>Moyenne</i>	30.21	45.15	0.64	0.20
Triploids / Triploïdie				
Tr1	58.00	64.33	0.94	0.34
Tr4	37.00	59.33	0.63	0.65
Tr5	54.33	58.67	0.92	0.54
Tr15	50.00	70.33	0.71	0.58
C1720	78.67	51.67	1.51	0.62
C1735	41.33	50.67	0.82	0.46
Mean / <i>Moyenne</i>	53.22	59.17	0.92	0.53
Tetraploids / Tétraploïdie				
T1	53.33	73.33	0.79	0.95
T3	44.67	59.33	0.75	0.57
T7	32.83	41.00	0.93	0.42
T8	58.33	82.00	0.70	0.51
T20	44.33	71.67	0.59	0.53
T34	47.67	78.67	0.61	0.48
Mean / <i>Moyenne</i>	48.86	67.67	0.73	0.53
CD (P = 0.05)	25.98	26.67	0.41	0.53

The above observations reflect that as triploids are easier to propagate, respond well in other growth parameters, commercial utilisation of triploids is envisaged to improve performance levels of cocoon crops mainly due to the nutritive value of the leaf (Das *et al.*, 1974).

REFERENCES

- BHAT G.G., HITTALMANI S. (1992) Clonal differences in mulberry (*Morus* spp.) for root growth parameters. Indian J. Seric., 31(1), 5-8.
 DAS B.C., PRASAD D.N. (1974) Evaluation of some tetraploid and triploid mulberry varieties through chemical analysis and feeding experiment. Indian J. Seric., 13(1), 17-20.

- DAS B.C., KRISHNASWAMI S. (1969) Estimation of components of variation of leaf yield and its related traits in mulberry. *J. Sericult. Sci. Japan*, 38(3), 242-248.
- DEVI S.P., AGGARWAL A. (1989) Scanning of early sprouting varieties of mulberry. *Science and Culture*, 54(3), 87-88.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. (1992) Exploitation of ploidy level for rooting potential in mulberry. Fourth All-India Conference on Cytology and Genetics and Symposium on Cytogenetics of Mulberry and Silkworm, November 5-7, Karnataka State Sericulture Development Institute, Bangalore, pp. 97-98.
- DWIVEDI N.K. (1992) Cytomorphology of an interspecific triploid hybrid of mulberry. *Advanced Plant Science*, 5(1), 74-82.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S. (1986) Evaluation of morphological parameters associated with drought resistance in mulberry. *Indian J. Seric.*, 25(1), 6-14.
- YANG J.-H., YANG X.-H. (1991) Research on polyploidy and polyploidy breeding in mulberry in China. *Sericologia*, 31(4), 625-630.

ETUDE SUR L'EFFICACITE DE PROPAGATION DU MURIER (*MORUS SPP.*) EN FONCTION DU DEGRE DE PLOIDIE

A. TIKADER, K. VIJAYAN, B.N. ROY & T. PAVANKUMAR

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

Des expériences réalisées sur la propagation de variétés de mûrier diploïdes, triploïdes et tétraploïdes révèlent que le pourcentage de survie est maximale (71,81) chez les triploïdes, devant les diploïdes (66,67) et les tétraploïdes (59,17). Le rapport racines/pousses (en longueur) est maximal chez les triploïdes (0,92), devant les tétraploïdes (0,73) et les diploïdes (0,67). Cependant, le rapport racines/pousses sur la base du poids sec est maximal chez les tétraploïdes (0,58), devant les triploïdes (0,53) et les diploïdes (0,20).

INTRODUCTION

La sériciculture mûrier est basée sur la feuille de mûrier. Parmi les différents facteurs, la feuille de mûrier contribue pour plus d'un tiers (33 %) à la production de cocons. Les événements liés à la sériciculture mûrier commencent à la culture d'une ou plusieurs variétés de mûrier dont l'adaptation à une zone écologique donnée est optimale. L'un des caractères recherchés chez les variétés supérieures est l'efficacité de propagation végétative (Das et coll., 1969). Outre le rendement, la valeur nutritive, c'est-à-dire la qualité, des variétés triploïdes est supérieure à celle des autres variétés (Das et coll., 1974).

La reproduction par bouturage des variétés triploïdes est une méthode facile qui permet d'éviter l'emploi des traitements chimiques (Dorcus et coll., 1992). Cet article décrit les variations de propagation végétative des variétés de mûrier en fonction du degré de ploïdie, la spécificité de la région de culture du mûrier étant particulièrement importante dans le Bengale occidental.

MATERIELS ET METHODES

Des boutures de taille égale issues de six variétés de diploïdes [*M. indica*, S1, Philippines, S799, China white et S162], de triploïdes [Tr1 (Berhampore-5 × NT1), Tr4 (T3 × S1), Tr5 (T3 × S1), Tr15 (T19 × S1), C1720 (T1 × S15), C1735 (*M. indica* × T8)] et de tétraploïdes (colchipoïdes) [T1 (*M. indica* × S1), T3 (*M. indica* × S1), T7 (*M. indica* × S1), T20 (*M. indica* × S1) et T34 (China white × S799)] ont été plantées dans des pots en terre (55 cm × 25 cm) et en pépinière en trois répétitions au cours de deux saisons d'élevage (juin et septembre). Des brindilles âgées de six mois issues des différentes variétés sélectionnées ont été utilisées pour la préparation des boutures. Soixante-quinze boutures par répétition ont été plantées dans les pépinières.

La longueur et le diamètre des boutures sont respectivement de 15 ± 1 cm et de 1,3 à 1,5 cm, chaque bouture possédant 4 à 5 bourgeons en cours de développement. Pour l'étude de la croissance des racines et des pousses dans les plants en pot, le terreau a été préparé en mélangeant des volumes égaux de bouse de vache, de sable et de terre normale. Cinq boutures ont été plantées dans chaque pot dans les trois répétitions.

Des plantules âgées de 90 jours ont été déracinées en prenant soin de ne pas endommager le système racinaire et lavées dans l'eau courante afin d'éliminer les particules de terre de la zone racinaire. La longueur et le poids des pousses et des racines ont été relevés. Les fragments de racines et de pousses ont été séchés au four à 80 °C pendant 24 heures pour l'estimation du rapport

racines/pousses sur la base du poids sec, selon les méthodes proposées par Susheelamma et coll. (1986) et Bhat et coll. (1992).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant le bourgeonnement ont été enregistrées à différents intervalles jusqu'à 30 jours et le taux de survie a été enregistré après 90 jours. Le taux de survie est maximal chez les triploïdes (71,81 %), devant les diploïdes (66,67 %) et les tétraploïdes (59,17 %), comme le montre le tableau I. L'analyse de variance révèle que la saison, la date d'observation, le degré de ploïdie et l'interaction entre la saison et la ploïdie sont significatifs ($P < 0,01$). L'interaction entre la date d'observation et le degré de ploïdie est significative ($P < 0,05$) (Tableau II).

La performance moyenne obtenue pour la longueur de la pousse varie de 41,67 à 55,0 cm chez les diploïdes, de 50,67 à 70,33 cm chez les triploïdes et de 41,00 à 82,00 cm chez les tétraploïdes.

La performance moyenne obtenue pour la longueur des racines varie de 19,60 à 37,00 cm chez les diploïdes, de 41,33 à 78,67 cm chez les triploïdes et de 32,83 à 58,33 cm chez les tétraploïdes. La longueur racines/pousses varie de 0,45 à 0,84 chez les diploïdes, de 0,63 à 1,51 chez les triploïdes et de 0,59 à 0,93 chez les tétraploïdes ; le poids sec racines/pousses varie de 0,11 à 0,41 chez les diploïdes, de 0,34 à 0,65 chez les triploïdes et de 0,42 à 0,95 chez les tétraploïdes (Tableau III). Yang et Yang (1991) et Dwivedi (1992) ont observé que l'hybride triploïde est supérieur pour ce qui concerne le nombre de branches et le comportement de racinement mais il présente des caractères morphologiquement intermédiaires entre les diploïdes et les autotétraploïdes, ce qui corrobore les résultats présentés ici. Devi et coll. (1989) ont observé que les variétés telles que K2, local et S-54 ont un bourgeonnement précoce tandis que Sujapur et Goshorami ont un bourgeonnement tardif. En outre, la qualité de la feuille est supérieure chez Goshorami, Sujapur et BC₂59, Tr4 et Tr10.

Les triploïdes étant plus faciles à bouturer et réagissant bien pour ce qui concerne les autres paramètres de croissance, on envisage de les utiliser à l'échelle commerciale, principalement en raison de la qualité de leurs feuilles, pour améliorer la productivité des récoltes de cocons (Das et coll., 1974).

MUTANT FORMS IN MULBERRY (*MORUS* SPP.)

S.B. DANDIN¹, M.V. RAJAN² & R.S. MALLIKARJUNAPPA²

1. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, India.

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

Keywords: Morphological variability, spontaneous mutants.

Mutations have contributed a great deal of variability to the evolution of crop species. A majority of mutations are micro-mutations involving changes at the molecular level and, although they are not often expressed phenotypically, they create physiological changes. On the contrary, some of the mutations bring a noticeable change, resulting in easily recognisable new phenotypic forms. These types of mutants are often used as genetic markers in crop plants and help in studying the inheritance pattern.

In clonally propagated crops, mutations alone serve as the source of variation due to the complete absence of Mendelian recombination. This situation is further enhanced due to repeated pruning or pollarding of the vegetative portion, which sometimes results in point, somatic or chimeric mutations. They can be perpetuated vegetatively if desirable. Mulberry falls in this group where vegetative propagation is in vogue through stem cuttings, grafting, etc. Further, the crop is pruned a few times in a year and occurrence of a number of chimeric mutants is observed in the population.

In the present paper, different types of mutants found in various species of mulberry maintained at the Central Sericultural Research and Training Institute (CSR & TI), Mysore, and Karnataka State Sericultural Research and Development Institute (KSSRDI) have been reported and their botanical and sericultural characters are discussed. These mutant types have been classified into two groups, i.e., stem mutants and leaf mutants.

A. STEM MUTANTS

In stem mutants, the stem shows an altered characteristic and the other features are normal. The important ones are:

1. Serpentina:

This belongs to the species, *M. alba*, and shows zigzag stem growth imitating a snake, hence, it is also called 'snake type' (Fig. 1). This has been found very commonly growing in the Kashmir Valley of India and is also reported from Japan. This variety shows poor rooting and growth and can be multiplied only by bud grafting or root grafting. The internodal distance varies due to the zigzag nature of the stem. The leaves are heterophyllous and all types of lobations are observed with a serrate margin. Except the wavy stem, no other peculiarities are observed.

2. Bendola (weeping mulberry):

This type is classified as *M. sparsiflorus* by Japanese scientists. The stem is weak and cannot grow erect, hence needs the support of a wall or some strong hold, otherwise it spreads on the ground like any other woody climber (Fig. 2). Rooting is poor but, unlike serpentina, grows fast and the internodal distance is medium. Leaves are entire and small with a serrate margin.

3. Spreading type (Shidareguwa):

This type has a natural habit of horizontal growth and covers the ground, unlike bendola, and was introduced from Japan (Fig. 3). The stem is strong and has directional growth. Leaves resemble

typical *M. indica* with an acute margin, small in size and lobed; growth and rooting are poor; the stem and petiole show anthocyanin origin pigmentation. This mutant has no specific agronomical traits of importance, but could be used as a genetic marker in breeding experiments.



Fig. 1: Serpentina (stem mutant).

Fig. 1 : *Serpentina* (mutation de la tige).



Fig. 2: Bendola (weeping mulberry) (stem mutant).

Fig. 2 : *Bendola* (*mûrier pleureur*) (mutation de la tige).



Fig. 3: Spreading type (stem mutant).

Fig. 3 : Type rampant (mutation de la tige).

B. LEAF MUTANTS

There are several mutations which have resulted in altered leaf shape, size, venation, etc. The important and conspicuous leaf mutants are:

1. Venosa:

This is a leaf mutant collected from France. The leaf blade shows unequal growth and the veins are very prominent. Leaves are yellowish with a wavy margin (Fig. 4). The internodal distance is medium and has no desirable agronomic traits. In our collection, this mutant produces male flowers and is found to be diploid with $2n = 28$ chromosomes and meiosis is regular. This type appears to have its origin from *M. alba* species. Growth is medium and rooting is very poor.

2. Crinkled leaf:

This is another mutant of Japanese origin, it produces characteristic leaves which are crumpled and rosette (Fig. 5). Growth is very slow, the internodal distance is very short and leaves are rounded, resembling *Euphorbia*, a horticulturally important plant for its leaf shape. Similarly this type can also be used as an ornamental plant because of its leaf characters. The mutant of our collection has not produced any flowers so far.

3. Round tip leaves:

This type produces round-tipped leaves. Except for this character, this variety is normal in other characters with very slow growth (Fig. 6). It was introduced from France and belongs to the species *M. alba*.

4. Glossy leaf mutant:

This mutant was collected from a garden of a farmer in Karnataka (India). Leaves are abnormally thick (3-4 times), glossy and dark green in colour. It grows normally like Kanva-2 (K-2), a popular variety. This variety is being tested for its resistance to moisture stress. It grows erect and rooting is

also good. Leaves are smaller when compared to K-2 variety and show minute crinkles. A glossy cuticular coating is a peculiarity of this type. It belongs to *M. indica*.

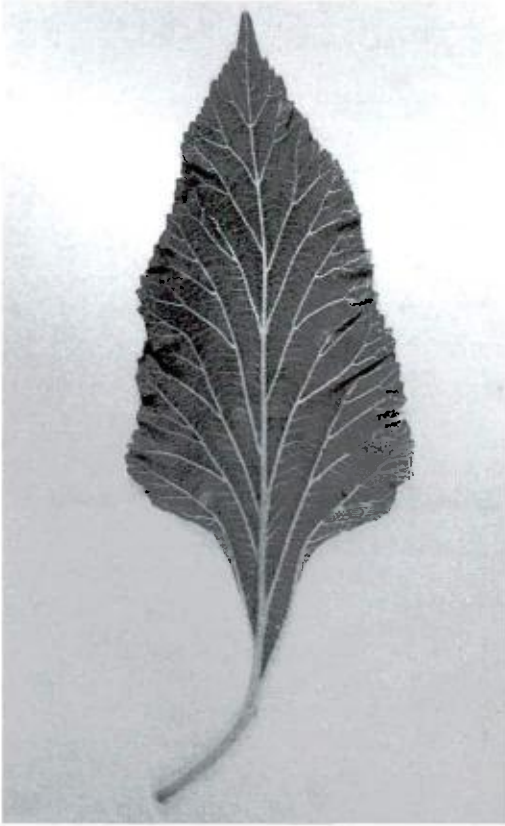


Fig. 4: Venosa (leaf mutant).
Fig. 4 : (mutation de la feuille).



Fig. 5: Crinkled leaf (leaf mutant).
Fig. 5 : Feuille froissée (mutation de la feuille).

5. Variegated leaf mutant:

This type was obtained from an interspecific grafting at CSR & TI, Mysore. Leaves show various degrees of variegation (Fig. 7). In a branch, some leaves are fully white and devoid of chlorophyll. Some leaves show half-variegated portion and some show patchy variegation. This type is unique because of the fact that it was due to interspecific grafting. Leaves after some time show scorching of lamina. This type has no desirable traits of economic importance.



Fig. 6: Round-tipped leaf (leaf mutant).

Fig. 6 : Feuille à sommet arrondi (mutation de la feuille).

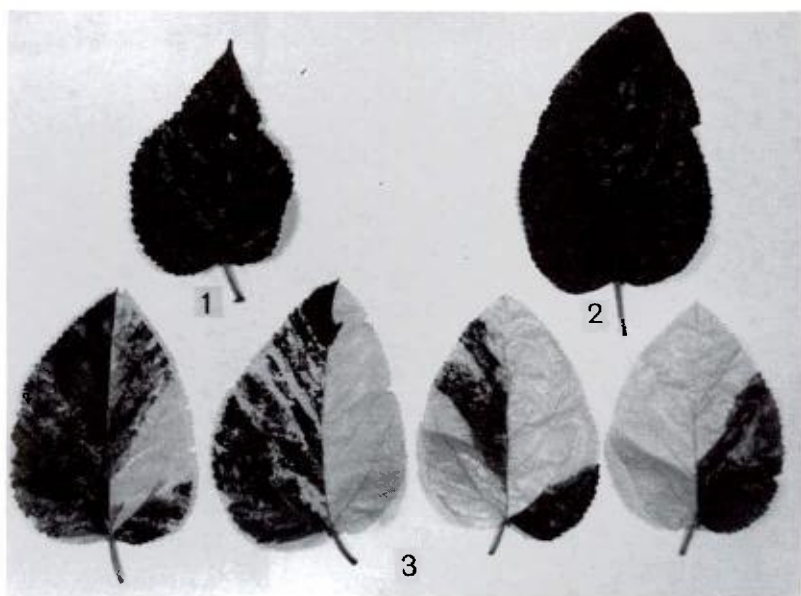


Fig. 7: Variegated leaf mutant.

Fig. 7 : Mutant à feuilles panachées.

All of the above mutant types are maintained both at CSR & TI, Mysore, and KSSRDI, Bangalore. They can be used for inheritance studies and serve as genetic markers. Details of some of the growth characters are listed in Table I.

Table I. Agronomical characters of different mutants.

Tableau I. Caractères agronomiques de différents mutants.

Sl no.	Mutant forms	Average length of the stem (cm)	Number of branches	Internodal distance (cm)	100 leaf area (cm ²)	100 leaf weight (g)	Sprouting %	Rooting %
N° de série	Formes mutantes	Longueur moyenne de la tige (cm)	Nombre de branches	Distance internodale (cm)	Surface de 100 feuilles (cm ²)	Poids de 100 feuilles (g)	Bourgeonnement (%)	Racinement (%)
1	Serpentina (unlobed) <i>Serpentina (non lobé)</i>	53.2	7	3.2	12433	398.0	24.0	0
2	Bendola	85.6	6	4.3	7122	156.64	6.67	0
3	Spreading type <i>Type rampant</i>	75.5	5	4.2	7100	120.20	30.00	9.0
4	Venosa	71.0	4	4.0	4085	97.70	7.0	0
5	Crinkled leaf <i>Feuille froissée</i>	88.48	8	4.43	3560	397.0	31.04	2.94
6	Round leaf mutant <i>Feuille arrondie</i>	49.5	4	3.6	8042	172.84	18.0	2
7	Glossy leaf type <i>Feuille vernissée</i>	199.57	23	5.16	10452	194.5	87.0	61.13
8	Variegated mutant <i>Mutant panaché</i>	112	2	2.3	18700	124.02	5.0	0

Investigations on their ploidy levels and meiotic abnormalities, inheritance pattern, resistance genes, etc., are under way. Further, some of the types like drooping mulberry, serpentina, crumpled leaf type, variegated leaf, etc., could be exploited for their horticultural value.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Director, CSR & TI, and Scientists of MBG section of KSSRDI for providing some information on the above types. Thanks are also due to Dr G. Chavancy who was kind enough to send his collections to CSR & TI, Mysore, which include some of the above types.

FORMES MUTANTES CHEZ LE MURIER (*MORUS SPP.*)

S.B. DANDIN¹, M.V. RAJAN² & R.S. MALLIKARJUNAPPA²

1. Karnakata State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Inde.
2. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

Les mutations contribuent fortement à la variabilité dans l'évolution des espèces. La majorité des mutations sont des micro-mutations impliquant des changements au niveau moléculaire et, si elles ne s'expriment généralement pas de manière phénotypique, elles provoquent des modifications physiologiques. A l'inverse, certaines mutations entraînent des modifications visibles qui se traduisent par des formes phénotypiques nouvelles faciles à identifier. Ces types de mutants sont souvent utilisés comme marqueurs génétiques chez les cultures commerciales car ils permettent d'étudier leur mode de transmission héréditaire.

Chez les plants reproduits par clonage, les mutations sont les seules sources de variation en raison de l'absence de recombinaison mendélienne. La taille ou l'étêtage répétés de la portion végétative accentuent encore ce phénomène car ils entraînent parfois des mutations ponctuelles, somatiques ou chimériques. Elles peuvent être reproduites de manière végétative si nécessaire. Le mûrier fait partie des espèces reproduites couramment de manière végétative par bouturage, greffage, etc. De plus, les cultures sont taillées plusieurs fois par an et un certain nombre de mutants chimériques apparaissent dans la population.

Cet article décrit différents types de mutants observés chez diverses espèces de mûrier conservées au *Central Sericultural Research and Training Institute* (CRS & TI) de Mysore et au *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* (KSSRDI) de Bangalore, ainsi que leurs caractéristiques botaniques et séricicoles. Ces types mutants ont été classés en deux groupes : mutation de la tige et mutation de la feuille.

A. MUTATION DE LA TIGE

Chez les mutations de la tige, la tige présente une caractéristique modifiée, les autres caractères étant normaux. Les mutants les plus importants sont décrits ci-dessous.

1. *Serpentina* :

Ce mutant appartient à l'espèce *M. alba* et donne une tige en zigzag, ressemblant à un serpent ; il est également appelé « type serpent » (Fig. 1). Il est répandu dans la vallée du Cachemire en Inde et a également été observé au Japon. Cette variété présente un racinement et une croissance médiocres et ne peut être reproduite que par greffage des bourgeons ou des racines. La distance internodale varie en raison de la nature sinueuse de la tige. Les feuilles sont hétérophylles, donnent des lobes de tous les types et une bordure dentelée. A l'exception de la sinuosité de la tige, aucune particularité n'a été observée.

2. Bendola (mûrier pleureur) :

Ce mutant a été classé comme appartenant à *M. sparciflorus* par les scientifiques japonais. Sa tige est faible et ne peut pas pousser dressée, elle doit être soutenue par un mur ou tout autre support solide sinon elle se répand sur le sol comme les plantes grimpantes (Fig. 2). Le racinement est médiocre mais, contrairement à *Serpentina*, la croissance est rapide et la distance internodale moyenne. Les feuilles sont intactes et petites avec une bordure dentelée.

3. Type rampant (Shidareguwa) :

Ce mutant croît naturellement à l'horizontal et recouvre le sol, à la différence de Bendola : il a été introduit du Japon (Fig. 3). La tige est forte et a une croissance directionnelle. Les feuilles ressemblent à celles du type *M. indica* mais ont une bordure terminée en pointe, sont de petite taille et lobées. La croissance et le racinement sont médiocres, la tige et le pétiole présentent une pigmentation d'anthocyanine. Ce mutant n'a pas de caractères agronomiques spécifiques importants mais pourrait être utilisé comme marqueur génétique dans des expériences de sélection.

B. MUTATIONS FOLIAIRES

Il existe plusieurs types de mutations qui se traduisent par des modifications de forme, de taille, de nervation, etc. Les mutants foliaires importants et caractéristiques sont décrits ci-dessous.

1. Venosa :

Il s'agit d'un mutant foliaire prélevé en France. La feuille présente une croissance irrégulière et les nervures sont très proéminentes. Les feuilles sont jaunâtres avec une bordure ondulée (Fig. 4). La distance internodale est moyenne et ne présente aucun caractère agronomique recherché. Dans notre collection, cette variété produit des fleurs mâles et est diploïde avec $2n = 28$ chromosomes : la méiose est régulière. Il semble que ce mutant provienne de l'espèce *M. alba*. La croissance est moyenne et le racinement très médiocre.

2. Feuille froissée :

C'est un mutant d'origine japonaise, il produit des feuilles caractéristiques, fripées et recroquevillées en rosace (Fig. 5). La croissance est très lente, la distance internodale est très courte et les feuilles sont arrondies, ressemblant à *Euphorbia*, plante d'intérêt horticole en raison de la forme de sa feuille. Ce mutant peut également être utilisé comme plant d'ornement du fait de ses caractéristiques foliaires. Dans notre collection, ce mutant n'a pas, à ce jour, produit de fleurs.

3. Feuille à sommet arrondi :

Ce mutant produit des feuilles à sommet arrondi. A l'exception de ce caractère, cette variété est normale pour ce qui concerne les autres caractères, hormis une croissance très lente (Fig. 6). Elle a été importée de France et appartient à l'espèce *M. alba*.

4. Feuille vernissée :

Ce mutant a été prélevé dans la plantation d'un fermier de l'Etat du Karnataka (Inde). Les feuilles sont anormalement épaisses (3 à 4 fois), vernissées et de couleur vert foncé. Sa croissance est normale, comme celle de Kanva-2 (K-2), une variété répandue. On étudie actuellement cette variété afin d'observer sa résistance au stress du manque d'eau. Elle pousse dressée et son racinement est également bon. Les feuilles sont plus petites que celles de K-2 et présentent quelques froissures minuscules. L'aspect vernissé de la cuticule constitue la seule particularité de ce mutant. Il appartient à l'espèce *M. indica*.

5. Mutant à feuilles panachées :

Ce type a été obtenu par greffage interspécifique au CSR & TI de Mysore. Les feuilles présentent des degrés divers de panachage (Fig. 7). Sur une branche, certaines feuilles sont entièrement blanches et dépourvues de chlorophylle. Certaines feuilles présentent une portion panachée sur une moitié et

d'autres un panachage en plaque. Ce type est unique car dû à un greffage interspécifique. Après quelque temps, les feuilles présentent un roussissement du limbe. Ce type ne possède aucun caractère d'intérêt économique.

Les mutants décrits ici sont conservés au CSR & TI de Mysore et au KSSRDI de Bangalore. Ils peuvent être utilisés pour des études sur la transmission héréditaire et comme marqueurs génétiques. Les données concernant certains des caractères de croissance sont présentées dans le tableau I. Des investigations sur leur degré de ploïdie et leurs anomalies méiotiques, leur mode de transmission héréditaire, de leurs gènes de résistance, etc. sont en cours. De plus, certains de ces mutants, comme le mûrier pleureur, *Serpentina*, le mutant à feuilles froissées, le mutant à feuilles panachées, etc., pourraient être utilisés en raison de leur valeur sur le plan horticole.

**PESTALOTIOPSIS MORIFOLIA N. SP. ON
MORUS ALBA VAR. MR-2**

B.R. DAYAKAR YADAV & B. SARATCHANDRA

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Thally Road, Hosur - 635 109, India.

A new fungus, Pestalotiopsis morifolia sp. nov., was recorded on *Morus alba* var. MR-2 causing leaf-spot symptoms. A survey of literature indicated that such a fungus has hitherto not been reported on *Morus* host. Morphological studies revealed that this fungus produces 2-3 very short apical appendages to the conidia and pale pigmented middle cells, which can be readily distinguished from other known *Pestalotiopsis* species.

Keywords: *Pestalotiopsis morifolia* n. sp., *Morus alba* var. MR-2.

INTRODUCTION

Diseases of mulberry (*Morus* L.) caused by fungal pathogens are of great significance as they adversely affect the yield and quality of leaves, ultimately resulting in economic loss to valuable silk production. During a study of the diseases of mulberry germplasm, a new fungus, *Pestalotiopsis morifolia* n. sp., causing leaf-spot symptoms on variety MR-2 of *Morus alba* L. was found. To our knowledge, this species has not been previously described on *Morus* (Mac Farlane, 1968; Bilgrami et al., 1979, 1981; Anonymous, 1980; Kimura, 1979). Based on the comparative morphological studies it is described here as a new species.

According to the revisions of Steyaert (1949) and Sutton (1969, 1980), all previously described *Pestalotia* species, except *P. pezizoides* de Not., have been transferred to other genera, many to *Pestalotiopsis*. Furthermore, according to Sutton (1980), *Pestalotia* has median cells separated from one another by distosepta, whereas the conidial cells in *Pestalotiopsis* are 4 euseptate. The characteristics have been confirmed by the ultrastructural studies of Griffiths and Swart (1974a, 1974b). This has also been accepted by Nagraj (1985, 1986) who after studying the recent collections and original published descriptions or illustrations made redistribution, redescription and illustrations of *Pestalotiopsis* spp. with separate anamorph and telomorph groups wherever found to occur. Guba (1961) listed *Pestalotia quercicola* Kuhnoltz-Lordat & Barry on living leaves of *Quercus coccifera* L. He described conidia as 5-celled, fusoid of $16-20 \times 4-6.5$ μ m, setulae 2 divergent of equal lengths of 4-6 μ m long. The present fungus under study has 2-3 very short (2-4 μ m long) apical setulae to the conidia and three intermediate pale pigmented cells and hence clearly differs from *P. quercicola*. The only other *Pestalotia* sp. reported is *P. mori* Mont. on dead bark of *Morus* sp. but there is nothing in the description furnished by Castagne to suggest analogy with the genus, *Pestalotia* (Guba, 1961; Saccardo, 1884). The present fungus was also compared with other distinctly marked *Pestalotiopsis* sp. described by Nagraj (1985a, 1985b, 1986) 4 species; Steyaert (1953) 14 species; Bissett (1982) one species. The present species is distinct from other known species of the genus in conidial size and setulae to warrant its identity as a new species and hence named *Pestalotiopsis morifolia* n. sp.

The symptoms manifest as circular to oblong spots of varying size up to 8 mm diameter. Spots are cardinal red (28+) at the centre and margin maroon (42+) coloured (colour code as per the horticultural colour guide) (Fig. 1).

DESCRIPTION OF THE FUNGUS

***Pestalotiopsis morifolia* Yadav & Saratchandra sp. nov. (Fig. 1):**

Pycnidia, amphigenous, scattered erumpent up to 200 μm across, basal and lateral wall cells four to seven cells thick, composed of hyaline to pale brown cells.

Conidiophore: 15 μm long, conidiogenous cells blastic, phialidic, cylindrical to subcylindrical, hyaline smooth and branched.

Conidia: fusiform straight or slightly curved, 4-euseptata, smooth 12-18 μm long (without appendages); basal cell hyaline, truncate, simple; median cells three, together $8-12 \times 4-5 \mu\text{m}$, pale brown, thick-walled, apical cell conic, hyaline, with mostly two or sometimes three setulae, simple and espathulate measure 2-4 μm long.

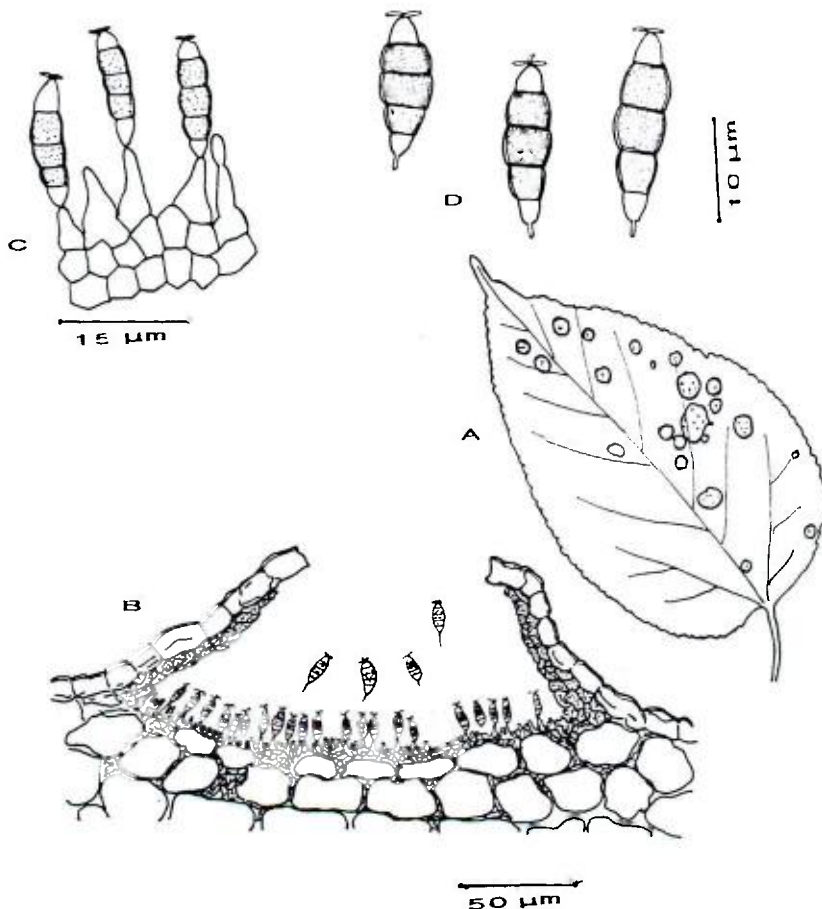


Fig. 1: *Pestalotiopsis morifolia* n. sp.

A: habit. B: Vertical section through stroma. C: Conidiophores. D: Conidia.

A : habitus. B : coupe verticale du stroma. C : conidiophores. D : conidies.

Etymology:

The specific epithet is based on the genus name of the host plant, *Morus* L.

On living leaves of *Morus alba* var. MR-2 at SMGS, Hosur (India), Aug. 1992, collected by B.R.D. Yadav, Holotype IMI # 354722 in CAB International Mycological Institute, UK.

Description of the fungus (in Latin):

Pestalotiopsis morifolia Yadav & Saratchandra sp. nov.

Pycnidia: amphigna, dispersa, erumpentia crassa, dia. 200 µm; parietes basales et laterales cellulis 4-7 hyalinis, pallide brunneis compositae.

Conidiophora: 15 µm longa, cellulis conidiogenous blastis, phialidis, hyalinis.

Conidia: fusiformia, straita veb paulo curvata, 4-septata, 12-18 µm longa, appendiculis destitutis. Cellulae basales, hyalinae, truncatae, simplices. Cellulae mediae tres, pallide brunneae, parietibus crassis, totaliter 8-12 × 4-5 µm. Cellula apicalis conica, simples, spatulata, generatim duabus vel tribus setis, 2-4 µm longa.

Specimen typicum: In foliis vivis *Morus alba* var. Mr-2, ad SMGS (Hosur, Inde), Aug. 1992. Legit B.R.D. Yadav, Holotypus, IMI # 354722.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr B.C. Sutton, Director, International Mycological Institute, CAB, England, for accession and generic identity of the fungus and to Dr Cecil B. Saldanha, Centre for Taxonomic Studies, Bangalore, for the Latin description.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1980) Insect pests and diseases of mulberry trees. In Textbook of Tropical Sericulture. JOCV Publ., 2nd Ed., pp. 260-281.
- BILGRAMI K.S., JAMALUDDIN, RIZWI M.A. (1979) Fungi of India. Part I. Today & Tomorrow's Printers & Publ., New Delhi, 467 pp.
- BILGRAMI K.S., JAMALUDDIN, RIZWI M.A. (1981) Fungi of India. Part II. Today & Tomorrow's Printers & Publ., New Delhi, 268 pp.
- BISSETT J. (1982) *Pestalotiopsis menezesiana* a greenhouse plantings of *Cissus rhombifolia* with notes on related fungi occurring on Vitaceae. Can. J. Bot., 60, 2570-2574.
- GRIFFITHS D.A., SWART H.J. (1974a) Conidial structure in two species of *Pestalotiopsis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 62, 295-304.
- GRIFFITHS D.A., SWART H.J. (1974b) Conidial structure in *Pestalotia pezizoides*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 63, 169-173.
- GUBA E.F. (1961) Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 342 pp.
- KIMURA K. (1979) Mulberry diseases of Japan. Keupakusha Publ. Co., Japan, 163 pp.
- MAC FARLANE H.H. (1968) Review of Applied Mycology, Plant Host-Pathogen Index (1922-1968). CMI, Kew, England (1968 onwards as Review of Plant Pathology).
- NAGRAJ T.R. (1985a) Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. I. The correct name for the type species of *Pestalotiopsis*. Mycotaxon., 22, 43-51.
- NAGRAJ T.R. (1985b) Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. II. *Pestalotiopsis besseyii* (Guba) Comb. nov. and *Pestalospaeria varia* sp. nov. Mycotaxon., 22, 52-63.
- NAGRAJ T.R. (1986) Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. VII. *Pestalotia citrina* P. maura and *Pestalotiopsis uvicola*. Mycotaxon., 26, 211-222.
- STEYAERT R.T. (1949) Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). Bull. Jard. Bot. Brux., 19, 285-354.
- STEYAERT R.T. (1953a) New and old species of *Pestalotiopsis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 36, 81-89.

- STEYAERT R.T. (1953b) New and old species of *Pestalotiopsis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 36, 235-242.
- SUTTON B.C. (1969) Forest microfungi. III: The heterogeneity of *Pestalotia* de Not. Section Sexloculate Klebahn sensu Guba. Can. J. Bot., 48, 2083-2094.
- SUTTON B.C. (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 696 pp.
- SACCARDO P.A. (1884) Sylloge fungorum. 3, 793.

OBSERVATION DE *PESTALOTIOPSIS MORIFOLIA* N. SP. SUR *MORUS ALBA* VAR. MR-2

B.R. DAYAKAR YADAV & B. SARATCHANDRA

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Thally Road, Hosur - 635 109, Inde.

La présence d'un nouveau champignon, Pestalotiopsis morifolia sp. nov., qui provoque les symptômes de la tache foliaire, a été observée sur *Morus alba* var. MR-2. La lecture de la documentation indique que ce champignon n'a pas encore été observé chez *Morus*. Les études morphologiques révèlent que ce champignon produit 2 à 3 appendices apicaux très courts sur les conidies et des cellules médianes pigmentées, qui sont faciles à distinguer de toutes les autres espèces de *Pestalotiopsis* connues.

INTRODUCTION

Les maladies du mûrier (*Morus* L.) provoquées par des agents pathogènes fongiques sont très importantes car elles affectent le rendement et la qualité des feuilles ; ce qui se traduit à terme par des pertes considérables de production de soie. Au cours d'une étude sur les maladies du mûrier, on a observé un nouveau champignon, *Pestalotiopsis morifolia* n. sp., qui provoque les symptômes de la tache foliaire sur la variété MR-2 de *Morus alba* L. A notre connaissance, cette espèce n'a pas encore été décrite chez *Morus* (Mac Farlane, 1968 ; Bilgrami et coll., 1979, 1981 ; Anonyme, 1980 ; Kimura, 1979). Sur la base d'études morphologiques, cette nouvelle espèce est décrite ici.

D'après les révisions de Steyaert (1949) et de Sutton (1969, 1980), toutes les espèces de *Pestalotia* précédemment décrites, sauf *P. pezizoides* de Not., ont été transférées à d'autres genres, en particulier *Pestalotiopsis*. De plus, d'après Sutton (1980), les cellules médianes de *Pestalotia* sont séparées les unes des autres par des cloisons distales tandis que les cellules des conidies de *Pestalotiopsis* sont quadri-euseptales. Ces caractéristiques ont été confirmées par les études ultrastructurelles de Griffiths et Swart (1974a, 1974b). Elles ont également été acceptées par Nagraj (1985, 1986) qui, après avoir étudié les collections récentes et les descriptions ou illustrations originales publiées, a réalisé une révision, une redescription et des illustrations de *Pestalotiopsis* en séparant, le cas échéant, les groupes anamorphes et télomorphes. Guba (1961) a observé *Pestalotia quercicola* Kuhnoltz-Lordat et Barry sur des feuilles non coupées de *Quercus coccifera* L. Selon sa description, les conidies ont cinq cellules, fuselées et mesurant $16-20 \times 4-6,5 \mu\text{m}$, et deux sétules divergentes de longueur égale ($4 \text{ à } 6 \mu\text{m}$). Le champignon étudié ici possède 2 à 3 sétules apicales très courtes ($2 \text{ à } 4 \mu\text{m}$) par conidie et trois cellules intermédiaires faiblement pigmentées ; il diffère donc nettement de *P. quercicola*. Une seule autre espèce de *Pestalotia*, *P. mori* Mont., a été observée sur de l'écorce morte de *Morus* mais rien, dans la description fournie par Castagne, ne suggère d'analogie avec le genre *Pestalotia* (Guba, 1961 ; Saccardo, 1884). Le champignon étudié ici a également été comparé avec d'autres espèces de *Pestalotiopsis* distinctement marquées : 4 espèces décrites par Nagraj (1985a, 1985b, 1986), 14 espèces décrites par Steyaert (1953) et une espèce décrite par Bissett (1982). L'espèce considérée est distincte de toutes les autres espèces connues du même genre par la taille de ses conidies et de ses sétules ; il est donc certain qu'il s'agit d'une nouvelle espèce que nous avons nommée *Pestalotiopsis morifolia* n. sp.

Les symptômes se manifestent sous la forme de taches circulaires à allongées, de taille variable mesurant jusqu'à 8 mm de diamètre. Les taches sont de couleur rouge cardinal (28+) au centre avec une bordure de couleur marron pourpre (42+) (code des couleurs du guide des couleurs horticoles) (Fig. 1).

DESCRIPTION DU CHAMPIGNON

***Pestalotiopsis morifolia* Yadav et Saratchandra sp. nov. (Fig. 1) :**

Pycnides amphigènes, se dispersant jusqu'à 200 µm en travers ; parois cellulaires basales et latérales : épaisseur de quatre à sept cellules, composées de cellules hyalines à marron clair.

Conidiophore : 15 µm de long, cellules conidiogènes blastiques, phialidiques, cylindriques à sous-cylindriques, transparentes, lisses et ramifiées.

Conidies : fuselées et droites ou légèrement incurvées, quadri-euseptales, lisses, 12 à 18 µm de long (sans appendices) ; cellules basales hyalines, tronquées, simples ; cellules médianes : au nombre de trois, dimensions totales 8-12 × 4 à 5 µm, marron clair, à parois épaisses, cellule apicale conique, hyaline avec deux, parfois trois, sétules simples et spatulées mesurant 2 à 4 µm de long.

Etymologie :

L'épithète de spécification est basé sur le nom du genre de la plante hôte, *Morus* L.

Observé sur des feuilles non coupées de *Morus alba* var. MR-2 à la *Silkworm and Mulberry Germplasm Station* de Hosur (Inde) en août 1992, prélevé par B.R.D. Yadav, Holotype IMI # 354722 au CAB International Mycological Institute, Royaume-Uni.

NEW RECORD OF *PARAPUTO* SP. (PSEUDOCOCCIDAE: HOMOPTERA) AS A PEST OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

A.K. MISRA, B.K. DAS & M.M. AHSAN

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, Darjeeling, West Bengal, India.

Keywords: Mulberry, root mealy bug.

Among insect pests, the mealy bug is now considered as a major pest which causes considerable damage to crop production. The incidence and severity of the mealy bug causing Tukra disease in mulberry has been well established (ESCAP, 1990). It has been reported by several authors that the root mealy bug causes serious damage in various crops like groundnut (Ganguli and Ghosh, 1964; Singh *et al.*, 1986), cowpea, green gram, black gram and red gram (Siddaramegowda and Siddappaji, 1981), coffee and citrus (Le Pelley, 1968). Ayyar (1963) reported the root mealy bug as a pest of pineapple. A careful survey of literature reveals that the occurrence and infestation of the root mealy bug has not been reported until now.

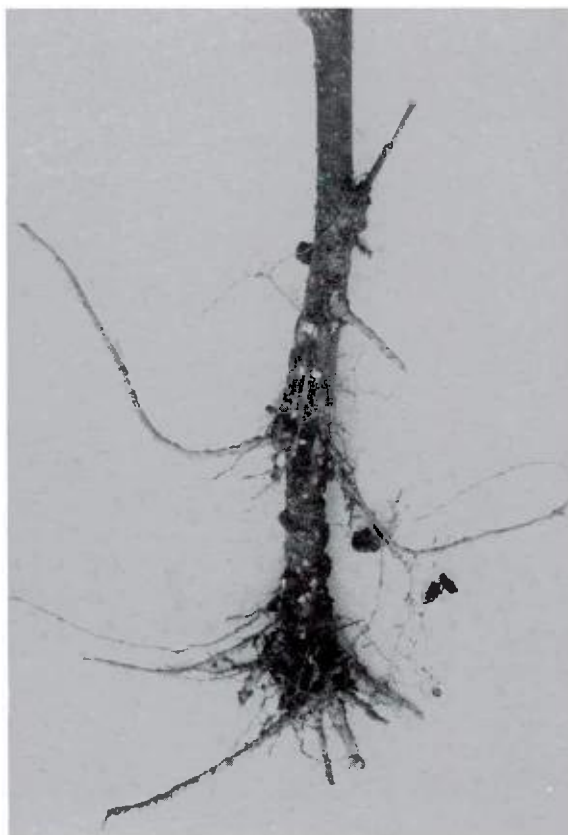


Fig. 1: Occurrence of the root mealy bug (*Paraputo* sp.) in the roots of mulberry.

Fig. 1 : Présence de l'aleurode des racines (*Paraputo* sp.) dans les racines de mûrier.

In the course of field studies during August-September 1993 in the research farm of the Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, the roots and adjacent stump portions of mulberry below the soil surface were found to be severely infested by root mealy bugs. The very small-sized mealy bugs were observed infecting the growing roots. The stumps were attacked by comparatively bigger ones. The population of mealy bugs varied in numbers and were found higher in the sandy loam soil. The leaves of the affected mulberry wilted and turned yellow, resembling the symptoms of drought-affected plants. The roots became stunted and the normal growth of the plants ceased. In some cases, the affected root and stump areas were encased with white mycelium of fungus. The root mealy bugs are of different sizes, white in colour, oval type and waxy. They may change their position and crawl a short distance if any unfavourable conditions in relation to any moisture stress in the soil appear. The mealy bugs were found in groups of 5-8 in number per plant. The infestation was restricted to about 20% of the total plant population. But recently, this root mealy bug has turned out as a major pest of mulberry in the temperate climate of Kalimpong hills.



Fig. 2: Upward crawling of the root mealy bug (*Paraputo* sp.) in the underground part of the stem of mulberry.

Fig. 2 : L'aleurode des racines (Paraputo sp.) se déplace vers le haut de la partie enterrée du tronc du mûrier.

The mealy bug has been identified as *Paraputo* sp. which is dependent on ants to remove waste honeydews. Control of the attendant ants, perhaps with poisoned baits, should result in control of the

root mealy bugs. However, the study on the biology of the pest and the control measures are under progress.

The occurrence of *Paraputo* sp. as a root mealy bug of mulberry (*Morus alba* L.) is first reported by the authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Director, International Institute of Entomology, London, for the identification of the mealy bug as *Paraputo* sp. (IIE No. 23010).

REFERENCES

- AYYAR T.V.R. (1963) Handbook of Economic Entomology for South India. Govt. of Madras, 519 pp.
- ESCAP (1990) *In* Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm. ESCAP Bulletin, United Nations, Bangkok, Thailand.
- GANGULI R.N., GHOSH M.R. (1964) Coccids of *Tripura*. Indian J. Entomology, 26, 358-359.
- LE PELLEY R.H. (1968) *In* Pest of Coffee. Longman, London, 324-330.
- SIDDARAMEGOWDA T.K., SIDDAPPAJI C. (1981) Rhizobium nodule damage by insect fauna and their control. *In* Progress in Soil Biology and Ecology in India. G.K. Veeresh ed., UAS Tech. Ser. No. 37, 228.
- SINGH T.V.K., RAMAN GOUD T., AZAM K.M. (1986) Attack of mealy bug, *Dysmicoccus brevipes* on ground nut. Indian J. Entomology, 48, 358.

**PREMIERE OBSERVATION DE L'INFESTATION DU
MURIER (*MORUS ALBA* L.) PAR *PARAPUTO* SP.
(PSEUDOCOCCIDAE : HOMOPTERA)**

A.K. MISRA, B.K. DAS & M.M. AHSAN

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, Darjeeling, West Bengal, Inde.

L'aleurode est à présent considéré comme l'un des insectes parasites les plus nuisibles car il occasionne des dommages considérables dans les cultures. L'incidence et la sévérité de l'aleurode responsable de la maladie de Tukra chez le mûrier sont bien établies (ESCAP, 1990). De nombreux auteurs ont observé que l'aleurode des racines provoque des dommages considérables dans diverses cultures comme l'arachide (Ganguli et Ghosh, 1964 ; Singh et coll., 1986), *Vigna sinensis*, le poids chiche vert, le poids chiche noir et le poids chiche rouge (Siddaramegowda et Siddappaji, 1981), le café et le citron (Le Pelley, 1968). Ayvar (1963) a observé que l'aleurode des racines infeste l'ananas. La lecture de la documentation révèle que la présence et l'infestation de l'aleurode des racines n'ont pas encore été étudiées.

Au cours d'une étude sur le terrain réalisée en août-septembre 1993 à la ferme expérimentale de la *Regional Sericultural Research Station* de Kalimpong, on a observé que les racines et les parties adjacentes d'une souche de mûrier au-dessous de la surface du sol étaient fortement infestées par des aleurodes des racines. Les aleurodes, de très petite taille, infestent les racines en cours de croissance. Les souches sont infestées par des insectes comparativement plus grands. La population d'aleurodes varie et est plus nombreuse en sol de sable gras. Les feuilles des mûriers infestés se flétrissent et jaunissent comme les feuilles de mûrier affectées par la sécheresse. Les racines se rabougrissent et la croissance des plants est inhibée. Dans certains cas, les racines infestées et les zones autour des souches sont entièrement recouvertes par le mycélium blanc du champignon. Les aleurodes des racines sont de taille variable, de couleur blanche, de forme ovale et d'aspect cireux. Ils peuvent changer de position et se délayer sur une courte distance lorsque les conditions du sol deviennent défavorables relativement au stress du manque d'eau. Les aleurodes des racines sont présents en groupes de 5 à 8 par plant. L'infestation se limite à environ 20 % de la population totale des plants. Récemment, il est apparu que l'aleurode des racines est un parasite majeur du mûrier dans les conditions tempérées des monts de Kalimpong.

L'aleurode a été identifié comme étant du genre *Paraputo* ; il est tributaire des fourmis qui nettoient les déchets de miellure. L'élimination de ces fourmis associées, par exemple avec des appâts empoisonnés, pourrait permettre d'éradiquer l'aleurode des racines. La biologie de ce parasite et les mesures de contrôle sont actuellement à l'étude.

La présence de *Paraputo* comme aleurode des racines de mûrier (*Morus alba* L.) est présentée ici pour la première fois.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	376
General sericulture	
Mûrier	378
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	381
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	385
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	387
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	392
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	398
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	400
Silkworms: silkglands	
Soie	401
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portuguais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Unify the understanding for restoring prestige of China silk.

Unifier les accords pour la restauration du prestige de la soie chinoise.

CHEN Y.

China National Silk Import and Export Corporation, China.

1996 Indian Silk, Vol. 34(12), 23-26. (E)

Etude sur la soie 1995 : examen des tendances internationales de la production et du commerce.

Silk review 1995: a survey of international trends in production and trade.

C.C.I.A.T.C.

Centre du Commerce international, Palais de Nations, 1211 Genève 10, Suisse.

1995 Rapport du C.C.I.A.T.C. : Développement des marchés. 60 p. (F)

Silkworm breeding strategy in Romania during 1994-1996. / Strategia dezvoltării sericulturii în România, în perioada 1994-1996 și în perspectivă.

Stratégie de sélection des vers à soie en Roumanie pour la période 1994-1996.

DINESCU S.

Ministerul Agriculturii și Alimentatiei, București, Romania.

1994 Medicina Veterinara și Creșterea Animalelor (Romania), Vol. 4-5, 1. (Ro)

Studies on artificial culture of *Cordyceps brasidiensis* using the pupae of *Bombyx mori*.

Etudes sur la culture artificielle de *Cordyceps brasidiensis* avec l'utilisation des chrysalides de *Bombyx mori*.

FANG D.

Research Institute of Sericulture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China.

1995 Journal of South China Agricultural University (China), Vol. 16(1), 103-108. (C,e)

The current state and trend of silk production and trade in the world.

La situation actuelle et la tendance de la production et du marché de la soie dans le monde.

GU G., LOU C., GUO Y.

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

1996 Canye Kexue, Vol. 22(2), 99-103. (C,e)

Sericulture and silk production. A handbook.

Sériciculture et production de soie. Un manuel.

HEKAR P., HARDINGHAM M.

1995 Intermediate Technology Publications, London, United Kingdom. 56 p. (E)

Complete works of sericultural technology in China.

Travaux complets de technologie séricole en Chine.

HUANG J., ZHU W., XIA J., XIANG Z.

1995 Sichuan Publishing House of Science and Technology, China. 1096 p. (C)

Silkworm breeding in Japan - The changing concepts.

L'élevage des vers à soie au Japon - Les concepts en mutation.

MAL REDDY N., YAMAMOTO T.

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

1996 Indian Silk, Vol. 35(1), 5-8. (E)

Impact of variation on rearing period and cocoon production.

Impact des variations sur la période d'élevage et la production de cocons.

MAMONI DAS SENAPATI, DAS MAHAPATRA D.P.

CMRTI, Ladoigarh, Jorhat, Assam, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(1), 9-11. (E)

Marketing system of cocoons in Jammu & Kashmir.

Système de commercialisation des cocons au Jammu-et-Cachemire.

MOHD. ABDULLAH BHAT, SHEIKH ARSHAD AYUB.

Sericulture Development Department, Government of Jammu & Kashmir, Srinagar, Jammu & Kashmir, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(1), 13-14. (E)

ISO 9000 and its relevance to Indian silk industry.

La norme ISO 9000 et sa pertinence pour l'industrie de la soie indienne.

NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, B.T.M. Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(12), 27-31. (E)

La place de la sériculture dans la vie des paysans du sud du Karnataka (Inde).

The role of sericulture in peasant life in southern Karnataka (India).

SOULANCE D.

1994 Cahiers d'Outre-Mer (France), Vol. 47(186), 199-224. (F,e)

Sericulture industry in Japan.

L'industrie de la sériculture au Japon.

SURESH KUMAR N., YAMAMOTO T.

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

1996 Indian Silk, Vol. 34(12), 16-18. (E)

Implementing administration of agriculture, industry and commerce in an organic whole to promote the continuous and stable development of cocoon and silk trade.

Mise en place d'une administration de l'agriculture, de l'industrie et du commerce dans un tout systématique pour la promotion d'un développement stable et continu du commerce des cocons et de la soie.

XU Z., LU H., LU K.

Fuan Cocoon & Silk Group Co., Jinagsu Province, Dongtai 224200, China.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(2), 104-107. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Studies on the use of herbicides in mulberry plantation. / Cercetari privind utilizarea erbicidelor in plantatiile de dud.

Etudes sur l'utilisation des herbicides dans les mûraies.

BRAILOIU D., COTEANU O., RUSU V.

Societatea Comerciala de Sericicultura SERICAROM S.A., Bucuresti, Romania.

1994 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania), Vol. 4-5, 23-27. (Ro,e)

A report on the breeding of mulberry variety 'Jinsang 1'.

Un rapport sur la sélection de la variété de mûrier "Jinsang 1".

CHEN S. *et al.*

1996 Canye Kexue, Vol. 22(2), 115-116. (C)

A freeze fracture study designed to clarify the mechanisms of freezing injury due to the freezing-induced close apposition of membranes in cortical parenchyma cells of mulberry.

Une étude par fracture sous congélation mise au point pour clarifier les mécanismes de la blessure due à l'apposition proche des membranes induite par le gel dans les cellules du parenchyme cortical du mûrier.

FUJIKAWA S.

1995 Cryobiology, Vol. 32, 444-454. (E)

Growth injury and morphological characteristics of mulberry under high temperature conditions.

Incident de croissance et caractéristiques morphologiques du mûrier sous des conditions de haute température.

FUKUI K., NAOI T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(3), 165-169. (E,j)

How pathogen attack mulberry ? Scanning electron microscope observations.

Comment les pathogènes s'attaquent-ils au mûrier ? Observations au microscope électronique.

GUPTA V.P., VINEET KUMAR, TEWARI S.K., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K.

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

1996 Indian Silk, Vol. 35(1), 15-19. (E)

Alternative response of two isoprenoid biosynthetic pathways to compactin in *Morus alba* cell cultures.

Réponse alternative de deux voies biosynthétiques des isoprénoides à la compactine dans des cultures de cellules de *Morus alba*.

HANO Y., NOMURA T.

1995 *Naturwissenschaften*, Vol. 82, 376-378. (E)

Simultaneous trapping of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury, and the mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker, by one trap baited with its synthetic sex pheromone, in mulberry fields.

Prises au piège simultanées de la tisseuse *Hyphantria cunea* Drury et de la pyrale du mûrier *Glyphodes pyloalis* Walker avec sa phéromone sexuelle synthétique comme appât dans les mûraies.

IKEGAMI T., FUSEGI T.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 18-25. (J)

Characterization of humic acids isolated from soils under mulberry vegetation.

Caractérisation des acides humiques isolés à partir des sols des plantations de mûriers.

KAR R., DUTTA R.N., MAJUMDER S.K.

1995 *Curr. Sci.*, Vol. 69(1), 67-68. (E)

Sprouting of winter buds, growth of branches and yield of mulberry fields in 1995.

Débourrement des bourgeons d'hiver, croissance des branches et rendements des mûraies en 1995.

OHYAMA H., Tabei T., IIDA Y., NAGASE N.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 49-55. (J)

Polysaccharides of leaves of *Morus alba*.

Les polysaccharides des feuilles de *Morus alba*.

RAKHIMDZHANOV R.T., SANAYOVA M.K., ABIDOV A.A.

1994 *Khim. Priro. Soedin.*, Vol. 6, 820-821. (R)

Blending silviculture with moriculture.

Allier la sylviculture à la moriculture.

REMADEVI O.K., KHALI D.P.

Institute of Wood Science and Technology, Bangalore, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 13-15. (E)

Mulberry genetic resources.

Les ressources génétiques du mûrier.

TIKADER A., RAVINDRAN S., ANANDA RAO A., GIRISH NAIK V., GOEL A.K.

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, P.B. No.44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India.

1996 *Annual Report 1995-96, Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur, India*. 7-29. (E)

Biological control of mulberry root-rot disease.

Lutte biologique contre la maladie du pourrissement des racines chez le mûrier.

TOMY PHILIP, SHARMA D.D., GOVINDAIAH.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 6-8. (E)

Immunoactivities of the polysaccharides from *Morus alba*, *Chlamydomonas mexicana* and *Poria cocos*.

Immunoactivités des polysaccharides de *Morus alba*, *Chlamydomonas mexicana* and *Poria cocos*.

WANG S., WEN Y., HU C.

1995 *Phytother. Res.*, Vol. 9(6), 448-451. (E)

Effects of antibiotics on growth and differentiation of mulberry explants.

Effets des antibiotiques sur la croissance et la différenciation des explants de mûrier.

WANG Y., CHEN A., XIA Z., LI X., NI G.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 72-76. (C,e)

Pathogenicity on the mulberry leaves by anthracnose fungi isolated from various plants.

Pathogénicité vis à vis du mûrier des champignons anthracnose isolés à partir de différentes plantes.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 94-101. (J,e)

Pathogenicity on the leaves of various plants by the mulberry anthracnose fungi.

Pathogénicité des champignons de l'anthracnose du mûrier sur les feuilles de différentes plantes.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohawashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 86-93. (J,e)

The discovery and study on a natural haploid *Morus notabilis* Schneid.

La découverte et l'étude d'un haploïde naturel *Morus notabilis* Schneid.

YU M., XIANG Z., FENG L., KE Y., ZHANG X., JING C.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 630176, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 67-71. (C,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

A pesticide damages bees and silkworms by underhand effects. / Un antiparassitario dai subdoli effetti danneggia api e bachi da seta.

Un pesticide endommage les abeilles et les vers à soie par un effet sournois.

ANONYMOUS

1995 *Apitalia (Italy)*, Vol. 22(5), 16-17. (I)

Recommandation of a simplified method of silkworm larvae feeding in their early stages : twice daily feeding.

Recommandation d'une méthode simplifiée pour le nourrissage des vers à soie aux premiers âges : le nourrissage deux fois par jour.

CHEN L.

Technical Advice Station of Sericulture, Huzhou Municipal Bureau of Agriculture, Zhejiang, China.

1995 *Bulletin of Sericulture (China)*, Vol. 26(1), 26(1), 48-50. (C)

Study of the silk-yield increasing effect of application of juvenile hormone and moulting hormone in the fifth larva stage of *Bombyx mori*.

Etude sur l'effet d'augmentation du rendement en soie dû à l'application de l'hormone juvénile et de l'hormone de mue au cinquième âge larvaire de *Bombyx mori*.

CUI W., MU Z., ZHANG Y., LIU B.

Shandong Agricultural University, Taian, China.

1995 *Bulletin of Sericulture (China)*, Vol. 25(4), 24-26. (C)

Toxicity of agrochemical fungicide N,N'-methylene-bis(2-amino-5-sulfhydryl-1,3,4-thiadiazole) to Chinese silkworms.

Toxicité du fongicide agrochimique N,N'-méthylène-bis(2-amino-5-sulfhydryl-1,3,4-thiadiazole) vis à vis des vers à soie chinois.

HAN N., CHEN H., HUANG X., FAN D.

1995 *Huanjing Wuan Yu Fangzhi*, Vol. 17(2), 14-16. (E)

Susceptibility of the sex-limited silkworm race, 'Ouhaku', to nuclear polyhedrosis virus and *Beauveria bassiana*.

Sensibilité de la race de vers à soie à caractère limité au sexe "Ouhaku" au virus de la polyédrose nucléaire et à *Beauveria Bassiana*.

IKEGAMI T., NAKANISHI H., NOGUCHI Y.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 38-40. (J)

Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea.

Distribution et caractérisation de *Bacillus thuringiensis* isolé à partir des sols des fermes séricicoles en Corée.

KIM H.S., LEE D.W., PARK H.W., KANG S.K., YU Y.M., KIM J.I.

College of Agricultural and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(1), 57-61. (K,e)

Remain of Diflubenzuron extended over a long time, sticked on mulberry leaves.

Restes de Diflubenzuron utilisé sur une longue période, collés au feuilles de mûriers.

KOBAYASHI N.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 41-43. (J)

Preparation of monoclonal antibodies to *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus.

Préparation d'anticorps monoclonaux du virus de la polyédrose nucléaire cytoplasmique de *Bombyx mori*.

KOBAYASHI N., IKEGAMI T.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 33-37. (J)

Selected mating and breeding of multiple silkworm hybrids in south China.

Accouplements sélectionnés et sélection de nombreux hybrides de vers à soie dans le sud de la Chine.

LI B.

Institute of Sericulture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China.

1995 *Guangdong Agricultural Sciences (China)*, Vol. 3, 32-33. (C)

Harm in the midguts and change of ion concentration in hemolymph caused by fluoride toxicosis in the silkworm (*Bombyx mori* L.).

Dommages dans les intestins moyens et changements de la concentration en ion dans l'hémolymphé causés par la toxicose du fluorure chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.).

LÜ S. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 121-122. (C)

Behaviour study of several kinds of Ukrainian silkworms reared in Romania. / Studiul comportarii unor rease de viermi de matase de provenienta ucraineana in conditiile Romaniei.

Etude du comportement de plusieurs sortes de vers à soie ukrainiens élevés en Roumanie.

MATEI A., BRASLA A., BRASLAVSKI M.E.

Societatea Comerciala de Sericultura SERICAROM S.A., Bucuresti, Romania.

1994 *Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania)*, Vol. 4-5, 2-4. (Ro,e)

Studies on food habit mutation in the silkworm. 1. The origin and characteristics of polyphagous strain Fb in *Bombyx mori*.

Etudes sur les habitudes alimentaires chez le ver à soie. 1. L'origine et les caractéristiques de la souche polyphage Fb chez *Bombyx mori*.

NHO S.K., KIM K.A.

College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(1), 27-32. (K,e)

Comparative study of hybrid silkworm in 1995.

Etude comparative des vers à soie hybrides en 1995.

NOGUCHI Y.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 56-58. (J)

Rearing method of the sex-limited silkworm race 'OUHAKU' and development of product that using golden yarn.

Méthode d'élevage de la race de ver à soie à caractère limité au sexe "OUHAKU" et développement de produits utilisant des fils dorés.

NOGUCHI Y., NAKANISHI H., TOMITA K.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.
1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 1-8. (J)

***Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries.**

Les populations de *Bacillus thuringiensis* naturellement présentes dans les feuilles de mûriers : une source possible associée aux insectariums d'élevage de vers à soie.

OHBA M.

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.
1996 *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 80, 56-64. (E)

Accumulation and migration of phenol in sericultural ecosystem.

Accumulation et migration du phénol dans l'écosystème séricicole.

PAN R., WA C., CHEN W.

Jiangsu Provincial Institute of Botany, Nanjing, China.

1995 *Chinese Journal of Ecology (China)*, Vol. 13(4), 23-26. (C,e)

Wide utility disinfectant products for silkworm rearing. / Produse dezinfectante de largă utilitate în sericultură.

Les désinfectants de grande utilité pour l'élevage des vers à soie.

PAU E.

Societatea Comercială de Sericultură SERICAROM S.A., București, Romania.

1994 *Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania)*, Vol. 4-5, 12-14. (Ro,e)

Study of microclimate for silkworm rearing houses. / Studiul factorilor de microclimat din adaposturile sericicole.

Etude du microclimat des magnaneries.

POPESCU M., CIOVICA C., PARASCHIVESCU M.

Societatea Comercială de Sericultură SERICAROM S.A., București, Romania.

1994 *Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania)*, Vol. 4-5, 5-8. (Ro,e)

Field trial analysis of bivoltine hybrids and Jammu local.

Analyse des essais sur le terrain avec des hybrides bivoltins et la variété locale Jammu.

RAZDAN J.L., SIDDIQUI A.A., BALI R.K., BINDROO B.B., TRAG A.R.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miransahib, Jammu, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 35-40. (E)

Comparison of *Fusarium lateritium* formae speciales growth rate cultured on the media amended various monosaccharides.

Comparaison du taux de croissance de *Fusarium lateritium* formae speciales en culture sur des milieux amendés avec différents monosaccharides.

SAITO H., OTANI E., CHINO S., YANAGISAWA K., OYAMADA S.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 207-209. (J)

Banana leaf - An alternative to paraffin paper.

La feuille de bananier - Une alternative au papier de paraffine.

SINGH G.P. et al.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(1), 20-23. (E)

Identification of viral structural polypeptides in the midgut and feces of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with *Bombyx densovirus* type 2.

Identification des polypeptides structuraux viraux dans l'intestin moyen et les fèces du ver à soie *Bombyx mori* infesté par le densovirus de type 2 de *Bombyx*.

SOTOSHIRO H., KOBAYASHI M.

1995 *J. Invert. Pathol.*, Vol. 66, 60-67. (E)

Efficacy of some chemicals on silkworm.

Efficacité de quelques produits chimiques sur le ver à soie.

UMESHA T., GOVINDAN R., DEVAIAH M.C., NARAYANASWAMY T.K.

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

1996 *Mysore J. agri. Sci.*, Vol. 30(2), 170-177. (E)

A new species of *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) found damaging stored silkworm cocoons in India.

Une nouvelle espèce de *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) endommageant les cocons de vers à soie stockés en Inde.

VIJAY VEER, RAO K.M.

Entomology Division, Defence R and D Establishment, Gwalior 474 002, India.

1994 *Journal of Stored Products Research (United Kingdom)*, Vol. 30(4), 283-295. (E)

Effect of electric and magnetic fields on the growth of mulberry-feeding silkworms.

Effets des champs électrique et magnétique sur la croissance des vers à soie nourris au mûrier.

WANG S., WANG X., WU Y.

Shenyang Agricultural University, Liaoning, China.

1995 *Liaoning Agricultural Sciences (China)*, Vol. 2, 3-8. (C)

Difference among varieties of spinning in flat-way of silkworm (*Bombyx mori*).

Différence dans le filage à plat selon les variétés de vers à soie (*Bombyx mori*).

XU M., JIANG Y.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 20(5), 505-507. (C,e)

Feeding response of the silkworm, *Bombyx mori*, to compounds induced by UV irradiation of mulberry leaves.

Réponse alimentaire du ver à soie *Bombyx mori* aux composés induits par l'irradiation aux UV des feuilles de mûriers.

YASUI H., YAZAWA M.

1995 *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Vol. 59, 1326-1327. (E)

Studies on the occurrence of incompletely exuviated pupa of silkworm (*Bombyx mori* L.) fed on artificial diet.

Etudes sur l'occurrence des chrysalides à exuviation incomplète chez les vers à soie (*Bombyx mori* L.) nourris sur aliment artificiel.

ZHANG Y.

Shandong Sericultural Research Institute, Yantai 264002, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 77-83. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Bio-ecology of oak thrips.

Bio-écologie des thrips du chêne.

CHAOBA SINGH K. *et al.*

Regional Tasar Research Station, Imphal, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(1), 28-30. (E)

Investigation on suitable temperature for inducing trimolters of *Antheraea yamamai* with imidazole.

Investigation sur la température convenable pour l'induction à l'imidazole de tri-muants chez *Antheraea yamamai*.

HU C., YÉ G., LU X.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Acta Agriculturae Zhejiangensis (China)*, Vol. 6(3), 185-187. (C,e)

A report on the indoor rearing of Tian silkworm *Antheraea yamamai*.

Un rapport sur l'élevage en magnanerie du ver à soie Tian *Antheraea yamamai*.

JIN C. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 128-129. (C)

Economics of nursery plantation in *Terminalia arjuna*.

Caractéristiques économiques des pépinières de *Terminalia arjuna*.

SINHA K.K., SINHA A.K.

Regional Sericulture Research Station, Central Silk Board, Koraput, Orissa, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 19-20. (E)

Effect of leaf quality on cocoon productivity in *Antheraea mylitta*.

Effet de la qualité des feuilles sur la productivité en cocons chez *Antheraea mylitta*.

SOMASUNDARAM P., HARLAPUR V.K., SAXANA S.K.

BSM & TC, Chandrapur, Maharashtra, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(1), 27, 30. (E)

Plant protection in Tasar food plant.

Protection des plantes nourricières du Tasar.

SRIVASTAVA D.P., KHARE R., SINHA S.S.

Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 32-34. (E)

Ecorace Bhandara and its frequency distribution.

L'écorace Bhandara et sa distribution.

YADAV G.S., SINGH B.M.K., SINHA B.R.P., SINHA S.S.

Regional Tasar Research Station, Bhandara, Maharashtra, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(1), 24-26. (E)

Study on radiated sterile wild silkworm (*Bombyx mandarina*).

Etude sur les vers à soie sauvages stériles irradiés (*Bombyx mandarina*).

YANG R., XIA D., GU W.

Institute of Application of Atomic Energy, Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, China.

1994 *Acta Agriculturae Zhejiangensis (China)*, Vol. 6(3), 180-184. (C,e)

A study on the biological characters of Ailanthus silkworm *Philosamia cynthia*.

Une étude sur les caractères biologiques du ver à soie de l'ailanthe *Philosamia cynthia*.

ZHANG X. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 132-133. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

An application of DNA diagnosis method for preservation of the susceptible strain to densovirus type-1 of the silkworm, *Bombyx mori*.

Une application de la méthode de diagnostic par l'ADN pour la conservation de la souche sensible au virus de la densovirus de type 1 chez le ver à soie *Bombyx mori*.

ABE H., OBAYASHI F., HARADA T., SHIMADA T., YOKOYAMA T., KOBAYASHI M., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(3), 196-200. (J,e)

Linkage studies on the "scanty vitellin" egg mutant of *Bombyx mori*.

Etudes des liaisons du gène mutant de l'oeuf à "vitelline insuffisante" de *Bombyx mori*.

FUJIKAWA K., KAWAGUCHI Y., DOJRA H., BANNO Y., KOGA K.

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 145-146. (E)

Enrichment of middle repetitive element Bm-1 transcripts in translationally active RNA fractions of the silkworm, *Bombyx mori*.

Enrichissement en transcrits de l'élément répété Bm-1 des fractions d'ARN actif en traduction chez le papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

GAO G.P., HERRERA R.J.

Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, FL 33199, USA.

1996 *Genetica*, Vol. 97, 173-182. (E)

Utilization of hybrid vigour - an approach.

Utilisation de la vigueur hybride : une approche.

GHOSH B., RAO P.R.T., SENGUPTA A.K., SEN S.K., SARATCHANDRA B.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 9-12. (E)

Linkage analysis and identification of strains by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse des liaisons et identification des souches par RFLP chez le ver à soie *Bombyx mori*.

HARA W.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 16, 21-30. (J,e)

***Bacillus thuringiensis* ICP gene expression under the control of cryIA(a) gene promoter.**

Expression du gène ICP de *Bacillus thuringiensis* sous le contrôle du promoteur du gène cryIA(a).
HASHIMOTO N., SASAKI J., ASANO S., BANDO H., IIZUKA T.

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 185-191. (J,e)

Specific protein in haemolymph of wild silkworm (*Bombyx mandarina*) and its genetic mode.

Une protéine spécifique dans l'hémolymphe du ver à soie sauvage (*Bombyx mandarina*) et son mode génétique.

HE K., XIA J., YE A.

Institute of Sericulture, Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, China.

1995 *Bulletin of Sericulture (China)*, Vol. 26(1), 8-10. (C)

Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development.

Clonage moléculaire d'un homologue du récepteur d'ecdysone (B1 isoforme) provenant du ver à soie *Bombyx mori* et expression de son ARNm au cours du développement des disques alaires.

KAMIMURA M., TOMITA S., FUJIWARA H.*

*Zoological Institute, Graduate School of Science, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1996 *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113B(2), 341-347. (E)

Characteristics of the first filial (F1) tetraploid females of the silkworm from tetraploid parents.

Caractéristiques des femelles de vers à soie tétraploïdes de première génération (F1) issues de parents tétraploïdes.

KAWAMURA N., SAHARA K., IIZUKA T.

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, N9, W9, Kita-ku, Sapporo 060, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 157-164. (E,j)

Development of analytical techniques of the DNA polymorphism in insects. Special project granted by NISES.

Développement de techniques d'analyse du polymorphisme de l'ADN chez les insectes. Projet spécial subventionné par le NISES.

KIMURA S.

1996 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 16, 1-12. (J)

Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm, *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin.

Copies multiples du gène de la bombyxine du papillon *Bombyx mori*, un peptide apparenté à l'insuline : signes structuraux pour le réarrangement des gènes et duplication responsable des formes moléculaires multiples de la bombyxine.

KONDO H., INO M., SUZUKI A., ISHIZAKI H., IWAMI M.

Department of Biology, School of Science, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan.

1996 *J. Mol. Biol.*, Vol. 259, 926-937. (E)

Polymerase chain reaction analysis of an intron in BmAntp gene.

Analyse PCR d'un intron chez le gène BmAntp.

KOSEGAWA E., HARA W., OKAJIMA T., SHIMIZU K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 16, 13-19. (J,e)

Sequence of two cDNAs encoding silkworm homologs of *Drosophila melanogaster* squid gene.
Séquence de deux ADNc chez le ver à soie codant pour des homologues du gène squid de *Drosophila melanogaster*.

LI F.Q., SUN G.C., UEDA H., HIROSE S.
1995 *Gene*, Vol. 154, 295-296. (E)

A titration procedure of the *Junonia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines.

Une procédure de titrage du densovirus *Junonia coenia* et quantification de la transfection par son ADN génomique cloné dans quatre lignées de cellules de lépidoptères.

LI Y., JOUSSET F.X., GIRAUD C., ROLLING F., QUIOT J.M., BERGOIN M.
Unité de Virologie moléculaire, Station de Pathologie comparée, INRA-UA CNRS 1184, 30380 St Christol lès Alès, France.

1996 *Journal of Virological Methods*, Vol. 57, 47-60. (E)

The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies.

Le gène de la cytochrome oxydase I des insectes : plans évolutifs et amorces conservées pour les études phylogénétiques.

LUNT D.H., ZHANG D.X., SZYMURA J.M., HEWITT G.M.
Population Biology Sector, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, United Kingdom.

1996 *Insect Molecular Biology*, Vol. 5(3), 153-165. (E)

Silkworm genetic resources.

Les ressources génétiques du ver à soie.

MAHADEVAMURTHY T.S. *et al.*
Silkworm and Mulberry Germplasm Station, P.B. No. 44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India.

1996 *Annual Report 1995-96, Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur, India*. 30-39. (E)

Etude structurale et fonctionnelle des gènes d'actine cytoplasmique de *Bombyx mori*.

Structural and functional study on cytoplasmic actin genes of *Bombyx mori*.

MANGE A.
CGMC, UMR 106 CNRS, Université Claude Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

1996 *Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I*, 69600 Villeurbanne, France. 92 p. (F)

The discovery of a new oily silkworm gene 'of'.

La découverte d'un nouveau gène oily "of" chez le ver à soie.

MENG Z. *et al.*
1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 117. (C)

Cloning of a cDNA for DNA supercoiling factor reveals a distinctive Ca⁺⁺-binding protein.

Le clonage d'un ADNc pour le facteur de superhélicité de l'ADN révèle une protéine liant le Ca⁺⁺.

OHTA T., KOBAYASHI M., HIROSE S.*
Department of Developmental Genetics, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka-ken 411, Japan.

1995 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270(26), 15571-15575. (E)

Study on breeding tactics and path analysis of yield component of domestic silkworm in different seasons.

Etude des tactiques de sélection et analyse de path des éléments du rendement chez le ver à soie domestique à différentes saisons.

PAN S.

Department of Biology, Xuzhou Teachers College, Jiangsu, China.

1995 *Hereditas (China)*, Vol. 17(2), 23-25. (C)

Linkage analysis of the gene encoding precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm *Bombyx mori*.

Analyse de liaison du gène codant pour la protéine précurseur de l'hormone de diapause et le neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone chez le papillon *Bombyx mori*.

PINYARAT W., SHIMADA T., XU W.H., SATO Y., YAMASHITA O., KOBAYASHI M.

1995 *Genet. Res.*, Vol 65(2), 105-111. (E)

Applied studies on the analysis of mutation genes and the establishment of mutation gene bank in the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes appliquées sur l'analyse des gènes mutants et l'établissement d'une banque de gènes mutants chez le ver à soie *Bombyx mori*.

QIN J., YI W.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Sericultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 13-19. (C,e)

Data base management. (Mulberry and silkworm genetic resources)

Gestion des bases de données. (Ressources génétiques du ver à soie et du mûrier)

SEKAR S., GOEL A.K.

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, P.B. No. 44, Thally Road, Hosur, 635 109, Tamil Nadu, India.

1996 *Annual Report of the Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur, India*. 40-44. (E)

Phylogenetic relationship of silkworm inferred from sequence data of the arylphorin gene.

Relations phylogénétiques chez les papillons de soie à partir de données d'une séquence du gène d'arylphorine.

SHIMADA T., KURIMOTO Y., KOBAYASHI M.

1995 *Mol. Phylogenet. Evol.*, Vol. 4(3), 223-234. (E)

Heterosis effect on economic traits in new hybrids of the silkworm *Bombyx mori* (L.).

Effet de l'hétérosis sur les caractères économiques chez de nouveaux hybrides du ver à soie *Bombyx mori* (L.).

SINGH T., SUBBA RAO G.

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmalra Post, Kodathi, Bangalore 560 035, India.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 42-46. (E)

Development of polymorphic DNA pattern analysis method using multiple or repetitive genes in the silkworm, *Bombyx mori*.

Développement de la méthode d'analyse d'ADN polymorphique par utilisation de gène répétés ou multiples chez le ver à soie *Bombyx mori*.

TAMURA T., KANDA T., TUNEYAMA I., MURAJI M., YUKUHIRO K., YASUKOCHI Y.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 16, 31-40. (J,e)

Identification of a baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line.

Identification d'un gène de baculovirus, promoteur de la réplication du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* dans une lignée de cellules d'insectes non permissives.

THIEM S.M., DU X., QUENTIN M.E., BERNER M.M.

Department of Entomology and Microbiology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1115, USA.

1996 *Journal of Virology*, Vol. 70(4), 2221-2229. (E)

Breeding of induced silkworm strains with exogenous DNA and their mating combination.

Sélection de souches de vers à soie induites avec un ADN exogène et leur accouplement.

WU F.

Institute of Sericulture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China.

1995 *Guangdong Agricultural Sciences (China)*, Vol. 3, 34-37. (C)

The discovery and research in body wall invaginated tissue of *Bombyx mori* larvae Wu.

La découverte et la recherche du tissu invaginé des parois du corps de la larve de *Bombyx mori* Wu.

WU H., SUN R., WANG Y., NI S.

Sericultural Extension Station of Qidong City, Jiangsu Province, Qidong 226200, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 93-98. (C,e)

Comparative studies on the restriction patterns of NPV-DNA from Tian silkworms *Antheraea pernyi* and oak silkworms *Antheraea yamamai*.

Etudes comparatives des spectres de restriction de l'ADN de NPV provenant des vers à soie Tian *Antheraea pernyi* et des vers à soie du chêne *Antheraea yamamai*.

ZHANG X. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 130-131. (C)

Studies on genetical correlation of sex-linkage effect for cocoon characters in silkworm (*Bombyx mori* L.).

Etudes sur la corrélation génétique de l'effet du linkage sexuel pour les caractères des cocons chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.).

ZHONG B., WU Y., JIANG Z.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 20(6), 634-638. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix.

Rôle du tégument dans la défense de l'insecte : cascade de prophénol oxydase dans la matrice cuticulaire.

ASHIDA M., BREY P.*

*Unité d'Ecologie des Systèmes vectoriels, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

1995 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 92, 10698-10702. (E)

A study on the subcellular localization of calcium in tissues of silkworm, *Bombyx mori* L.

Une étude sur la localisation sub-cellulaire du calcium dans les tissus du vers à soie *Bombyx mori* L.

CHEN Y., FANG Y., WU Y.

Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 84-89. (C,e)

Primary report on some isozyme patterns of silkworm.

Premier rapport sur quelques isozymes chez le ver à soie.

DUAN J., QIAN W.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, Cheina.

1994 *Journal of Anhui Agricultural University (China)*, Vol. 21(4), 489-493. (C)

Healing process of the wound made by puncturing the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*.

Processus de cicatrisation de la blessure faite par les ponctions du tégument larvaire du ver à soie *Bombyx mori*.

FU P.L., IWASHITA Y.*

*Shinshu Junior College, 2384 Iwamurada, Saku, Nagano 385, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(3), 175-181. (J,e)

Testicular ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*.

Les ecdystéroïdes testiculaires chez le papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

FUGO H., YAMAUCHI M., DEDOS S.G.

Dept of Biological Production, Fac. of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric. and Technol., Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

1996 *Proc. Japan Acad.*, Vol. 72(B), 34-37. (E)

Testicular ecdysteroid level in the silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to heat treatment during the wandering stage.

Niveau d'ecdystéroïde testiculaire chez le papillon du ver à soie *Bombyx mori* avec une référence spéciale au traitement à la chaleur au cours du stade de migration.

FUGO H., YAMAUCHI M., DEDOS S.G.

Laboratory of Environmental Physiology and Biochemistry of Insects, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

1995 *Zoological Science*, Vol. 12, 783-788. (E)

Endocrine cascade in insect metamorphosis.

Cascade endocrine dans la métamorphose chez l'insecte.

GILBERT L.I., RYBCZYNSKI R., TOBE S.S.

Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA.

1996 in "Metamorphosis", Gilbert L.I. et al. Eds, Academic Press, San Diego, USA, 59-107. (E)

Developmental regulation of juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of *Bombyx mori*.

Régulation au cours du développement de la biosynthèse de l'hormone juvénile par les corpora allata de *Bombyx mori*.

GU S.H., CHOW Y.S., YIN C.M.

Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 11529, Republic of China.

1995 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 112A(1), 91-98. (E)

Developmental regulation of juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of *Bombyx mori*.

Régulation au cours du développement de la biosynthèse de l'hormone juvénile par les corpora allata de *Bombyx mori*.

GU S.H., CHOW Y.S., YIN C.M.

1995 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 112A, 91-98. (E)

Influence of infection with *Nosema bombycis* on activities of protease in intestinal juice and alkaline phosphatase in midgut epithelium of silkworm, *Bombyx mori*.

Influence de l'infection par *Nosema bombycis* sur les activités de la protéase dans le suc intestinal et la phosphatase alcaline dans l'épithélium de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*.

GUO X. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 123-124. (C)

Production in *Escherichia coli* of Moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*.

Production chez *Escherichia coli* de la Moricine, un nouveau peptide de type antibactérien isolé chez le ver à soie *Bombyx mori*.

HARA S., YAMAKAWA M.*

*Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 220, 664-669. (E)

Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*.

La Moricine, un nouveau type de peptide antibactérien isolé à partir du ver à soie *Bombyx mori*.

HARA S., YAMAKAWA M.*

*Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270(50), 29923-29927. (E)

A new melanin biosynthesis inhibitor, melanoxadin from fungal metabolite by using the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Un nouvel inhibiteur de la biosynthèse de la mélanine, la mélanoxadine, provenant de métabolites fongiques par utilisation de l'hémolymphe larvaire du ver à soie *Bombyx mori*.

HASHIMOTO R., TAKAHASHI S., HAMANO K., NAKAGAWA A.

1995 *J. of Antibiotics*, Vol. 48, 1052-1054. (E)

Insect physiology: the emerging story of ecdysis.

Physiologie de l'insecte : l'histoire naissante de l'ecdysis.

HESTERLEE S., MORTON D.B.

ARL Division of Neurobiology, University of Arizona, 611 Gould-Simpson Building, Tucson, Arizona 85721, USA.

1996 *Current Biology*, Vol. 6(6), 648-650. (E)

Structure of neurosecretory cells with immunoreactive diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*.

Etude de la structure des cellules neurosécrétrices avec l'hormone de diapause immunoréactive et la phéromone activant la biosynthèse du neuropeptide chez le ver à soie *Bombyx mori*.

ICHIKAWA T., HASAGAWA K., SHIMIZU I., KATSUNO K., KATAOKA H., ZUZUKI A.

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.

1995 *Zoological Science*, Vol. 12, 703-712. (E)

Neural inactivation of sex pheromone production in mated females of the silkworm moth, *Bombyx mori*.

Inactivation neurale de la production de phéromone sexuelle chez les femelles accouplées du papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

ICHIKAWA T., SHIOTA T., KUNIYOSHI H.

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.

1996 *Zoological Science*, Vol. 13, 27-33. (E)

Functional differentiation of neurosecretory cells with immunoreactive diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide of the moth, *Bombyx mori*.

Différenciation fonctionnelle des cellules neurosécrétrices avec l'hormone de diapause immunoréactive et la phéromone activant la biosynthèse du neuropeptide du papillon *Bombyx mori*.

ICHIKAWA T., SHIOTA T., SHIMIZU I., KATAOKA H.

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.

1996 *Zoological Science*, Vol. 13, 21-25. (E)

Effects of agricultural chemicals within tebufenozide on the growth of silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des produits chimiques contenant du tebufenozide utilisés en agriculture sur la croissance des vers à soie *Bombyx mori*.

IKGAMI T., KOBAYASHI N., FUSEGI T.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-01, Japan.

1996 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 4, 44-48. (J)

Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide, from the heads of male silkworm moths.

Isolement et structure partielle d'un peptide lipophile unique, le peptide VAP, provenant des têtes des papillons mâles du ver à soie.

IMAI K., SUGIURA K., KOMIYA T., YAMASHITA O.*

*School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan.

1996 *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 60(2), 355-357. (E)

Melatonin and arylalkylamine N-acetyl transferase activity in the silkworm, *Bombyx mori*.

Activité de l'arylalkylamine N-acétyl transférase et de la mélatonine chez le ver à soie *Bombyx mori*.

ITOH M.T., HATTORI A., NOMURA T., SUMI Y., SUZUKI T.

1995 *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 115(1), 56-64. (E)

Photoperiod effect on larval-pupal characters, fat body nucleic acids and protein of silkworm, *Bombyx mori*.

Effet de la photopériode sur les caractères larvo-nympaux, les acides nucléiques et les protéines du corps adipeux chez le ver à soie *Bombyx mori*.

JANARTHANAN S., SATHIAMOORTHY M., RATHINAM K.M.S., KRISHNAN M.

1994 *Insect Sci. Its Appl.*, Vol. 15(2), 129-137. (E)

On the hormonal control of insect metamorphosis. A historical review.

Le contrôle hormonal de la métamorphose chez l'insecte. Une revue historique.

KARLSON P.

Haselhecke 32, 35041 Marburg, Germany.

1996 *Int. J. Dev. Biol.*, Vol. 40, 93-96. (E)

Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*.

Protéines liantes des antennes de *Bombyx mori*.

KRIEGER J., VON NICKISCH-ROSENEGK E., MAMELI M., PELOSI P., BREER H.*

*University of Pisa, Istituto di Industrie Agrarie, Via S. Michele 4, 56124 Pisa, Italy.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(3), 297-307. (E)

Effects of the topical application of an insect growth regulator (Fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets de l'application topique d'un régulateur de croissance d'insecte (Fénoxy-carbe) sur quelques paramètres physiologiques au cinquième âge larvaire chez le ver à soie *Bombyx mori*.

LEONARDI M.G., CAPPELLOZZA S., IANNE P., CAPPELLOZZA L., PARENTIS P., GIORDANA B.

Department of Biology, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

1996 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 113b(2), 361-365. (E)

Identification of insect cell lines by DNA amplification fingerprinting (DAF).

Identification des lignées de cellules d'insectes par empreinte d'amplification de l'ADN.

MCINTOSH A.H., GRASELA J.J., MATTERI R.L.

USDA, Agricultural Research Service, Biological Control of Insects Research Laboratory, 1503 S. Providence, Columbia, MO 65203, USA.

1996 *Insect Molecular Biology*, Vol. 5(3), 187-195. (E)

An automated ecdysteroid receptor binding assay using a 96-well microplate.

Un dosage automatique du récepteur d'ecdystéroïde utilisant une microplaque de titration de 96 puits.

MIKITANI K.

Agricultural Chemicals Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., 4-2-1 Takatsukasa, Takarazuka, Hyogo 665, Japan

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(2), 141-144. (E)

Three dimensional structure and receptor recognition surface of bombyxin-II, an insulin related peptide of the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure tri-dimensionnelle et surface de reconnaissance des récepteurs de la bombyxine-II, un peptide de type insuline chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NAGATA K. et al.

1994 *Pept. Chem.*, Vol. 32nd, 85-88. (E)

Insect prothoracicotropic hormone: a new member of the vertebrate growth factor superfamily.
L'hormone prothoracicotrope d'insecte : un nouveau membre de la super famille des facteurs de croissance chez les invertébrés.

NOGUTI T. *et al.*

Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Biology, School of Science, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan.

1995 *FEBS Letters*, Vol. 376, 251-256. (E)

Purification and characterization of hemolymph 3-dehydroecdysteroid 3 β -reductase of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation de la 3-déshydroecdystéroïde 3-béta-réductase de l'hémolymph du ver à soie *Bombyx mori*.

NOMURA Y., KOMATSUZAKI M., IWAMI M., SAKURAI S.*

*Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa 920-11, Japan.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(3), 249-257. (E)

Effect of fenoxycarb (insect growth regulator) on the molting of silkworm larvae.

Effet du fénoxycarbe (régulateur de croissance d'insecte) sur la mue des larves du ver à soie.

OGISO M., ASAYAMA T.

1994 *Aichi-ken Nogyo Sogo Shikenjo Kenkyu Hokoku*, Vol. 26, 299-304. (J)

***Bombyx* and *Manduca* prothoracicotropic hormones: an immunologic test for relatedness.**

Les hormones prothoracicotropes de *Bombyx* et de *Manduca* : un test immunologique pour la parenté.

RYBCZYNSKI R., MIZOGUCHI A., GILBERT L.I.

Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA.

1996 *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 102, 247-254. (E)

Evolution of insect metamorphosis.

Evolution de la métamorphose des insectes.

SEHNAL F., SVACHA P., ZRZAVY J.

Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic.

1996 in "Metamorphosis" edited by Gilbert L.I. *et al.*, Academic Press, 3-58. (E)

Purification, characterization and properties of carboxylesterase from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification, caractérisation et propriétés de la carboxylestérase de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*.

SIDDALINGA MURTHY K.R., VEERABHADRAPPA P.S.*

*Department of Chemistry, Central College, Bangalore University, Bangalore 560 001, India.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(3), 287-296. (E)

Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type.

Le récepteur 38 d'hormones chez la Drosophile : un second partenaire pour l'USP de la Drosophile qui suggère un rôle inattendu pour les récepteurs nucléaires de la protéine B induite par le facteur de croissance nerveux.

SUTHERLAND J.D., KOZLOVA T., TZERTZINIS G., KAFATOS F.C.*

*European Molecular Biology Laboratory, Postfach 10.2209, 69012 Heidelberg, Germany.

1995 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 92, 7966-7970. (E)

***Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor.**

Bombyx EcR (BmEcR) et *Bombyx* USP (BmCF1) se combinent pour former un récepteur d'ecdysone fonctionnel.

SWEVERS L., CHERBAS L., CHERBAS P., IATROU K.*

*Department of Medical Biochemistry, University of Calgary, 3330 Hospital Dr. N. W., Calgary AB T2N 4N1, Canada.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(3), 217-222. (E)

The insect neuropeptide prothoracicotropic hormone is released with a daily rhythm: re-evaluation of its role in development.

L'hormone prothoracicotrope d'insecte est libérée quotidiennement : ré-évaluation de son rôle dans le développement.

VAFOPOULOU X., STEEL C.G.H.

Department of Biology, York University, 4700 Keele Street, North York, Ontario M3J 1P3, Canada.

1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, 3368-3372. (E)

Glycosylation in Lepidopteran insect cells: identification of a beta1-4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains.

Glycosylation dans les cellules des Lépidoptères : identification d'une beta1-4-N-acétylgalactosaminyltransférase impliquée dans la synthèse des chaînes d'oligosaccharides de type complexe.

Van DIE I., Van TETERING A., BAKKER H., Van den EIJNDEN D.H., JOZIASSE D.H.

Department of Medical Chemistry, Vrije Universiteit, Van Der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, The Netherlands.

1996 *Glycobiology*, Vol. 6(2), 157-164. (E)

The brain neurosecretory cells of the moth *Samia cynthia ricini*: Immunohistochemical localization and developmental changes of the *Samia* homologues of the *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin.

Les cellules neurosécrétrices cérébrales du papillon *Samia cynthia* : localisation immunochimique et changements au cours du développement chez *Samia* des homologues de l'hormone prothoracicotrope de *Bombyx* et de la bombyxine.

YAGI Y. *et al.*

Department of Biology, School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.

1995 *Develop. Growth Differ.*, Vol. 37, 505-516. (E)

Reexamination of properties of prophenoloxidase isolated from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Nouvel examen des propriétés de la prophénoloxdase isolée à partir de l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori*.

YASUHARA Y., KOIZUMI Y., KATAGIRI C., ASHIDA M.

1995 *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 320(1), 14-23. (E)

A study on the flavonoid in silkworm feces.

Une étude sur les flavonoïdes dans les fèces du ver à soie.

ZHU X., JIANG Z., TANG M.

Sericultural Department of Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 90-92. (C,e)

Redox-shift of the pheromone-binding protein in the silkworm, *Antheraea polyphemus*.

Changement redox de la protéine liant la phéromone chez le papillon *Antheraea polyphemus*.

ZIEGELBERGER G.

1995 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 232, 706-711. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Amino acid sequence of PIN peptides conducting TIME (Time-Interval-Measuring-Esterase) activation for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*.

Séquence d'acides aminés des peptides PIN conduisant l'activation de l'estérase mesurant l'intervalle de temps (TIME) pour la reprise du développement embryonnaire chez le ver à soie *Bombyx mori*.

ISOBE M., SUWAN S., KAI H., KATAGIRI N., IKEDA M.

Laboratory of Organic Chemistry, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1995 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5(23), 2851-2854. (E)

Effects of microwave irradiation on pupae of the silkworm.

Effets de l'irradiation aux micro-ondes sur les chrysalides du ver à soie.

KAGAWA T.

Saitama Cocoon Testing Station, Akebono, Kumagaya, Saitama 360, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(3), 192-195. (J,e)

Time interval measuring enzyme for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*.

Enzyme mesurant l'intervalle de temps pour la reprise du développement embryonnaire chez le ver à soie *Bombyx mori*.

KAI H., KOTANI Y., MIAO Y., AZUMA M.

Insect Biochemistry and Biotechnology, Department of Bioresource Science, Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama, Tottori 680, Japan.

1995 Journal of Insect Physiology, Vol. 41(10), 905-910. (E)

Influence of amount of feed on the reproductive performances of silkworms. / Influenta cantitatii de hrana asupra caracterelor de reproductie la viermii de matase.

Influence de la quantité de nourriture sur les performances de reproduction des vers à soie.

POPESCU M.

Societatea Comerciala de Sericicultura SERICAROM S.A., Bucurest, Romania.

1994 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania), Vol. 4-5, 15-17. (Ro,e)

Physiological relationships between insect diapause and cold tolerance: Coevolution or coincidence?

Relations physiologiques entre la diapause des insectes et la tolérance au froid : évolution conjointe ou coincidence ?

PULLIN A.S.

Centre for Applied Entomology and Parasitology, Department of Biological Science, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, United Kingdom.

1996 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 93(2), 121-129. (E)

Induction of hexaploid by hot water treatment of inseminated eggs in the silkworm, *Bombyx mori*.

Induction d'hexaploïdes par traitement à l'eau chaude des oeufs chez le ver à soie *Bombyx mori*.

YOKOYAMA T., SUZUKI M., CHEN F.S., ABE H., NAKAGAKI M., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 151-156. (Ej)

Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth, *Antheraea pernyi*.

Présence d'une cathepsine B analogue à la protéinase à cystéine acide dans les oeufs du papillon du ver à soie *Antheraea pernyi*.

ZHAO X., WANG J., YAGI N., YAMAMOTO Y., WATABE S., TAKAHASHI S.Y.

Department of Biology, Shandong University, Jinan, Shandong, China.

1996 *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113B(1), 95-103. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silkglands

Effects of phytohormones on nucleic acid level in the posterior silkgland of silkworm (*Bombyx mori*).

Effets de phytohormones sur le taux d'acides nucléiques dans la glande séricigène postérieure du ver à soie (*Bombyx mori*).

LI R., ZHANG Y.

Suzhou Sericulture College, Jiangsu, China.

1994 *Acta Entomologica Sinica (China)*, Vol. 37(3), 378-381. (C)

Silk gland factor-1 involved in the regulation of *Bombyx* sericin-1 gene contains fork head motif.

Le facteur 1 de la glande séricigène impliqué dans la régulation du gène de la sérécine 1 de *Bombyx* contient un motif en tête de fourche.

MACH V., TAKIYA S., OHNO K., HANDA H., IMAI T., SUZUKU Y.*

National Institute for Basic Biology, 38 Nishigonaka, Myodaiji-cho, Okazaki 444, Japan.

1996 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270(16), 9340-9646. (E)

Effect of co-treatment with juvenile hormone and ecdysone on the ultrastructure of cells of the posterior silk gland in *Bombyx mori*.

Effet du traitement conjoint à l'hormone juvénile et à l'ecdysone sur l'ultrastructure des cellules dans la glande séricigène postérieure chez *Bombyx mori*.

MU Z. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 125-127. (C)

Studies on P25 gene expression in silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'expression du gène P25 chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MUTHUMANI K.

Sericulture Research Unit, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India

1995 *PhD Thesis, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India*. 117 p. (E)

Molecular biology of silk proteins (continued).

Biologie moléculaire des protéines de la soie (suite).

SHIMURA K.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 108-114. (C)

Molecular cloning of a zinc finger protein belonging to the GLI-Kruppel family and its expression in the silk gland.

Clonage moléculaire d'une protéine de doigt de zinc appartenant à la famille GLI-Kruppel et son expression dans la glande séricigène.

XU P.X., XU S., SUZUKI Y.

1995 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 37(2), 149-155. (E)

Soie

Silk

The study on the sericin fixation by formalin and glutaraldehyde mixture.

Etude sur la fixation de la sérécine par un mélange de formaldéhyde et de glutaraldéhyde.

BAE D.G.

College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea Republic.

1994 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 36(2), 152-156. (K,e)

Influence of silk cocoons drying conditions on the filament length and on the reeling output. / Influenta conditiilor de etufare a gogosilor de matase asupra lungimii fibrei si randamentului la filare.

Influence des conditions de séchage des cocons sur la longueur du filament et le rendement au filage.

BRASLA A., BURCA S., STOIAN I.

Societatea Comerciala de Sericicultura SERICAROM S.A., Bucuresti, Romania.

1994 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor (Romania), Vol. 4-5, 9-11. (Ro,e)

Isolation of tyrosine from silk fibroin by enzyme hydrolysis.

Isolement de la tyrosine à partir de la fibroïne de soie par hydrolyse d'enzyme.

CHEN G., ARAI M., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(3), 182-184. (J,e)

Enzymatic hydrolysis of silk fibroin.

Hydrolyse enzymatique de la fibroïne de soie.

CHEN K., UMEDA Y., HIRABAYASHI K.

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(2), 131-133. (E)

Characterizing the cross sectional geometry of the non-cylindrical, twisted fibers (spider silk).

Caractérisation de la géométrie de la section transversale des fibres torsadées et non cylindriques (soie d'araignée).

DUNAWAY D.L., THIEL B.L., SRINIVASAN S.G.

1995 J. Mater. Sci., Vol. 30(16), 4161-4170. (E)

Raman spectroscopic studies of silk.

Etudes spectroscopiques Raman de la soie.

EDWARDS H.G.M., FARWELL D.W.

1995 *J. Raman Spectrosc.*, Vol. 26(8/9), 901-909. (E)**Control of alkali quantity and peroxide value in refining silk cocoon oil.**

Contrôle de la quantité d'alcali et de la valeur peroxyde dans l'huile de cocon de soie raffinée.

HE H., YANG X., LIU Y., WU W.

1995 *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, Vol. 7(2), 85-88. (C)**Size dependency of the physical properties of *Bombyx* silk.**Les propriétés physiques de la soie de *Bombyx* dépendent du titre.

IIZUKA E.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 102-108. (E,j)**Comparative studies on the physical properties of extrathick and extrafine silk thread produced by different varieties of *Bombyx mori*.**Etudes comparatives des propriétés physiques des fils de soie extrafins et extraforts produits par différentes variétés de *Bombyx mori*.

IIZUKA E., TERAMOTO A., LU Q., MIN S.S., SHIMIZU O.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 134-136. (E)**Amorphization of natural silk fibroin exposed to intense forces.**

Transformation amorphe de la fibroïne de soie naturelle exposée à des forces intenses.

ISLAMOV B.K., TURAEV K.A., ASKAROV M.A.

1994 *Dokl. Akad. Nauk Resp. Uzb.*, Vol. 2, 26-27. (E)**Structure and chemical composition of silk proteins in relation to silkworm diet.**

Structure et composition chimique des protéines de la soie en relation avec l'alimentation du ver à soie.

ITO H. *et al.*

Heian Jogakin (Saint Agnes') College, Nampeidai, Takatsuki, Osaka 569, Japan.

1995 *Textile Research Journal*, Vol. 65(12), 15-19. (E)**Possible involvement of serine and glycine in the yellowing of acid hydrolyzed silk.**

Participation possible de la sérine et de la glycine dans le jaunissement de la soie hydrolysée à l'acide.

KAILI C., AYUB Z.H., HIRABAYASHI K.

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 109-113. (E,j)**Effects of chitosan-treatment on the air permeability and heating resistance of silk fabrics.**

Effets du traitement au chitosan sur la perméabilité à l'air et la résistance à la chaleur des tissus de soie.

KAKO T., KOMURASAKI K., KATAYAMA A.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 128-130. (J)**Crease recovery of silk treated with a water-soluble tri-functional epoxide by padding and curing method.**

Redressement des plis de la soie traitée avec un époxyde tri-fonctionnel soluble dans l'eau par une méthode d'élimination et de tamponnage.

KAMIISHI Y.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(3), 213-215. (J)

Physical properties of tussah silk fabrics treated with a mixture of glyoxal and urethane compounds.

Propriétés physiques des tissus de soie tussah traités avec un mélange de composés de glyoxal et d'uréthane.

KAWAHARA Y., SHIOYA M., TAKAKU A.

Tokyo Metropolitan Textile Research Institute, 3-15-5 Honjo, Sumida-ku, Tokyo 130, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 205-206. (E)

Structure and mechanical properties of silk fiber stretched in aqueous solution of LiBr.

Structure et propriétés mécaniques de la fibre de soie étirée dans une solution aqueuse de LiBr.

KIM D.K., KONISHI T., CHOI J.H.

Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(1), 33-38. (K,e)

Drawing of silk fibroin fibres treated with LiBr aqueous solution.

Etirage des fibres de fibroïne de soie traitées avec une solution aqueuse de LiBr.

KIM D.K., SAKABE H., ITOH T., KONISHI T.

1995 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 51(6), 257-262. (J)

Studies on fabrics woven with silk/polyester compound yarn.

Etudes sur les étoffes tissées avec du fil composé de soie et de polyester.

KIM Y.D., KIM N.J., SONG K.E., NAHM J.H.

Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

1994 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 36(2), 147-151. (K,e)

Tricine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of low-molecular-weight cocoon shell proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-Tricine des protéines à faible poids moléculaire de la coque soyeuse du ver à soie *Bombyx mori*.

KURIOKA A., HIRANO H.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(2), 125-127. (J)

Cocoon shell peptides analysis separated by acid extraction.

Analyse des peptides de la coque soyeuse séparés par extraction à l'acide.

KURIOKA A., YAMAZAKI M., HIRANO H.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(3), 210-212. (J)

Structural characteristics and physical properties of wild silk fibres, *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*.

Caractéristiques structurelles et propriétés physiques des fibres de soie sauvages *Antheraea pernyi* et *Antheraea yamamai*.

KWEON H.Y., PARK Y.H.

College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1994 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 36(2), 138-146. (K,e)

An investigation and correlation analysis on the sericin content of cocoon shells of silkworm germplasm resources.

Enquête et analyse de corrélation sur le titre en sérécine des coques soyeuses des ressources de la banque génétique du ver à soie.

LIN C. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(2), 118-120. (C)

Regenerated silk fibroin membrane as immobilization matrix for peroxidase and fabrication of sensor for hydrogen peroxide utilizing methylene blue as electron shuttle.

Membrane de fibroïne de soie régénérée comme matrice d'immobilisation pour la peroxydase et fabrication d'un détecteur pour le peroxyde d'hydrogène par utilisation du bleu de méthylène comme navette d'électrons.

LIU Y., LIU H., QIAN J., DENG J., YU T.
1995 *Anal. Chim. Acta*, Vol. 316(1), 65-72. (E)

Softness of laminated silk sheet.

Souplesse des feuilles de soie laminées.

LU X., OKAZAKI M., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16, Nakamachi, Kaganei, Tokyo 184, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 81-85. (J,e)

Silk proteins: potential as a bio-compatible material.

Les protéines de soie : potentiel en tant que matériel bio-compatible.

MINOURA N.

1995 *Seitai Zairyo*, Vol. 13(4), 184-190. (J)

Analysis of the non-broken length of cocoon filament by using frequency data.

Analyse de la longueur sans casse du filament du cocon par utilisation de données de fréquence.

MIURA M., MORIKAWA H., IWASA A., SHIBATA T.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 137-140. (J)

Qualities of cocoon and cocoon filament of the precocious trimolting silkworm, *Bombyx mori*, induced by trifumin.

Qualités du cocon et du filament du cocon du ver à soie trimuant précoce *Bombyx mori* induit par la trifumine.

MOON J.Y., HONG S.J., LEE H.S., LEE K.K., CHANG S.J.

Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1994 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 36(2), 124-129. (K,e)

Hydrogen peroxide - a safe and effective cocoon softening agent.

L'eau oxygénée : un agent adoucissant efficace et sans danger pour les cocons.

MOON M.A., SENGUPTA D., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 834 303, Bihar, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(12), 21-22. (E)

Textiles care and silk.

Entretien des textiles et soie.

NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, B.T.M. Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(1), 31-36. (E)

Dyeing of silk fabrics with the pigments separated from a powdered dry Indian Madder

Teinture des tissus de soie avec les pigments isolés à partir d'Indian Madder sec en poudre.

SAKATA K., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(3), 170-174. (J,e)

***Bombyx mori* silk fibroin material for immobilization of urease and preparation of urea electrode.**

La fibroïne de soie de *Bombyx mori* pour l'immobilisation de l'uréase et la préparation de l'électrode d'urée.

SHAO Z.Z., FANG Y., DENG J.Q., YU T.Y.

1995 *Huaxue Xuebao*, Vol. 53(9), 883-888. (C)

Practical performances of methacrylamide-treated silk fibers.

Performances pratiques des fibres de soie traitées au méthacrylamide.

SHIN B.S.

Sangju National Polytechnic University, Sangju, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(1), 39-45. (K,e)

Effects of freezing on the dissolution and tenacity of sericin.

Effets de la congélation sur la dissolution et la ténacité de la sérécine.

SIJIA M., SIGEMATSU M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokita, Ueda 386, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 120-124. (J,e)

Design, synthesis and characterization of rCAS protein modeled after repeats in an insect silk protein (*Chironomus tentans*).

Dessin, synthèse et caractérisation de la protéine rCAS modélisée après répétitions dans une protéine de soie d'insecte (*Chironomus tentans*).

SMITH S.V.

1995 *PhD Thesis*, University of Mississippi, USA.

Disulfide bonds in a recombinant protein modeled after a core in an aquatic insect's silk protein.

Ponts disulfures dans une protéine recombinante modélisée dans une protéine de soie d'un insecte aquatique.

SMITH S.V., CORREIA J.J., CASE S.T.

1995 *Protein Sci.*, Vol. 4(5), 945-954. (E)

Test of cleanness and neatness of raw silk with a defects classification system.

Test de netteté et de propreté de la soie grège avec un système de classification des défauts.

TAJIMA F., ISHIGURO Y.

Faculty of Education, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(2), 114-119. (J,e)

Raman study on tussah silk protein molecules.

Etude Raman sur les molécules des protéines de soie tussah.

WANG G., HU J., CHENG G.

1995 *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, Vol. 15(4), 39-40, 70. (C)

Influence of pests on quality of stored cocoon and silk.

Influence des parasites sur la qualité des cocons et de la soie stockés.

XU C., HE L.

Department of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing, Sichuan, China.

1994 *Journal of Southwest Agricultural University (China)*, Vol. 16(3), 187-189. (C,e)

STM study of silk fibroin obtained from silkworm.

Etude STM de la fibroïne de soie obtenue à partir des cocons.

YANG X., ZHANG S., CHEN Y., HUA S.

1994 *Zhenkong Kexue Yu Jishu*, Vol. 14(5), 336-340. (E)

Study on sericin fixation with glutaraldehyde.

Etude sur la fixation de la sérécine avec du glutaraldéhyde.

YAO Y., LIU G., CHEN C.

1994 Zhenjiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 11(3), 1-5. (C)

Structure of the blend membrane of regenerated silk fibroin and glucose oxidase and its application to glucose sensor.

Structure de la membrane mixte de fibroïne de soie régénérée et de glucose oxydase et son application comme détecteur de glucose.

ZHANG X., LIU H., LIU Y., DENG J., YU T.

1995 Anal. Lett., Vol. 28(9), 1593-1609. (E)

Preparation of the peroxidase-immobilized fibroin membrane and its characteristics.

Préparation d'une membrane de fibroïne avec peroxydase immobilisée et ses caractéristiques.

ZHANG Y., ZHOU Y.

1995 Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan, Vol. 22(2), 162-165. (C)