

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION EDITORIAL BOARD

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

SOMMAIRE - CONTENTS

Revue / Review

- Rearing of the silkworm, *Bombyx mori* L., on artificial diets: retrospect and prospects 407
 Elevage du ver à soie *Bombyx mori* L. sur aliments artificiels : rétrospective et prospective 419
 S.K. CHOWDHARY

Articles scientifiques / Scientific papers

- Crossover frequencies in the silkworm, *Bombyx mori* L., are under the influence of stresses experienced in early ontogenesis 423
 Les fréquences de *crossing-over* chez le ver à soie *Bombyx mori* sont influencées par les stress subis au début de l'ontogenèse 433
 S.S. PALII & V.V. KLIMENKO
- Evidence that fat body may be a target organ for oestrogen in *Bombyx mori* L. 439
 Le corps adipeux : organe cible probable de l'oestrogène chez *Bombyx mori* L. 447
 S. DAS & A.K. RAY
- Economics of mulberry cultivation and silkworm rearing 451
 Rentabilité de la culture du mûrier et de l'élevage du ver à soie 457
 G. SRINIVASA, P. KUMARESAN & M.N.S. IYENGAR
- Path analysis for leaf yield components in mulberry (*Morus* spp.) grown under high altitude conditions 461
 Analyse de trajets des composants du rendement en feuilles chez le mûrier (*Morus*) cultivé à haute altitude 469
 S. MASILAMANI, V. THIAGARAJAN, B.N. SUSHEELAMMA & R.K. DATTA
- Testing of the hybrid offspring of the mulberry varieties Kinriu and Kokuso under free pollination 473
 Etude sur les descendants hybrides des variétés de mûrier Kinriu et Kokuso en pollinisation libre . . . 483
 Z.M. PETKOV
- Biology of the mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus*, causing tukra in mulberry 487
 Biologie de l'aleurode *Maconellicoccus hirsutus* responsable du tukra chez le mûrier 493
 D. MANJUNATH, RAM KISHORE, K. SATHYA PRASAD, VINOD KUMAR, P. KUMAR & R.K. DATTA
- Studies on enhancing egg production in the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., by glucosides of steroids and polyphenolics 497
 Etude sur l'amélioration de la production d'oeufs chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. par action des stéroïdes et des polyphénols glycosylés 507
 S.K. CHOWDHARY, A.B. CHOUDHARY, R.K. KHAJURIA & S.M. JAIN
- Association of morphological and biochemical characters of *Machilus bombycina* with the feeding behaviour of *Antheraea assama* 511
 Relation entre les caractères morphologiques et biochimiques de *Machilus bombycina* et le comportement alimentaire d'*Antheraea assama* 519
 R.L. HAZARIKA, L.K. HAZARIKA, A. KATAKY, J.C.S. KATAKY, A.K. HAZARIKA & P.C. DEKA

Rapports techniques / Technical reports

Increase of silk production and quantitative changes of carbohydrate and protein in the fat body and haemolymph after feeding potassium sulphate to bivoltine <i>Bombyx mori</i> L.	523
Augmentation de la production de soie et modifications de la quantité d'hydrates de carbone et de protéines dans le corps adipeux et l'hémolymph après alimentation de vers à soie <i>Bombyx mori</i> bivoltins avec du sulfate de potassium	
R.B. NIRWANI & B.B. KALI WAL	531
Effects of harvest time on the nutritional quality of mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaves and cocoon production of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	535
Effets de l'heure de récolte sur la qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier (<i>Morus alba</i> L.) et sur la production de cocons chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	
A.A. SARKER, M.A. RAB, M.R. HAQUE & N. ABSAR	541
Propagation of mulberry through <i>in vitro</i> shoot proliferation: effects of different seasons	545
Propagation du mûrier à partir de la multiplication <i>in vitro</i> des pousses : effets des saisons	
A. ZAMAN, R. ISLAM, A.C. BARMAN & O.I. JOARDER	551

Notes brèves / Brief notes

Pupa-waste, an alternative resource for isolation of lecithin	555
Les déchets de chrysalide : une nouvelle source de lécithine	
S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA, R. KAR & T. PAVAN KUMAR	559
Correlation between female moth weight and fecundity in the oak tasar silkworm, <i>Antheraea proylei</i> J.	561
Corrélation entre le poids du papillon femelle et la fécondité chez le ver à soie tasar du chêne, <i>Antheraea proylei</i> J.	
M.K. GHOSH, C.M. BABU, K.M. PONNUVEL & R.C. SRIVASTAVA	565
Anthraco-nose of mulberry — first report from India	567
Première observation de l'anthraco-nose du mûrier en Inde	
J. LATHA JANARDHAN, T. PHILIP, GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA	573

Bibliographie / Bibliography	575
Sériciculture générale / General sericulture	577
Mûrier / Mulberry	583
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	587
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	591
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	595
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	597
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	601
Glandes séricigènes / Silk glands	605
Soie / Silk	607

Instructions aux auteurs / Information for contributors

REARING OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., ON ARTIFICIAL DIETS: RETROSPECT AND PROSPECTS

S.K. CHOWDHARY

Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu Tawi - 180 001, India.

Keywords: Chawki (early instars) rearing, pulverized mulberry leaf, *Spirulina platensis*, polyphagous strain, artificial diet, silkworm.

INTRODUCTION

The need to develop artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori* L., assumed an importance for a number of factors. First, the silkworm is one of the most characteristic insects for experimental use due to its domestication for centuries. In order to use this insect for experimental purposes, it was very important to develop artificial diets because in most of the temperate areas of the world, mulberry leaves are not available throughout the year; hence, in order to work the year round there was a need to develop artificial diets. Secondly, in Japan the need to develop artificial diets for commercial rearing of silkworms was due to: (i) high labour cost of mulberry garden development, rearing of silkworms on mulberry leaves requires more labour for procuring the leaves for feeding 3-4 times a day and (ii) getting maximum output by improving chawki (early instars) rearing on a nutrient-rich and balanced diet to reduce the mortality rate, etc. Lastly, in India, particularly in the tropical sericulture areas of the southern States where more than 80% of cocoons are produced, the quality of cocoons is not up to the required standard due to the fact that mulberry leaves are mostly thin with a low moisture content and poor nutritional value. Such a type of leaf for chawki rearing is not up to the required need of the silkworm larvae in early stages. Hence, it was felt necessary to develop an artificial diet for chawki rearing, i.e., starter, which should have the required nutrition and moisture contents for proper and healthy growth of silkworms, because production of good quality cocoons depends on good and perfect chawki rearing.

In Japan, in cooperative chawki rearing centres, mainly artificial diets are used for healthy and proper growth of larvae that produce best quality cocoons.

HISTORICAL OVERVIEW

Although the work on artificial diet referred to 1960 (Yoshida *et al.*; Fukuda *et al.* and Ito *et al.*), but the main composition of mulberry leaf required for 1-5th instar silkworms dates back to 1917 (Hiratsuka). The early developed diets were of two types, one with dried mulberry leaves as one of the ingredients and the second without mulberry leaves, considered as meridic diets (Dougherty, 1959). The diet prepared in the early 1960s contained more than 50% dried, pulverized mulberry leaves as one of the main ingredients along with other simple items of food. Larvae reared on these diets had retarded growth, the cocoons produced were of small size and adults produced eggs much less in number than normal (Fukuda *et al.*, 1960).

Simultaneously, attempts were made to improve the diets, taking into consideration the nutritional requirements of silkworms. Ito (1960, 1961a, 1961b), Ito and Arai (1967) and Horie *et al.* (1973) produced a diet for practical rearing but this diet was not perfect and required further improvement. Information based on the works of Ito and Tanaka (1970), Kamioka *et al.* (1971), Horie

Table I. Basic diet for amino acid nutritional studies.

Tableau I. Aliment artificiel de base pour l'étude des besoins nutritionnels en acides aminés.

Substance <i>Substance</i>	Dry diet (%) <i>Aliment sec (%)</i>
Potato starch / <i>Amidon de pomme de terre</i>	7.5
Sucrose / <i>Saccharose</i>	12.5
Amino acid mixture* / <i>Mélange d'acide aminé*</i>	20.0
Soybean oil, refined / <i>Huile de soja raffinée</i>	3.0
b-sitosterol / <i>b-sitostérol</i>	0.5
Wesson's salt mixture / <i>Mélange de sels de Wesson</i>	4.5
Ascorbic acid / <i>Acide ascorbique</i>	2.0
Citric acid / <i>Acide citrique</i>	0.5
Cellulose powder / <i>Cellulose en poudre</i>	34.2
Morin	0.3
Agar	15.2
Total	100.0
Vitamin B mixture** <i>Mélange de vitamines B**</i>	Added <i>Ajouté</i>
Distilled water (dry diet) / <i>Eau distillée (aliment sec)</i>	3 mg/g

Amino acids: Composition by weight added in feed*.

Composition en poids des acides aminés ajoutés à l'aliment.*

Alanine	7.0	Lysine-HCl	8.0
Arginine	6.0	Methionine / <i>Méthionine</i>	2.5
K-aspartate	12.5	Phenylalanine / <i>Phénylalanine</i>	5.5
Cystine	1.0	Proline	4.0
Na glutamate	12.0	Serine / <i>Sérine</i>	5.0
Glycine	5.0	Threonine / <i>Thréonine</i>	5.0
Histidine-HCl	2.5	Tryptophan / <i>Tryptophane</i>	2.0
Isoleucine	5.5	Tyrosine	2.0
Leucine	8.5	Valine	6.0

* All L-amino acids: composition by weight is shown in the list above.

** Amounts added per g of dry diet: 4 µg biotin, 1.5 mg choline, Cl 4 µg folic acid, 2 mg inositol, 0.3 mg niacin, 0.115 mg Ca pantothenate, 30 µg pyridoxine-HCl, 20 µg riboflavin, and 20 µg thiamine.

* Tous acides aminés en L : composition en poids indiquée dans la liste ci-dessus.

** Quantités ajoutées par g d'aliment sec : 4 µg biotine, 1.5 mg choline, Cl 4 µg acide folique, 2 mg inositol, 0.3 mg niacine, 0.115 mg Ca pantothénate, 30 µg pyridoxine-HCl, 20 µg riboflavine, and 20 µg thiamine.

et al. (1971), Nihmura (1972, 1973) and Ito *et al.* (1974) led to the formulation of artificial diets for starters (first instar), growers (second to fourth instar) and producers (fifth instar). These diets contained 10-20% dried mulberry leaf powder, depending upon the age of the larva, i.e. instar.

Further work on temperature and photoperiod requirements of silkworms reared on artificial diets was undertaken by Takamiya (1974a, 1974b); studies on the effect of dietary physiochemical factors on feeding and growth (You-Ming *et al.*, 1978) and deterioration in food value by light (Imanishi and Yoshitake, 1981; Takamiya *et al.*, 1982) were also carried out.

After 1980, work was taken up mainly on cost reduction by substitution of low-cost ingredients such as yellow corn powder, substitute for fats, starch and β -sitosterol (Seol and Lee, 1980), blue-green algae *Spirulina platensis*, as a source of protein (Hou and Chen, 1984), components used for livestock feed (Yanagawa *et al.*, 1989) and use of mulberry branch powder in place of cellulose (Yanagawa *et al.*, 1991).

DEVELOPMENT CHANGES

The studies on development of artificial diets for the silkworm, *Bombyx mori*, started with preparation of ingredients. One of the most important ingredients for silkworm diets is dried mulberry leaf powder (Fukuda *et al.*, 1960). The leaves were dried by a conventional method at relatively low temperature, i.e., 100 °C. But, for better results, fresh disease-free leaves should first be dipped in water to remove dust and dried in the shade at room temperature for 24 hr, followed by 1 hr drying in

Table II. Composition of artificial diets containing mulberry leaf powder.

Tableau II. Composition des aliments artificiels contenant de la poudre de feuilles de mûrier.

Substance	Diet for 1st-4th instars (g)	Diet for 5th instar (g)
<i>Substance</i>	<i>Aliment pour 1er à 4e âges (g)</i>	<i>Aliment pour 5e âge (g)</i>
Mulberry leaf powder / Poudre de feuilles de mûrier	25.0	25.0
Soybean oil / Huile de soja	1.5	3.0
Defatted soybean meal / Farine de soja dégraissée	36.0	45.0
Cholesterol / Cholestérol	0.2	0.2
Citric acid / Acide citrique	4.0	4.0
Ascorbic acid / Acide ascorbique	2.0	2.0
Sorbic acid / Acide sorbique	0.2	0.2
Agar	7.5	5.0
Salt mixture / Mélange de sels	3.0	3.0
Glucose	8.0	10.0
Potato starch / Amidon de pomme de terre	7.5	15.0
Cellulose powder / Poudre de cellulose	20.8	-
Vitamin B mixture / Mélange de vitamine B	A	A
Antiseptic / Antiseptique	A	A
Total	115.7	112.4
Water / Eau (ml)	300	220

A: Added / Ajouté.

an oven at 70 °C because excess drying at higher temperature (615 °C) causes fifth instar larvae of *B. mori* L. to become permanent larvae (Sudo and Tanaka, 1989).

The second important ingredient in artificial diets is protein which is mainly taken from soybean cakes. Soybean seeds, beside containing anti-nutritional factors, are reported to contain some feeding deterrents which adversely affect feed intake by silkworm larvae. It was because of this factor that early prepared feeds when used retarded larval growth and yielded small cocoons (Yoshida *et al.*, 1960; Fukuda *et al.*, 1960 and Ito and Tanaka, 1960). Soybean cakes normally have a deterrent effect on feeding in the silkworm (Ito *et al.*, 1975). Hence, it should be made free from feeding deterrent and anti-nutritional factors. It can be prepared by hexane extraction of soybean powder, followed by extraction with 70% ethanol and finally heat treatment for 30 min.

Table III. Composition of the basic feed.

Tableau III. Composition de l'aliment de base.

Substance Substance	Feed A Aliment A	Feed B Aliment B
Defatted soybean meal / <i>Farine de soja dégraissée</i>	50.0%	45.0%
Corn starch / <i>Amidon de blé</i>	-	40.9
Potato starch / <i>Amidon de pomme de terre</i>	10.0	-
Sucrose / <i>Saccharose</i>	10.0	-
Cellulose powder / <i>Poudre de cellulose</i>	9.6	-
Agar	10.0	5.0
Salt mixture / <i>Mélange de sels</i>	2.0	1.0
Soybean oil / <i>Huile de soja</i>	3.2	2.7
Soybean sterol / <i>Sterol de soja</i>	0.3	0.3
Citric acid / <i>Acide citrique</i>	1.0	1.0
Ascorbic acid / <i>Acide ascorbique</i>	2.0	2.0
Morin	0.3	-
Propionic acid / <i>Acide propionique</i>	1.0	1.5
Sorbic acid / <i>Acide sorbique</i>	-	0.2
Chloramphenicol / <i>Chloramphénicol</i>	-	0.01
Vitamin B mixture / <i>Mélange de vitamine B</i>	A	A
Water (ml per g of dry feed) / <i>Eau (ml/g d'aliment sec)</i>	3	

A: added / *ajouté*.

Ito and Arai (1967) formulated an amino acid diet (Table I). This diet was used for analysis of amino acid requirements of silkworm larvae: the diet could sustain growth of silkworms to some extent, but the larvae did not produce normal cocoons. Subsequently, Ito *et al.* (1974) formulated diets for practical rearing (Table II). The diet given in Tables III and IV (Nihmura, 1972 and Ito *et al.*, 1974) is without mulberry leaf powder and can be used for rearing of fourth and fifth instar larvae only. Nihmura (1972) found that it is highly desirable to include mulberry leaf powder or leaf extract as feeding stimulant for newly hatched larvae of *Bombyx mori*.

Secondly, it was suggested that the dietary level of mulberry leaf powder is to be increased gradually, at least minimum 10% in the feed of first instar larvae and finally even no addition in the fifth instar, as is given in Table V.

Table IV. Composition of semisynthetic diets without mulberry leaf powder.

Tableau IV. Composition des aliments semi-synthétiques sans poudre de feuilles de mûrier.

Substance	Dry diet (g) / Aliment sec (g)		
	Starter (1st instar)	Grower (2nd-4th instar)	Producer (5th instar)
	Début (1er âge)	Stades de croissance (2e à 4e âge)	Stade de production (5e âge)
Potato starch / Amidon de pomme de terre	10.0	10.0	20.0
Sucrose / Saccharose	10.0	10.0	-
Glucose	-	-	12.0
Soybean meal (defatted) / Farine de soja (dégraissée)	30.0	40.0	60.0
Soybean oil (refined) / Huile de soja (raffinée)	3.0	3.0	3.0
β -sitosterol / β -sitostérol	0.5	0.5	0.5
Salt mixture (Wesson's) / Mélange de sels (de Wesson)	3.5	3.5	2.0
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	-
Ascorbic acid / Acide ascorbique	2.0	2.0	2.0
Cellulose powder / Poudre de cellulose	34.0	34.0	-
Agar	15.0	15.0	5.0
Citric acid / Acide citrique	0.5	0.5	0.5
Sorbic acid / Acide sorbique	0.2	0.2	0.2
Morin	0.2	0.1	-
Total	109.9	119.8	105.2
Vitamin B mixture / Mélange de vitamine B	A	A	A
Antiseptic / Antiseptique	A	A	A
Distilled water (ml) / Eau distillée (ml)	300	300	260

A: added / ajouté.

Further work was taken up on the replacement of ingredients by low-cost materials and improvement of physical characters of diets, etc. With regard to replacement of low-cost ingredients, efforts were made to use yellow corn powder substitute for fat, starch and β -sitosterol (Seol and Lee, 1980) (Table VI). This diet reduced the larval period by 4 hr from the first to the third instar. It had the advantage of reducing cost and being easy to prepare. Hou and Chen (1984) replaced soybean meal by *Spirulina platensis* in artificial diets. Tables VII, VIII and IX show that silkworm larvae ingested more food which have low algal diets, whereas they digested more efficiently the diets which have high algal levels. The larvae fed on diets containing 30-40% algae had the shortest larval duration as compared to those on the low algal powder diet. Larvae fed on diets with 40% algal powder and above gave excess of algal proteins in faeces. Chemical analysis showed that more than 30% algal protein in the diet was not digested. Hence, only a small quantity of spiral blue alga as a source of protein in the diet for rearing silkworms in place of soybean meal can be used. Yanagawa *et al.* (1991) worked on the utilization of ingredients of livestock feed for an artificial diet for silkworms. The diet contained 2-10% of fishmeal, yeast, pupal powder, rice bran, gluten meal and alfalfa (Table X). The

Table V. Results of the two-step rearing of larvae of the silkworm.

Tableau V. Résultats de l'élevage en deux parties des larves de ver à soie.

Composition of feed used at 1st step (from 1st to 4th instar) <i>Composition de l'aliment utilisé en 1ère partie (1er à 4e âge)</i>	Feed A + 10% leaf powder <i>Aliment A + 10% feuilles en poudre</i>	Feed A + 10% leaf powder <i>Aliment A + 10% feuilles en poudre</i>
Composition of feed used at 2nd step (5th instar) <i>Composition de l'aliment utilisé en 2e partie (5e âge)</i>	Feed A + 10% leaf powder <i>Aliment A + 10% feuilles en poudre</i>	Feed A <i>Aliment A</i>
Number of newly hatched larvae tested <i>Nombre de larves néonates testées</i>	20	20
Number of surviving individual / <i>Nombre d'individus survivants:</i>		
Mature stage / <i>Stade mature</i>	19	19
Pupal stage / <i>Stade nymphal</i>	17	14
Mean body weight of larvae (g) / <i>Poids moyen des larves (g):</i>		
1st day of 5th instar / <i>1er jour du 5e âge</i>	0.632	0.632
Mature stage / <i>Stade mature</i>	4.22	4.49
Larval period (days) / <i>Durée larvaire (jours)</i>	22-25	22-26
Mean wt. of the cocoon (g) / <i>Poids moyen du cocon (g)</i>	1.79	1.95
Mean wt. of the cocoon layer (g) / <i>Poids moyen de la coque (g)</i>	0.376	0.403
Cocoon shell percentage / <i>Richesse soyeuse (%)</i>	21.0	21.7

Feed A / Feed B: composition given in Table III / *Aliment A, Aliment B: composition donnée dans le tableau III.*

studies were undertaken on pure strains, hybrid races and polyphagous strains of the silkworm, *B. mori*. The results indicated that Japanese strains such as Sawa J and NO1 were able to grow on all the diets, unlike the larvae of Chinese strain (CO1). Our findings are also in accordance with this, we have also found that Japanese original races and hybrids have better acceptability for artificial diets, as is shown in Table XI. Yanagawa *et al.* (1989) also reported that some larvae of hybrid races grew on diets containing rape bran, gluten meal and yeast, whereas almost all the larvae fed on the other diets did not survive. Polyphagous strains showed a high feeding ability and survival rate on these diets. They further added that the feeding ability and survival rate of polyphagous strains increased when 4% mulberry leaf powder was added to the diet. Similar attempts for use of low-cost artificial diets were made by Kato *et al.* (1991) with improved strains of *B. mori*. They found that out of 48 strains, 4 strains, i.e., NO1, NO2, SC 8 and TC 511, showed high feeding activity on a low-cost diet (LP-1). Secondly, they recorded that feeding adaptability was found to increase in the progeny of the strains reared on the LP-1 diet. Further, they found that the four strains selected after feeding of LP-1 for fifth and 10th generation improved the feeding activity. The feeding ability of their hybrids with Japanese and Chinese strains was superior to that of non-selected strains.

Yanagawa *et al.* (1991) conducted experiments to use mulberry branch powder in place of cellulose. They found that larval feeding was remarkably promoted by the increase of contents of

Table VI. Constituents of the diets used for experiments.**Tableau VI. Constituants des aliments expérimentés.**

Substance <i>Substance</i>	Diet No. 2 (control) <i>Aliment n° 2 (témoin)</i> (g)	Diet No. 3 <i>Aliment n° 3</i> (g)
Mulberry leaf powder / <i>Poudre de feuilles de mûrier</i>	20	20
Soybean meal (defatted) / <i>Farine de soja (dégraissée)</i>	40	40
Starch (potato) / <i>Amidon (pomme de terre)</i>	15	-
Corn meal / <i>Farine de blé</i>	-	20
Carragenan / <i>Chondrus</i>	5	5
Pulp flock / <i>Flocons de pulpe</i>	5	-
Cellulose (Cs)	-	5
Sugar / <i>Sucre</i>	5	5
Ascorbic acid / <i>Acide ascorbique</i>	2	2
Citric acid / <i>Acide citrique</i>	4	3
Sorbic acid / <i>Acide sorbique</i>	0.2	0.2
Salt mixture (Wesson's) / <i>Mélange de sels (de Wesson)</i>	2	2
Soybean oil (refined) / <i>Huile de soja (raffinée)</i>	2	-
β -sitosterol / <i>β-sitostérol</i>	0.2	-
Antibiotics / <i>Antibiotiques</i>	A	A
Vitamin B mixture / <i>Mélange de vitamine B</i>	A	A
Distilled water / <i>Eau distillée</i>	270 ml	270 ml

A: added / *ajouté*.

steamed mulberry branch powder. The digestibility of dry matter in both steamed and heated mulberry branch powder ranged from 10-24%. The growth of larvae reared on this diet was slightly inferior to that of the control diet, in particular during the early stage of development but in the last instar (fifth) there was no difference.

Physicochemical factors such as hardness, effect of temperature, photoperiod, light and deterioration play a major role in artificial diet use for the silkworm, *Bombyx mori* L.

HARDNESS

Nihmura (1973) found that the crude tension meter (crude meter) could be employed to determine the hardness of the artificial feed for silkworms, which is an index of the physical conditions of the feed. Secondly, hardness of artificial feed varied according to varying contents of dietary agar, water, glucose, sucrose as well as autoclaving time for preparation of feed. He also found that hardness of feed was closely related to the rates of feeding and growth of silkworm larvae. He recorded that optimal values of hardness of feed were 200 and 4,000 g/cm in the crude meter hardness.

TEMPERATURE, LIGHT AND PHOTOPERIOD

Takamiya (1974a, 1974b) recorded that, in silkworms reared on artificial diet at 22 °C, five molter larvae appeared, mainly in the larvae reared under long day (16 L 8 D: 16 hr light, 8 hr darkness) or continuous light (24 L). On the other hand, in larvae reared on artificial diet at 28 °C, only three molter

Table VII. Effect of various dietary concentrations of *Spirulina platensis* powder on growth and development of fourth instar larvae of *Bombyx mori*.Tableau VII. Effet de différentes concentrations alimentaires de poudre de *Spirulina platensis* sur la croissance et le développement des larves de *Bombyx mori* au quatrième âge.

Algal powder in dry diet (%)	Mean weight gain (mg/larva)		Duration of 4th instar (days)	Cocoon shell wt. (mg)	Cocoon shell ratio (%)
	Fresh weight	Dry weight			
<i>Poudre d'algue dans l'aliment sec (%)</i>	<i>Gain de poids moyen (mg/larve)</i>		<i>Durée du 4e âge (jours)</i>	<i>Poids de la coque (mg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
	<i>Poids frais</i>	<i>Poids sec</i>			
0*	743.5 ± 3.1 ^a	133.8 ± 2.6 ^a	4.9 ± 0.1	0.29 ± 0.02	18.45 ± 0.55
7.5	643.2 ± 55.5 ^b	96.7 ± 11.4 ^b	7.7 ± 0.2	0.09 ± 0.01	9.55 ± 0.06
15	655.0 ± 1.5 ^b	100.1 ± 9.6 ^a	5.4 ± 0.1	0.15 ± 0.01	13.92 ± 0.75
20	702.4 ± 10.0 ^a	100.0 ± 6.7 ^a	5.1 ± 0.1	0.22 ± 0.03	15.93 ± 0.87
30	709.0 ± 18.9 ^a	106.8 ± 13.9 ^a	4.7 ± 0.3	0.26 ± 0.01	17.20 ± 0.58
40	744.3 ± 4.7 ^a	114.7 ± 3.1 ^a	4.7 ± 0.3	0.37 ± 0.01	19.25 ± 0.08

Table VIII. Utilization of various dietary concentrations of *Spirulina platensis* powder by fourth instar larvae of *Bombyx mori*.Tableau VIII. Utilisation de différentes concentrations alimentaires de poudre *Spirulina platensis* par les larves de *Bombyx mori* au quatrième âge.

Algal powder in dry diet (%)	AD (%)	ECI (%)	ECD (%)	Protein content in feed (%)
<i>Poudre d'algue dans l'aliment sec (%)</i>	<i>AD (%)</i>	<i>ECI (%)</i>	<i>ECD (%)</i>	<i>Contenu en protéines de l'aliment (%)</i>
0*	44.4 ± 1.4 ^b	25.3 ± 1.5 ^a	56.9 ± 2.0 ^a	15.0
7.5	37.7 ± 1.0 ^c	15.1 ± 0.2 ^c	40.2 ± 1.5 ^b	8.1
15	37.8 ± 1.1 ^c	19.9 ± 1.5 ^b	52.7 ± 4.6 ^a	11.2
20	38.4 ± 0.4 ^c	20.6 ± 0.8 ^b	53.6 ± 2.5 ^a	13.2
30	43.8 ± 0.8 ^b	22.6 ± 2.8 ^b	51.5 ± 6.2 ^a	18.1
40	46.0 ± 0.6 ^a	25.3 ± 0.4 ^a	54.9 ± 0.2 ^a	24.0

AD: Approximate digestibility / *Digestibilité approximative*. ECI: Efficiency of conversion of ingested food / *Efficacité de conversion de la nourriture ingérée*. ECD: Efficiency of conversion of digested food / *Efficacité de conversion de la nourriture digérée*.

Means followed by the same letter are not significantly different at 5%.

* Soybean meal added as protein source.

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à 5 %.

* Farine de soja ajoutée comme source de protéines.

Table IX. Total dry weight of diet ingested or digested and of faeces excreted by fourth instar larvae of *Bombyx mori* fed on different concentrations of *Spirulina platensis* powder.

Tableau IX. Poids sec total de l'aliment ingéré ou digéré et des fèces excrétées par les larves de *Bombyx mori* au quatrième âge nourries avec différentes concentrations alimentaires de poudre *Spirulina platensis*.

Algal powder in dry diet (%)	Total dry weight* (mg/larva)		
	Diet ingested	Diet digested	Faeces excreted
<i>Poudre d'algue dans l'aliment sec (%)</i>	<i>Poids sec total* (mg/larve)</i>		
	<i>Aliment ingéré</i>	<i>Aliment digéré</i>	<i>Fèces</i>
0**	450.5 ± 15.5 ^b	200.0 ± 2.3 ^{bcd}	250.5 ± 13.2 ^d
7.5	638.2 ± 67.8 ^a	240.4 ± 19.7 ^a	397.8 ± 48.1 ^a
15	503.0 ± 11.1 ^b	190.0 ± 5.8 ^{cd}	313.0 ± 10.3 ^b
20	485.4 ± 17.3 ^b	186.4 ± 6.4 ^d	299.0 ± 11.3 ^{bc}
30	473.7 ± 10.3 ^b	207.4 ± 8.4 ^{bc}	266.3 ± 2.2 ^{cd}
40	454.4 ± 4.7 ^b	209.1 ± 4.9 ^b	245.3 ± 0.2 ^d

* Means followed by the same letter are not significantly different at 5%.

** Soybean meal added as protein source.

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à 5 %.

** Farine de soja ajoutée comme source de protéines.

larvae appeared in larvae reared in continuous light, except for short day (8 L:16 D) and continuous darkness. Secondly, the voltinism of silkworms reared on artificial diet is also affected by the photoperiod during the larval stage. When larvae are reared in long day (16 L:8 D) or continuous light, their moths oviposit mainly non-hibernating eggs, but temperature gives no effect. This type of phenomenon of effect of light or temperature on voltinism and number of molts is not found in normal, mulberry leaf rearing. Similar findings were reported by Takamiya *et al.* (1982) and they are of the opinion that such physiological effects of light conditions can be due to deleterious effects of light on the artificial diet. Imanishi and Yoshitake (1981) also found that light dose effect on deterioration of the artificial diet; according to their findings, diet containing mulberry leaf powder is more effective than the semisynthetic diet; similarly, diet without soybean oil showed no deterioration in light. Accordingly, the deterioration of diet by lighting is due to the change of lipids in the diet containing mulberry leaf powder in the light into deleterious hydroperoxide for silkworm growth.

CONCLUSION

The silkworm, *Bombyx mori* L., is a quite versatile and unique species due to its domestication for a number of centuries. Hence, its adaptability to artificial diet is not difficult. But one has to keep in mind that: firstly, it is highly desirable to include mulberry leaf powder or leaf extract as feeding stimulant for early stages of larval development; secondly, it is also desirable to develop different strains which should feed and grow fast on artificial diet (Tazima, 1989); but, according to Shinbo and

Table X. Composition of the artificial diet, LP-1, used for feeding test of silkworm larvae.*Tableau X. Composition de l'aliment artificiel LP-1 utilisé pour un test de nourrissage des larves de ver à soie.*

Material Substance	Content Teneur	Material Substance	Content Teneur
Rice bran (defatted) / <i>Son de riz (dégraissé)</i>	44.36	Inositol	0.100
Soybean meal (defatted) / <i>Farine de soja (dégraissée)</i>	38.90	Citric acid / <i>Acide citrique</i>	5.030
Fish meal / <i>Farine de poisson</i>	5.00	Sucrose / <i>Saccharose</i>	4.030
Gluten meal / <i>Farine de gluten</i>	5.13	Carrageen / <i>Chondrus</i>	5.000
KR yeast / <i>Levure KR</i>	5.00	Soybean oil (refined)	2.130
Neo VB-C	0.12	<i>Huile de soja (raffinée)</i>	
Neo VB-M	1.13	Sorbic acid / <i>Acide sorbique</i>	0.210
Methionine / <i>Méthionine</i>	0.124	Cellulose powder / <i>Poudre de cellulose</i>	7.050
Lysine	0.229	Propionic acid / <i>Acide propionique</i>	0.700
Ascorbic acid / <i>Acide ascorbique</i>	2.130	Chloramphenicol / <i>Chloramphénicol</i>	0.015
Phytosterol / <i>Phytostérol</i>	0.210		
Total			126.598

Table XI. Effect of artificial diets on the silkworm, *B. mori*.*Tableau XI. Effet de certains aliments artificiels sur le ver à soie, B. mori.*

Race	Survival percentage			Total wt. of surviving larvae (g)		
	Leaf	Diet B	Japanese diet	Leaf	Diet B	Japanese diet
Race	Taux de survie (%)			Poids total des larves survivantes (g)		
	Feuille	Aliment B	Aliment japonais	Feuille	Aliment B	Aliment japonais
NB ₇	100	80	100	1.40	0.45	2.45
NB ₁₈	100	90	79	1.29	0.59	1.71
KA	100	72	74	1.48	0.25	1.43
NB ₄ D ₂	100	84	100	1.49	0.31	2.56
NB ₄ D ₂ × KA	100	100	96	1.81	0.93	3.94
KA × NB ₄ D ₂	100	100	100	1.74	0.74	2.63

Yanagawa (1994), commercial artificial diets for silkworms used in cooperative rearing houses generally contain 20 to 25% mulberry leaf powder, on a dry weight basis, to achieve synchronous growth. About 5% agar is added as a gelling agent in the diets to keep the water content at a constant level of 70-75% since silkworms cannot take water, unlike livestock. Mulberry leaf powder and agar are relatively expensive and account for nearly 60% of the cost of the whole of ingredients in the diets. Thus, the amount of expensive ingredients such as mulberry leaf powder or agar must be reduced or they must be excluded from the diet to lower its cost. It is also necessary to introduce, into silkworm diets, some of the cheap ingredients used in feeds for livestock. On the contrary, mulberry leaf powder in India and other developing countries is not at all expensive and can be easily used as one of the ingredients in artificial diets for silkworms. The use of agar is very important for keeping water constant at a level of 70-75%. The use of agar can be stopped if some suitable cheap gelling material is developed.

In developing countries like India, etc., the use of artificial diets for silkworm rearing is much desired for chawki rearing, i.e., starter only, because of high requirement of rich nutritional, balanced feed to produce healthy chawki larvae, which is the backbone for production of quality cocoons. This is already in practice in Japan where more than one half of sericulture farmers use artificial diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his sincere gratitude to his colleague, Dr Makesh Mohan, with whom he enjoyed collaboration on the works presented in this article. The work was also supported by grants-in-aid from the Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Government of India. I am thankful to them for the same.

REFERENCES

- DOUGHERTY E.C. (1959) Introduction to anemic culture of invertebrate Metazoa: a goal. *Ann. New York Acad. Sci.*, 77, 27-54.
- FUKUDA T., SUDO M., HIGUCHI Y. (1960a) Silkworm rearing on artificial food. *J. Sericult. Sci. Japan*, 29, 1-3.
- FUKUDA T., SUDO M., HIGUCHI Y. (1960b) Silkworm raising on artificial food. *Nature*, 187, 669-670.
- HIRATSUKA E. (1917) *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 2, 353 pp.
- HOU R.F., CHEN R.S. (1984) The consumption and utilization of the spiral blue green alga, *Spirulina platensis*, in artificial diet by the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Exp. Appl.*, 35, 49-53.
- IMANISHI S., YOSHITAKE N. (1981) Deterioration in food value of artificial diet for silkworm, *Bombyx mori*, by lighting. *J. Sericult. Sci. Japan*, 50(2), 88-93.
- ITO T. (1960) Effect of sugars on feeding of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 5, 95-107.
- ITO T. (1961a) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. Nutritive effects of soybean oil for the larvae. *Bull. Seric. Sci. Japan*, 16, 311-348.
- ITO T. (1961b) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. III. Requirements for sterols and their effects on feeding. *Bull. Seric. Sci. Japan*, 17, 91-117.
- ITO T., ARAI N. (1967) Nutritive effects of alanine, cystine, glycine, serine and tyrosine on the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 13, 1813-1824.
- ITO T., HORIE Y., NAKASONE S. (1975) Deterrent effect of soybean meal on feeding of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 21, 995-1006.
- ITO T., HORIE Y., WATANABE K., TAKAMIYA K., FURUYAMA M., MIYABAYASHI M., YAMAMOTO K., NAGASHIMA M. (1974) Rearing of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, entirely on semisynthetic diets. *J. Agric. Soc. Japan*, 48, 403-407.
- ITO T., TANAKA M. (1960) Raising of silkworm cocoon on artificial diet and the segregation of pentamolters. *J. Sericult. Sci. Japan*, 31, 191-196.

- KAMIOKA S., MUKAIYAMA F., TAKEI T., ITO T. (1971) Digestion and utilization of artificial diet by the silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to the efficiency of diets at varying levels of dietary soybean meal. J. Sericult. Sci. Japan, 40, 473-483.
- KATO K., NAGAYASU K., HIRATA Y., SHIBUKAWA A. (1991) Selection of adaptability to low-cost artificial diet with improved strains of the silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Nat. Inst. Sericult. Entomol. Sci., 3, 17-30.
- NIHMURA M. (1972) Rearing of the silkworm, *Bombyx mori*, on artificial feed by adapting the changes in feeding palatability according to larval growth. J. Sericult. Sci. Japan, 41(5), 375-382.
- NIHMURA M. (1973) On the hardness of the artificial diet of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 42(2), 173-177.
- SEOL K.Y., LEE S.P. (1980) Studies on artificial diet component of silkworm. Effect of substitute, yellow corn powder. Research Reports of the Office of Rural Development, 22, 77-88.
- SHINBO H., YANAGAWA H. (1994) Low-cost artificial diets for polyphagous silkworms. JARQ, 28(4), 262-267.
- SUDO M., TANAKA S. (1989) A factor in heat-treated mulberry leaves that inhibits metamorphosis in *Bombyx mori*. Effect on development of last instar larvae and pupae. Appl. Ent. Zool., 24, 441-449.
- TAKAMIYA K. (1974a) Studies on temperature and photoperiodic conditions on the larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* L., fed on artificial diet. II. Effects of temperature and photoperiod throughout the larval stages on molting and voltinism. J. Sericult. Sci. Japan, 43(1), 35-40.
- TAKAMIYA K. (1974b) On the temperature and photoperiodic conditions on the larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* L., fed on artificial diet. III. Effects of photoperiods on voltinism of silkworm fed on artificial diet. J. Sericult. Sci. Japan, 43(3), 211-216.
- TAKAMIYA K., KINOSHITA D., KATO M. (1982) Effects of light condition on the growth and development of the silkworm, *Bombyx mori* L., fed on artificial diet. J. Sericult. Sci. Japan, 51(1), 14-19.
- TAZIMA Y. (1989) Alteration of food habit of the domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 29(4), 437-453.
- YANAGAWA H., WATANABE K., NAKAMURA M. (1989) Application of feed ingredients for livestock diet by using polyphagous strains of the silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 58(5), 401-406.
- YANAGAWA H., WATANABE K., HAKAMURA M., HORIE Y. (1991) Evaluation of mulberry branch powder as feed ingredient for development of an artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Nat. Inst. Sericult. Ent. Sci., 2, 113-130.
- YOSHIDA T., MATSUOKA M., KIMURA K. (1960) On raising silkworm larvae with an artificial diet containing mulberry leaf powder as its basic material. Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan, 15, 543-580.

ELEVAGE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. SUR ALIMENTS ARTIFICIELS : RETROSPECTIVE ET PROSPECTIVE

S.K. CHOWDHARY

Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu Tawi - 180 001, Inde.

INTRODUCTION

La mise au point d'un aliment artificiel destiné au ver à soie *Bombyx mori* est devenue nécessaire en raison d'un certain nombre de facteurs. En premier lieu, le ver à soie est l'un des insectes les plus caractéristiques comme modèle expérimental du fait de sa domestication depuis plusieurs siècles. Pour utiliser cet insecte à des fins expérimentales, il est devenu indispensable de mettre au point des aliments artificiels qui permettent de disposer de vers à soie toute l'année car, dans la plupart des régions tempérées du globe, les feuilles de mûrier ne sont disponibles qu'à certaines périodes. En deuxième lieu, au Japon, la nécessité de mettre au point des aliments artificiels pour l'élevage des vers à soie à l'échelle commerciale découle de deux facteurs : 1) coût élevé de la main-d'oeuvre dans l'établissement des plantations de mûrier : en effet, l'élevage du ver à soie sur feuilles de mûrier nécessite davantage de main-d'oeuvre pour récolter les feuilles données en nourriture trois à quatre fois par jour ; 2) l'obtention d'une production maximale par l'amélioration des élevages des premiers âges sur un aliment riche en éléments nutritifs et équilibré pour réduire le taux de mortalité, etc. Enfin, en Inde, particulièrement dans les zones sericicoles tropicales des Etats du sud, qui assurent plus de 80 % de la production de cocons, la qualité des cocons est médiocre car les feuilles de mûrier sont souvent ténues et ont un contenu en eau et une valeur nutritionnelle faibles. Ces feuilles ne répondent pas aux besoins des larves de vers à soie aux premiers âges. Il est donc devenu nécessaire d'élaborer un aliment artificiel destiné à l'élevage des premiers âges présentant les qualités nutritives et les teneurs en eau nécessaires pour une croissance vigoureuse et saine des jeunes vers à soie, condition indispensable pour la production de cocons de qualité.

Au Japon, on utilise surtout des aliments artificiels dans les coopératives d'élevage des jeunes larves afin d'obtenir des larves vigoureuses et saines et assurer une production de cocons de qualité optimale.

HISTORIQUE

Bien que les travaux sur les aliments artificiels remontent à 1960 (Yoshida et coll. ; Fukuda et coll. ; Ito et coll.), les besoins des larves du premier au cinquième âge en feuilles de mûrier ont été déterminés dès 1917 (Hiratsuka). Les premiers aliments artificiels se divisaient en deux types, l'un contenant parmi ses ingrédients des feuilles de mûrier séchées et le deuxième n'en contenant pas (Dougherty, 1959). L'aliment formulé au début des années soixante contenait plus de 60 % de feuilles de mûrier séchées et pulvérisées comme ingrédient principal ainsi que d'autres éléments simples de nourriture. Les larves nourries avec des aliments présentaient un retard de croissance, les cocons produits étaient de petite taille et les adultes produisaient des oeufs en quantités nettement inférieures à la normale (Fukuda et coll., 1960).

Parallèlement, des tentatives ont été faites pour améliorer les aliments en prenant en compte les besoins nutritionnels des vers à soie. Ito (1960, 1961a, 1961b), Ito et Arai (1967) et Horie et coll. (1973) ont formulé des aliments destinés à l'élevage commercial mais ces aliments n'étaient pas

parfaits et nécessitaient des améliorations. Les travaux d'Ito et Tanaka (1970), Kamioka et coll. (1971), Horie et coll. (1971), Nihmura (1972, 1973) et Ito et coll. (1974) ont permis d'aboutir à la formulation d'aliments artificiels destinés au premier âge, aux larves en phase de croissance (deuxième à quatrième âge) et aux larves productrices (cinquième âge). Ces aliments contenaient 10 à 20 % de poudre de feuilles de mûrier séchées, en fonction de l'âge larvaire.

Des travaux relatifs aux besoins en température et en photopériode des larves élevées sur milieu artificiel ont été entrepris par Takamiya (1974a, 1974b) ; des études sur l'effet des facteurs physico-chimiques sur l'alimentation et la croissance (You-Ming et coll., 1978) et sur la détérioration de la valeur nutritive à la lumière (Imanishi et Yoshitake, 1981 ; Takamiya et coll., 1982) ont également été réalisées.

Après 1980, les études réalisées portaient principalement sur la réduction des coûts par le remplacement par des ingrédients moins chers comme la farine de blé jaune, les substituts de matières grasses, l'amidon et le β -sitostérol (Seol et Lee, 1980), l'algue bleue *Spirulina platensis* comme source de protéines (Hou et Chen, 1984), les composants utilisés pour l'alimentation du bétail (Yanagawa et coll., 1989) et l'utilisation de poudre de branches de mûrier au lieu de cellulose (Yanagawa et coll., 1991).

MODIFICATIONS DES FORMULATIONS

Les études sur la formulation d'aliments artificiels destinés au ver à soie *Bombyx mori* ont commencé avec la préparation des ingrédients. L'un des ingrédients les plus importants dans l'aliment artificiel est la poudre de feuilles de mûrier séchées (Fukuda et coll., 1960). Les feuilles sont séchées selon une méthode conventionnelle à température relativement basse de 100 °C. Cependant, pour un meilleur résultat, les feuilles, fraîches et exemptes de maladies, doivent d'abord être trempées dans l'eau pour ôter la poussière et séchées à l'ombre à température ambiante pendant 24 heures, puis au four à 70 °C pendant 1 heure car le séchage à haute température (615 °C) entraîne un arrêt de croissance chez les larves de *B. mori* L. au cinquième âge, qui deviennent des larves permanentes (Sudo et Tanaka, 1989).

Les protéines sont le deuxième ingrédient important dans les aliments artificiels et sont principalement dérivées de la farine de soja. Outre des facteurs anti-nutritionnels, les graines de soja contiennent des éléments anti-appétants qui ont un effet négatif sur la prise de nourriture par les larves de vers à soie. C'est principalement en raison de ce facteur que les premiers aliments artificiels entraînaient un retard de la croissance des larves et l'obtention de cocons de petite taille (Yoshida et coll., 1960 ; Fukuda et coll., 1960 ; Ito et Tanaka, 1960). La farine de soja ayant un effet anti-appétant sur le ver à soie (Ito et Nakasone, 1975), elle doit être débarrassée de ses facteurs anti-nutritifs et anti-appétants. Ceci se fait par extraction à l'hexane de la poudre de soja puis par extraction à l'éthanol à 70 % et traitement thermique pendant 30 minutes.

Ito et Arai (1967) ont formulé un aliment à base d'acides aminés (Tableau I). Cet aliment a été utilisé pour l'analyse des besoins en acides aminés des larves de vers à soie ; il permettait d'améliorer, dans une certaine mesure, la croissance des larves mais pas la production de cocons. Par la suite, Ito et coll. (1974) ont formulé des aliments destinés à l'élevage à l'échelle commerciale (Tableau II). Les aliments présentés dans les tableaux III et IV (Nihmura, 1972 ; Ito et coll., 1974) ne contiennent pas de poudre de feuilles de mûrier et ne peuvent être utilisés que pour l'élevage des larves du quatrième et du cinquième âge. Nihmura (1972) a observé que la poudre de feuille de mûrier et l'extrait de mûrier ont un effet stimulant sur la prise de nourriture des larves néonates de *Bombyx mori*.

De plus, on a suggéré que le pourcentage de poudre de feuilles de mûrier doit être augmenté progressivement, avec un minimum de 10 % dans l'aliment pour larves du premier âge et aucune addition dans l'aliment destiné au cinquième âge, comme le montre le tableau V.

Des travaux ont été réalisés sur le remplacement par des ingrédients à faible coût et l'amélioration des caractères physiques des aliments, etc. Pour ce qui concerne le remplacement par des ingrédients à faible coût, on a utilisé la farine de blé jaune comme substitut des matières grasses, de l'amidon et du β -sitostérol (Seol et Lee, 1980) (Tableau VI). Cet aliment entraîne une réduction de 4 heures de la durée larvaire entre le premier et le troisième âge. Il a l'avantage de diminuer les coûts et d'être facile à préparer. Hou et Chen (1984) ont remplacé la farine de soja par *Spirulina platensis* dans les

aliments artificiels. Les tableaux VII, VIII et IX montrent que les larves de ver à soie ingèrent davantage les aliments contenant peu d'algues mais digèrent mieux les aliments à teneur élevée en algues. Les larves nourries avec des aliments contenant 30 à 40 % d'algues ont une durée larvaire plus courte que les larves nourries avec des aliments contenant peu de poudre d'algues. Les larves nourries avec des aliments contenant 40 % de poudre d'algues ou plus produisent un excédent de protéines d'algues dans leurs matières fécales. L'analyse chimique montre que plus de 30 % des protéines d'algues dans l'aliment ne sont pas digérées. Aussi, on ne peut incorporer dans l'aliment qu'une petite quantité d'algue bleue comme source de protéine pour remplacer la farine de soja. Yanagawa et coll. (1991) ont testé des ingrédients utilisés pour l'alimentation pour bétail dans un aliment artificiel pour vers à soie. Cet aliment contient 2 à 10 % de farine de poisson, de levure, de poudre de chrysalides, de son de riz, de farine de gluten et de luzerne (Tableau X). Des études ont été réalisées sur des races pures, des hybrides et des souches polyphages du ver à soie *B. mori* ; les résultats obtenus montrent que les souches japonaises telles que Sawa J et NO1 sont capables de se développer sur tous les aliments, contrairement à la race chinoise (CO1). Nos résultats sont en conformité avec ces observations : nous avons également observé que les races d'origine japonaise et les hybrides acceptent mieux les aliments artificiels, comme le montre le tableau XI. Yanagawa et coll. (1989) ont également observé que certaines larves de races hybrides se nourrissaient d'aliments contenant du son de colza, de la farine de gluten et de la levure tandis que la plupart des larves nourries avec d'autres aliments n'ont pas survécu. Les souches polyphages nourries avec ces aliments présentent une capacité de nourrissage et un taux de survie élevés. Yanagawa et coll. (1989) ont également remarqué que la capacité de nourrissage et le taux de survie des souches polyphages augmentent si l'on ajoute 4 % de poudre de feuilles de mûrier à l'aliment artificiel. Kato et coll. (1991) ont également réalisé des expériences similaires visant à utiliser des aliments artificiels à faible coût avec des souches améliorées de *B. mori* : ils ont observé que, sur 48 souches, 4 souches, à savoir NO1, NO2, SC 8 et TC 511, présentent une activité d'alimentation élevée avec l'aliment artificiel LP-1. En outre, ils ont observé que l'adaptation alimentaire augmente chez les descendants des souches élevées sur l'aliment LP-1 et que l'activité alimentaire s'améliore chez les quatre souches sélectionnées après nourrissage sur LP-1 à la cinquième et à la dixième génération. La capacité de nourrissage de leurs descendants croisés avec des souches chinoises et japonaises est supérieure à celle des souches non sélectionnées.

Yanagawa et coll. (1991) ont réalisé des expériences sur l'utilisation de poudre de branches de mûrier comme substitut de cellulose : ils ont observé que l'alimentation des larves est nettement favorisée par l'augmentation des teneurs en poudre de branches de mûrier étuvées. La digestibilité de la matière sèche de la poudre de branches de mûrier (étuvées ou cuites) varie de 10 à 24 %. La croissance des larves élevées sur cet aliment est légèrement inférieure à celle des larves élevées sur aliment témoin, en particulier au premier stade du développement, mais il n'y a pas de différence au cinquième âge.

Les facteurs physico-chimiques comme la dureté, l'effet de la température, de la photopériode, de la luminosité et de la détérioration jouent un rôle majeur dans l'aliment artificiel utilisé chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

DURETE

Nihmura (1973) a observé qu'il était possible d'utiliser la tension brute au mètre (mètre brut) pour déterminer la dureté de l'aliment artificiel destiné aux vers à soie ; la dureté est un indice des propriétés physiques de l'aliment. De plus, la dureté de l'aliment artificiel varie en fonction des teneurs en agar alimentaire, en eau, en glucose, en saccharose et également en fonction du temps de cuisson à l'autoclave pour la préparation de la nourriture. Il a également remarqué que la dureté de la nourriture est fortement liée au taux de nourrissage et de croissance des larves de vers à soie. Il a observé que les valeurs optimales pour la dureté de la nourriture sont de 200 et de 4.000 g/cm.

TEMPERATURE, LUMINOSITE ET PHOTOPERIODE

Takamiya (1974a, 1974b) a observé l'apparition d'une cinquième mue chez les vers à soie élevés sur aliment artificiel à 22 °C, principalement chez les larves élevées en conditions de journée longue

(16 L 8 D : 16 h de lumière, 8 h d'obscurité) ou en lumière continue (24 L). Par ailleurs, chez les larves élevées sur aliment artificiel à 28 °C, on observe l'apparition de larves trimuantes chez les lots élevés en lumière continue mais pas chez les lots élevés en conditions de journée courte (8 L:16 D) et dans l'obscurité continue. Le voltinisme des vers à soie élevés sur aliment artificiel est également affecté par la photopériode au cours du stade larvaire. Lorsque les larves sont élevées en conditions de journée longue (16 L:8 D) ou en lumière continue, les papillons pondent surtout des oeufs non hibernants, cependant la température n'a pas d'effet. On n'observe pas ce type de phénomène de l'effet de la lumière ou de la température sur le voltinisme et le nombre de mue chez les larves élevées normalement avec des feuilles de mûrier. Des résultats similaires ont été observés par Takamiya et coll. (1982) : ils pensent que les effets physiologiques des conditions de luminosité peuvent être dus aux effets nocifs de la lumière sur l'aliment artificiel. Imanishi et Yoshitake (1982) ont également observé que la dose de lumière a un effet sur la détérioration de l'aliment artificiel ; d'après leurs résultats, l'aliment contenant de la poudre de feuilles de mûrier est plus efficace que l'aliment semi-synthétique ; de même, l'aliment ne contenant pas d'huile de soja ne se détériore pas à la lumière. En conséquence, la détérioration de l'aliment sous l'effet de la lumière est due à une transformation des lipides de l'aliment contenant de la poudre de feuilles de mûrier en hydroperoxyde nocif pour la croissance des vers à soie.

CONCLUSION

Le ver à soie *Bombyx mori* L. est une espèce versatile et unique du fait de sa domestication depuis les temps les plus reculés. Il n'est donc pas difficile de l'adapter à l'aliment artificiel. Néanmoins, il faut tenir compte de plusieurs facteurs : premièrement, il est fortement conseillé d'incorporer de la poudre de feuilles de mûrier ou de l'extrait de feuille comme stimulant alimentaire pour les premiers stades du développement larvaire ; deuxièmement, il est également conseillé d'isoler différentes souches capables de s'alimenter et de se développer rapidement sur aliment artificiel (Tazima, 1989) ; néanmoins, d'après Shinbo et Yanagawa (1994), les aliments artificiels utilisés à l'échelle commerciale dans les coopératives d'élevages contiennent en général 20 à 25 % de poudre de feuilles de mûrier. On ajoute environ 5 % d'agar comme agent gélifiant dans l'aliment afin de maintenir la teneur en eau à un niveau constant de 70 à 75 % car les vers à soie ne peuvent pas consommer d'eau, à la différence du bétail. La poudre de feuilles de mûrier et l'agar sont relativement chers et correspondent à presque 60 % du coût total des ingrédients entrant dans la composition de l'aliment. C'est pourquoi la quantité d'ingrédients onéreux comme la poudre de feuilles de mûrier et l'agar doit être réduite, voire éliminée des aliments à faible coût. Il est également nécessaire d'introduire dans les aliments artificiels certains ingrédients bon marché utilisés dans l'alimentation pour bétail. En revanche, en Inde et dans d'autres pays en voie de développement, la poudre de feuilles de mûrier est à un prix tout à fait abordable et peut être utilisée comme ingrédient dans la composition des aliments artificiels destinés aux vers à soie. L'utilisation de l'agar est très importante car elle permet de maintenir la teneur en eau à un niveau constant de 70 à 75 %.

Dans les pays en voie de développement comme l'Inde, l'utilisation des aliments artificiels est tout à fait souhaitable pour l'élevage chawki, c'est-à-dire les jeunes larves, en raison de leurs besoins élevés en aliments riches, nutritifs et équilibrés, les larves à ce stade étant la clé de voûte de la production de cocons de qualité. Ce type de nourrissage est déjà appliqué au Japon où plus de la moitié des sericulteurs utilisent l'alimentation artificielle.

CROSSOVER FREQUENCIES IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., ARE UNDER THE INFLUENCE OF STRESSES EXPERIENCED IN EARLY ONTOGENESIS

S.S. PALII^{1*} & V.V. KLIMENKO²

1. Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Republic of Moldova, Academiei Str. 1, Kishinev MD-2028, Moldova.
2. Institute of Animal Science, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, P.O. Kulinichi, Kharkov 312120, Ukraine.

The effects of some environmental stress (heat shock, hypoxia, starvation) upon recombination frequency between re and pe markers on the fifth chromosome and the influence of heat shock on rf values between Ze and lem loci on the third chromosome have been studied. It is concluded that changes in rf between the genes can be provoked in the silkworm by high temperature and hypoxia both at the stage of mature unfertilized eggs and in embryogenesis. In the first case the rf may decrease, in the second case it may increase. The results obtained demonstrate that some stage-specific responses of the developing organism to non-optimal external impacts will not disappear completely by the time meiotic prophase processes begin to take effect and can influence crossover frequencies. The phenomenon, known in several species, can now be studied in the silkworm, using high temperature, hypoxia, etc., as well as convenient genetic lines and parthenoclones.

Keywords: Recombination frequency, heat shock, hypoxia, *Bombyx mori*, early ontogenesis, stress, meiosis.

INTRODUCTION

It is quite understandable that almost all physicochemical agents can act on complicated mechanisms of meiotic process if applied during its progression in the organism, the effects being registered by crossover frequency changes. But if a stress takes place long before the beginning of meiosis and provides for similar results, as we have found in our experimentation, interpreting seems more difficult.

Some kinds of stress are known to be effective in changing genetic recombination even if applied long before the beginning of meiosis. In the locust, *Schistocerca gregaria*, the effects of X-ray treatment during premeiotic interphase have been shown in the decrease of chiasma number (Westerman, 1967). Similarly, deviations from normal temperature occurring several cycles before the meiosis can change meiotic crossover frequencies in *Sordaria* (Lamb, 1969). Thermally induced changes in recombination frequencies were also obtained by acting in a premeiotic stage in *Sphaerocarpus* (Abel, 1965). Later, Landner (1970), using *Neurospora* as a laboratory tool, reported the dependence of recombination frequencies upon temperature, giving evidence for a premeiotic sensitive stage.

Drosophila melanogaster seems most studied in this respect. If *Drosophila* larvae suffer from starvation the recombination frequency (third chromosome) is shown to be increased in the imago females (Neel, 1941). An increase in recombination frequency (rf) values in the second linkage group

* Author to whom correspondence should be addressed.

of this insect can be provoked by X-ray treatment; the effectiveness being also shown for some premeiotic and meiotic sensitive stages (Nothel, 1974).

Further confirmations of the phenomenon in question have been recently obtained in *Drosophila*, using shock and non shock high and low temperatures in first instar larvae or even when applied to imago maternal forms (Zhuchenko *et al.*, 1983; Grushko *et al.*, 1991).

The silkworm was used in the present work as another laboratory tool for research on this problem. First and foremost, we examined the existence of the phenomenon itself in this species, in which some other aspects of the recombination system are known. A good deal of data obtained using linkage analysis allow definite conclusions about the regional differentiation of the silkworm chromosomes and their highly integrated genetic organization (Tazima, 1964). Further, in their work investigating the effect of modifiers on recombination frequency between different pairs of loci, located on the second, third and fifth chromosomes, Japanese researchers showed the chromosome specificity of the modification effect and proposed a genetic system model controlling recombination in the silkworm, consisting of general and local recombination modifiers (Ebinuma and Yoshitake, 1981; Ebinuma, 1987).

For a further characterization of the silkworm recombination system, it is of interest to know whether environmental stresses can induce changes in recombination frequencies and which stages are sensitive to different kinds of stress. Of particular interest are the mechanisms by which the recombination frequency can be changed owing to stresses undergone long before the meiotic prophase. They are unknown in the silkworm or in other organisms. Research in this direction would be more penetrating if the phenomenon was investigated in good model systems (Tazima, 1978). One of these seems to be the silkworm (Klimenko, 1990).

MATERIALS AND METHODS

The experimental material comprised two strains, B₁ and B₂, that can be considered as equivalents of J-112 and C-108, respectively, used as control strains in many countries. As it follows from the paper, B₁ and B₂ are different as to their rf-systems. The strains were crossed with marker lines *re pe* or *Ze lem* to obtain F₁ hybrid males for different treatments and then to calculate the crossover frequencies between *re* and *pe* in F₂ or between *Ze* and *lem* in crossings involving F₁ males with the parthenoclone P (+ *lem*). Females were shown to have no crossing-over in the silkworm (Sturtevant, 1915).

The experiments below are grouped around the agents used to act on the organism at a given stage of development.

Thermal shock to females before and after mating:

The scheme of heat treatments is presented in Fig. 1. In variant A, B₁ and B₂ females were cooled by keeping them at 16 °C for 24 h or thermally stressed several hours after eclosion. Mating was conducted immediately after heating or 24 hours later; the heated females were kept at 16 °C in the latter case. In variants B and C (Fig. 1), B₁ females were stressed at 45 °C during 30 min. before and after mating or only after mating.

Thermal shock the day before hatching:

Heat treatments at 40 °C for 12 h were carried out at high humidity obtained through free evaporation of water from Petri dishes put into the heating chamber.

Hypoxia at different stages of embryonic development:

Hypoxia was achieved by keeping developing eggs for 30 min. under water at 25 °C. Parthenoclone PK1 was used for a clearer demonstration of hypoxia effects. A parthenoclone is progeny of a female reproduced by thermal ameiotic parthenogenesis according to Astaurov (1940). All individuals of a clone have the same genotype.

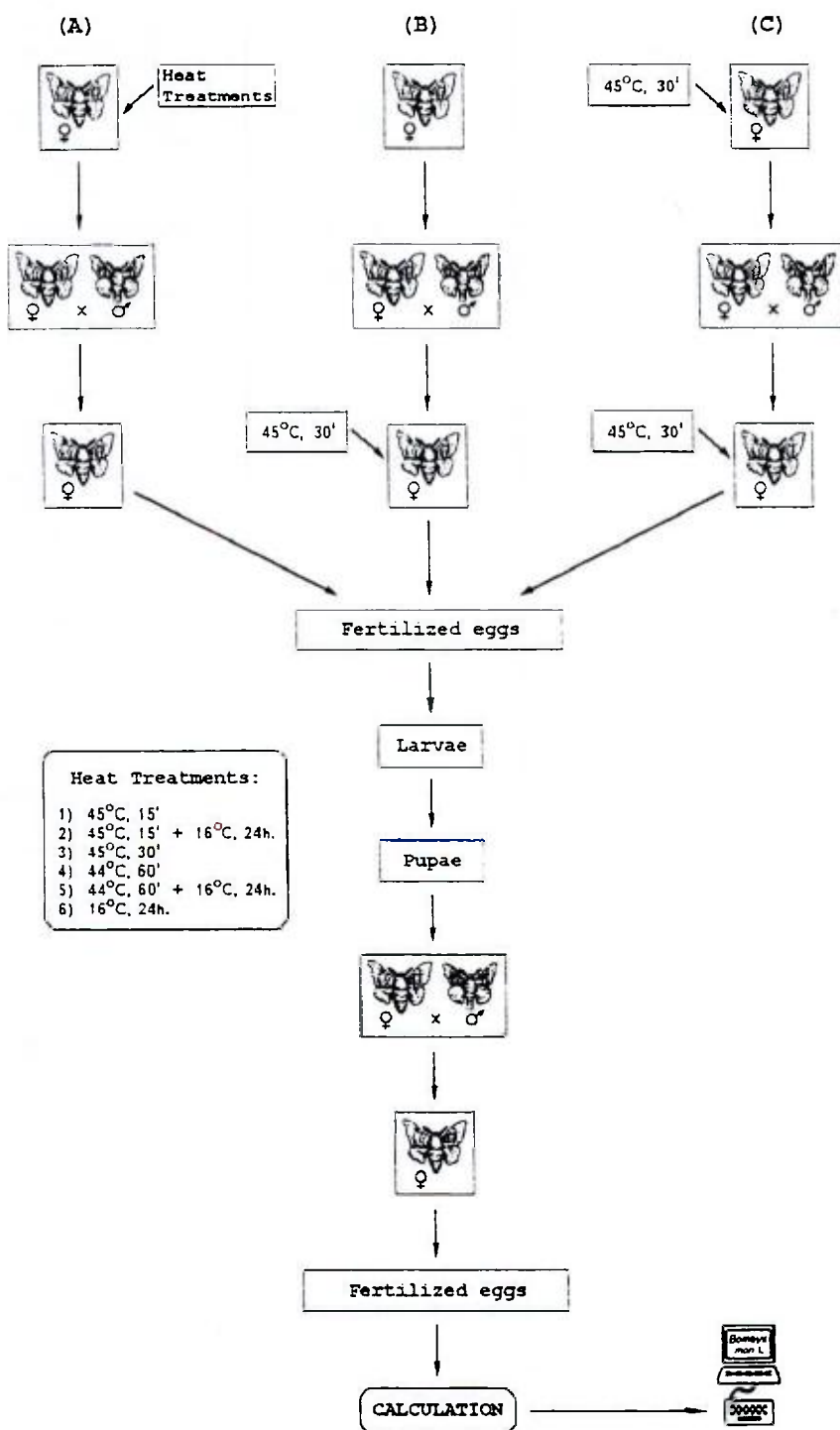


Fig. 1: Scheme of heat shock experiments.
Fig. 1 : Plan des traitements par choc thermique.

Starvation for one day after hatching:

In this case, larvae were kept without feeding during 24 h after hatching at 25 °C and high humidity.

In all the figures, N stands for the number of egg layings and n stands for the number of eggs. Thus, our estimates can be verified and the pattern of distribution may show, in some way, the genetic structure of the rf systems studied.

Although recombination frequency values and their sampling errors presented in the figures were estimated by counting crossover and non-crossover progeny (alternative characters) according to the formula:

$$\overline{rf} \pm \sqrt{\frac{\overline{rf} \% (100 - \overline{rf} \%)}{n}}$$

the distributions of egg layings as to rf are also given in all cases to show that statistical estimates were sometimes made at likely non-normal distributions of rfs in the samples under comparison. As can be seen from the research cited above on the recombination system in the silkworm, we are not to expect normal distributions in all cases. As a matter of fact, without a special selection, the system generates rather non-normal (bimodal, for example) distributions, the real situation being clearly demonstrated by using a 'mixture' of the two rf systems (B₁ and B₂) with markers *lem* and *Ze* when the pattern of distribution changes after stressing from bimodal to about normal. In any case, the situation does not exclude statistical comparisons by different criteria (t, F and χ^2 criteria were used). In fact, any difference above 1% of rf has occurred significant, the differences being given in the legends (Bernstein, 1965).

RESULTS**Thermal shock to females before and after mating:**

The results obtained for B₁ × *re pe* (Fig. 2) and B₂ × *re pe* (Fig. 3) are in good accordance. The value of recombination frequency in B₂ × *re pe* fell to 4% after heat shock, this effect on the mature oocytes inside the females being reversible at 16 °C and rf returning to the control level or somewhat higher with some excess.

Fig. 2: Dependence of recombination frequency upon thermal shock of unmated adult females.

Material: B₂ × *re pe*.

Period of treatment at 45 °C and 16 °C is given in parentheses; time of mating in relation to heat treatment is marked by x. N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

* The difference is significant at the 99% confidence level according to t and χ^2 criteria.

Fig. 2 : Effet du choc thermique chez les femelles adultes non accouplées sur la fréquence de recombinaison.

Matériel : B₂ × *re pe*.

La durée des traitements à 45 °C et à 16 °C est indiquée entre parenthèses; le moment de l'accouplement par rapport au traitement thermique est indiquée par un x. N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 99 % d'après les tests t et χ^2 .

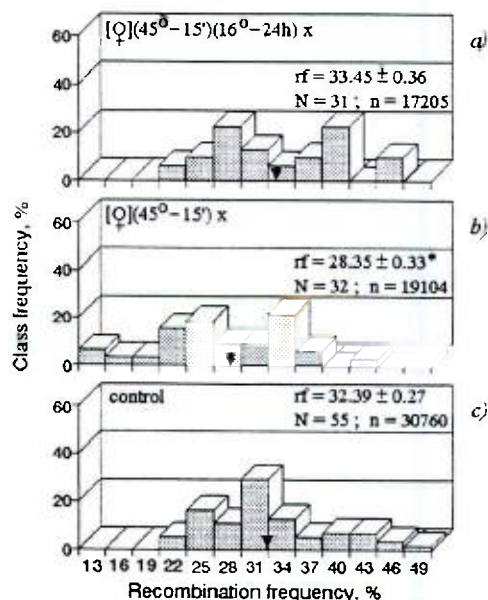


Fig. 3: Dependence of recombination frequency upon thermal shock of unmated adult males.

Material: $B_1 \times re\ pe$.

Period of treatment at 45 °C and 16 °C is given in parentheses; time of mating in relation to heat treatment is marked by x. N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

* The difference is significant at the 99% confidence level according to t and χ^2 criteria.

** The difference is significant at the 99% confidence level according to t, F and χ^2 criteria

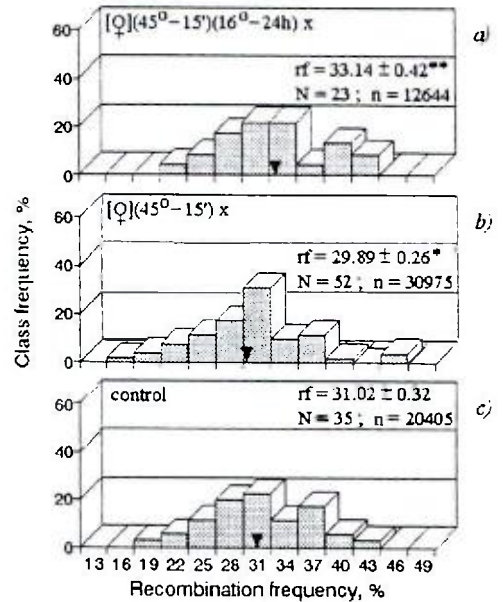
Fig. 3 : Effet du choc thermique chez les mâles adultes non accouplés sur la fréquence de recombinaison.

Matériel : $B_1 \times re\ pe$.

La durée des traitements à 45 °C et à 16 °C est indiquée entre parenthèses; le moment de l'accouplement par rapport au traitement thermique est indiquée par un x. N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 99 % d'après les tests t et χ^2 .

** La différence est significative au seuil de 99 % d'après les tests t, F et χ^2 .



In additional experiments on B_2 females, a somewhat increased rf in $B_2 \times re\ pe$ hybrid was shown after heating at 44 °C for 60 min. followed by cooling the females at 16 °C for 24 hours (Fig. 4). Without the heat shock, the cooling may be slightly more effective; moreover, the heat shock alone, again, resulted in a decreased rf (Fig. 4). The same was observed in hybrid $B_1 \times re\ pe$, an interesting

Fig. 4: Dependence of recombination frequency upon thermal shock to the female before mating.

B_2 females were treated before mating with $re\ pe$ males.

The temperature and time of treatment are given in parentheses; time of mating in relation to heat treatment is marked by x. N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

* The difference is significant at the 99% confidence level according to t and χ^2 criteria.

** The difference is significant at the 95% confidence level according to t and χ^2 criteria.

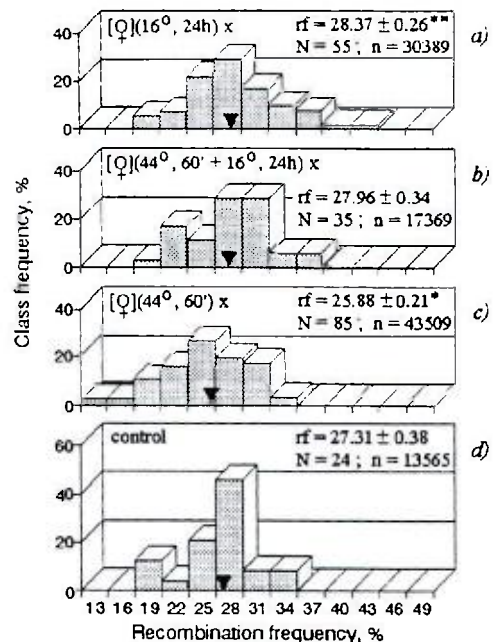
Fig. 4 : Effet du choc thermique chez les femelles avant l'accouplement sur la fréquence de recombinaison.

Les femelles B_2 sont traitées avant l'accouplement avec les mâles $re\ pe$.

La température et le moment du traitement sont indiqués entre parenthèses; le moment de l'accouplement par rapport au traitement thermique est indiquée par un x. N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 99 % d'après les tests t et χ^2 .

** La différence est significative au seuil de 95 % d'après les tests t et χ^2 .



detail being the absence of the effect if the heating step was applied after mating (Fig. 5b) and no additional effect was observed if the heating was repeated after mating (see Fig. 5a).

Fig. 5: Dependence of recombination frequency upon thermal shock of parents.

B₁ females were treated before and after mating with *re pe* males.

The temperature and time of treatment are given in parentheses; time of mating in relation to heat treatment is marked by x. N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

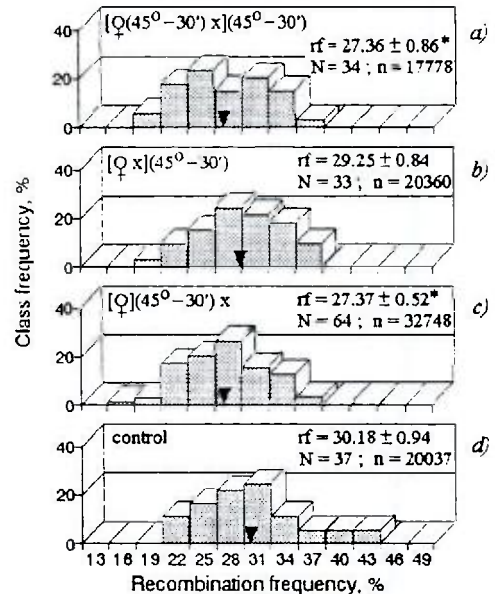
* The difference is significant at the 99% confidence level according to t and χ^2 criteria.

Fig. 5 : Effet du traitement thermique des parents sur la fréquence de recombinaison.

Les femelles B₂ sont traitées avant et après l'accouplement avec les mâles *re pe*.

La température et le moment du traitement sont indiqués entre parenthèses; le moment de l'accouplement par rapport au traitement thermique est indiquée par un x. N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 99 % d'après les tests t et χ^2 .



Thermal shock the day before hatching:

As we can see (Fig. 6), there was no difference in the mean rfs between the two variants. However, taking into consideration the shapes of distributions, obtained data can be interpreted. The control series clearly showed that sons of B₁ and B₂ males were different as to the mean rf between *lem* and *Ze*. As a result, the distribution (Fig. 6b) had two peaks. We can further assume that after the heating of animals that would have given rise to the two different means (for B₁ and B₂), the mean values shifted to some extent to their common mean rf, which resulted in a new distribution with more filled middle classes (Fig. 6a).

Hypoxia at different stages of embryonic development:

Heat shock at different embryonic stages have been proved to be effective in changing crossover frequency between different loci of the genome (Korochkina *et al.*, 1989). But if heating is achieved by keeping developing eggs in hot water, the effect of hypoxia, known as a strongly stressing factor in other animals (Furdui, 1986), must be taken into account separately, with stocks of the silkworm being sensitive to hypoxia in different degrees. As an example of a sensitive stock, parthenoclone PK1 is presented here (Fig. 7) to show the most hypoxia-reactive stages of development as far as embryonic viability is concerned (incubation at 25 °C). Even though the other stocks investigated here were shown to have a higher embryonic resistance after hypoxic treatment, our results lead us to the conclusion that effects of supported stress attest a larger extent than it could be assumed analyzing their embryonic viability. Thus, it can be seen that in hybrid B₁ × *re pe*, for which we have tested the effects of hypoxia on the second, third, fifth and eighth days of development on rf values (Fig. 8) and which had almost normal embryonic viability after hypoxia (Fig. 7), increased values were registered just on the fifth and eighth days of incubation, when embryonic mortalities were highest in PK1.

Fig. 6: Dependence of recombination frequency upon thermal shock the day before hatching.

Material: *lem Ze* × B₁, B₂.
See text for explanations.

Fig. 6 : Effet du traitement thermique la veille de l'éclosion sur la fréquence de recombinaison.

Matériel : *lem Ze* × B₁, B₂.

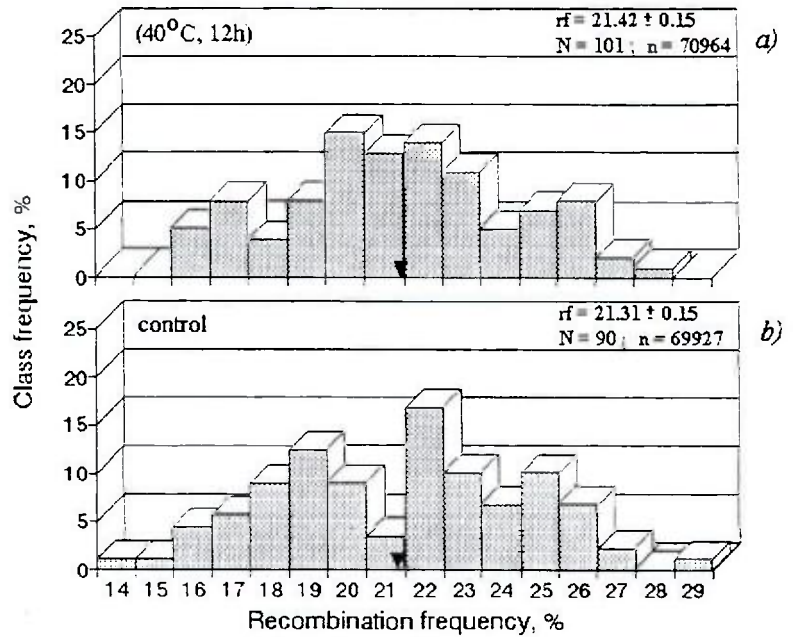


Fig. 7: Embryonic resistance of silkworm stocks to hypoxia at different stages of development.

Embryonic viability is calculated with reference to the controls. PK1 and P5D are parthenoclones.

Fig. 7 : Résistance embryonnaire des souches de vers à soie à l'hypoxie à différents stades du développement.

La viabilité des embryons est calculée par rapport aux témoins. PK1 et P5D sont des parthénoclones.

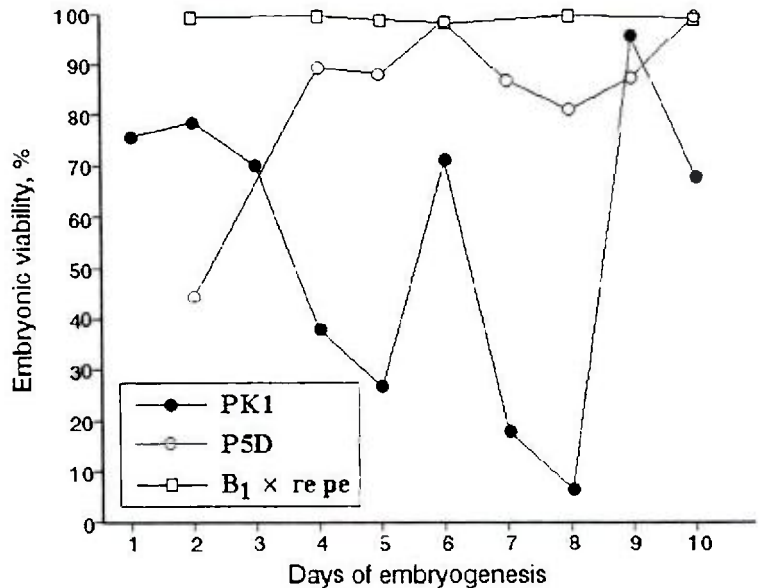


Fig. 8: Dependence of recombination frequency upon hypoxia at different embryonic stages for the hybrid $B_1 \times re\ pe$.

N is the number of layings and n is the number of eggs.

* The difference is significant at the 99.9% confidence level according to t and χ^2 criteria.

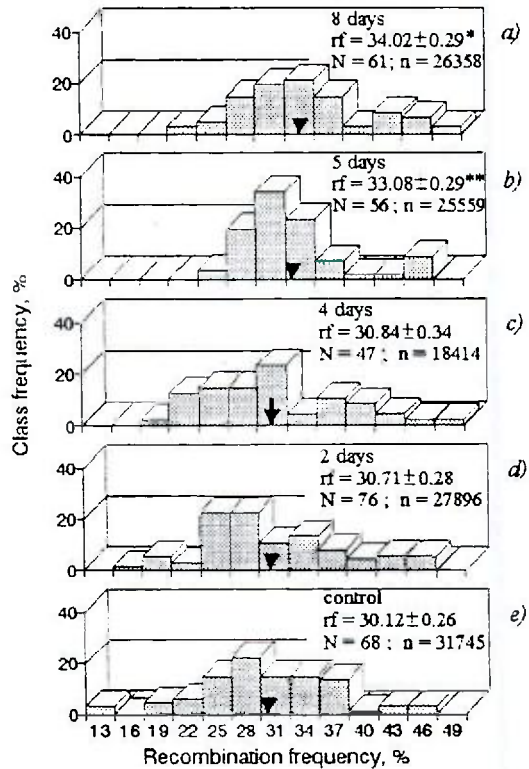
** The difference is significant at the 99.9% confidence level according to t, F and χ^2 criteria.

Fig. 8 : Effet de l'hypoxie à différents stades embryonnaires chez l'hybride $B_1 \times re\ pe$ sur la fréquence de recombinaison.

N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs.

* La différence est significative au seuil de 99,9 % d'après les tests t et χ^2 .

** La différence est significative au seuil de 99,9 % d'après les tests t, F et χ^2 .



Starvation for one day after hatching:

The silkworm has already been used as a laboratory tool for investigations aiming to evaluate the effects of starvation. It has been shown that components of the translational apparatus in the posterior silk gland are coordinated with proteosynthetic activity under different physiological conditions, including starvation (Chavancy and Fournier, 1979).

It is also known that starvation, or insufficient feeding, in the fifth larval instar causes a production of a smaller amount of eggs, owing to the sequential determinism of oocyte development in the silkworm (Legay, 1975).

Starvation was tried here especially because of its effectiveness in *Drosophila*, as mentioned above. The results (Figures 9 and 10) show no difference in the mean rf between the two hybrids. Some changes in the shape of distribution cannot be excluded but additional material is required to settle this question.

DISCUSSION

The work presented here shows that changes in the rf between genes can be provoked in the silkworm by high temperature and hypoxia both at the state of mature unfertilized eggs and in embryogenesis. In the first case, the rf may decrease, in the second it may increase.

Hypoxia may not produce any visible effects on embryonic and post-embryonic viability but at the same time it can induce an increase in crossover frequency between some genes. It should be noted that sensitivity to hypoxia is different among stocks of the silkworm and it can be exploited for selection if some useful correlations between this trait and quantitative characters take

Fig. 9: Dependence of recombination frequency upon starvation.

Material: $B_1 \times re\ pe$.

N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

* The difference is significant at the 95% confidence level according to F criterion.

Fig. 9 : Effet du jeûne sur la fréquence de recombinaison.

Matériel : $B_1 \times re\ pe$.

N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 95 % d'après le test F.

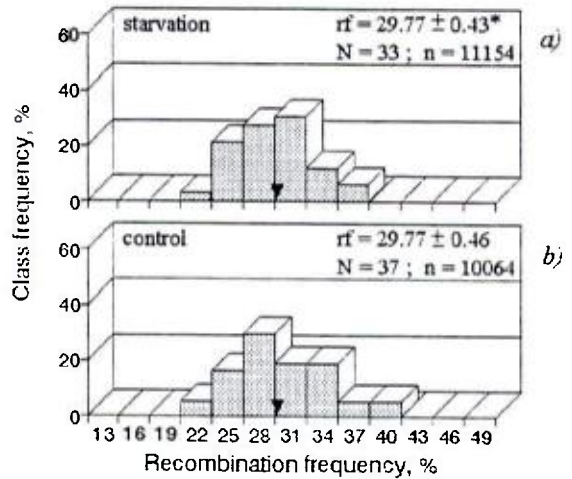


Fig. 10: Dependence of recombination frequency upon starvation.

Material: $B_2 \times re\ pe$.

N is the number of layings and n is the number of eggs. Dark arrowhead indicates the median value.

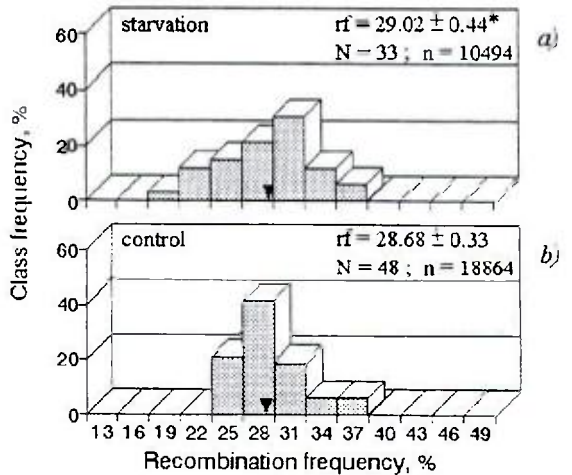
* The difference is significant at the 99% confidence level according to F criterion.

Fig. 10 : Effet du jeûne sur la fréquence de recombinaison.

Matériel : $B_2 \times re\ pe$.

N représente le nombre de pontes et n le nombre d'œufs. La flèche indique la valeur médiane.

* La différence est significative au seuil de 99 % d'après le test F.



place. Starvation after hatching could not be shown here as effective in changing the recombination frequency. In contradistinction to *Drosophila*, changes induced in the organism of starving silkworm larvae do not change the rf values if this stressing agent acts at the beginning of the larval stage. To draw unambiguous conclusions, further experiments using both laboratory tools (*Drosophila* and *Bombyx*) are required.

On the whole, the results obtained here demonstrate that various stage-specific reactions of the developing organism onto non-optimal external impacts (temperature shock, hypoxia, etc.) will mostly not disappear completely by the time when meiotic recombination processes are determined. This has been shown by their effect on recombination frequencies, which are changed. These changes are considered to be of importance for evolution in selection as a strategy for conserving and delivering genetic variability in changing environments (Huxley, 1942; Zhuchenko and Korol, 1985). For animals and especially insects, it is of great interest to find whether the 'long-range' influences on meiotic recombination originate in soma or germ line cells or both, and in what form they persist prior to their action during meiosis. Transplantation of gonads may be a useful approach to this problem but has not yet been tried.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Prof. T. Furdui and Dr I. Plugaru for fruitful discussions, encouragement and help in experimentation.

REFERENCES

- ABEL W.O. (1965) Über den Zeitpunkt des Crossing-over und der Chromosomenverdopplung bei *Sphaerocarpus*. Ztschr. Vererbungsl., 96(3), 228-233.
- ASTAUROV B.L. (1940) Artificial Parthenogenesis in the Silkworm, *Bombyx mori* L., 240 pp., AN SSSR, Moscow-Leningrad. (in Russian).
- BERNSTEIN A.L. (1965) A Handbook of Statistics Solutions for the Behavioral Sciences. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.
- CHAVANCY G., FOURNIER A. (1979) Effect of starvation on tRNA synthesis, amino acid pool, tRNA charging levels and aminoacyl-tRNA synthetase activities in the posterior silk gland of *Bombyx mori* L. Biochimie, 61(2), 229-243.
- EBINUMA H. (1987) Selective recombination system in *Bombyx mori*. I. Chromosome specificity of the modification effects. Genetics, 117(3), 521-532.
- EBINUMA H., YOSHITAKE N. (1981) The genetic system controlling recombination in the silkworm. Genetics, 99(2), 231-245.
- EVANS C.W., DICKINSON H.G. (1984) (eds.) Controlling Events in Meiosis. 394 pp., The Company of Biologists Ltd., Cambridge.
- FURDUI F.I. (1986) Physiological mechanisms of adaptation to stressing factors of acute action. 240 pp., Shtiintsa, Kishinev. (in Russian).
- GRUSHKO T.A., KOROCHKINA S.E., KLIMENKO V.V. (1991) Temperature-dependent control of crossing-over frequency in *Drosophila melanogaster*. Genetika (USSR), 27(1), 1714-1721. (in Russian).
- HUXLEY J.S. (1942) Evolution: The Modern Synthesis. 645 pp., Allen and Unwin, London.
- KLIMENKO V.V. (1990) The silkworm, *Bombyx mori* L. In Animal Species in Developmental Biology. Plenum Press, New York.
- KOROCHKINA S.E., GRUSHKO T.A., KLIMENKO V.V. (1989) Temperature-dependent control of crossing-over frequency in *Drosophila melanogaster*. Genetika (USSR), 25(6), 1029-1035. (in Russian).
- LAMB B.C. (1969) Evidence from *Sordaria* that recombination and conversion frequencies are partly determined before meiosis, and a general model of the control of recombination frequencies. Genetics, 63(4), 807-820.
- LANDNER L. (1981) Variation of recombination frequency in *Neurospora crassa* following meiosis and evidence for a premeiotic sensitive stage. Mol. and Gen. Genet., 109(3), 219-232.
- NEEL J.V. (1941) A relation between larval nutrition and the frequency of cross-over in the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 26, 506-516.
- NOTHEL H. (1974) Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. V. Relations between the relative radioresistance and some recombination properties in the irradiated population ROI. Mutat. Res., 25, 325-336.
- STURTEVANT A.H. (1915) No crossing-over in the female of the silkworm moth. Amer. Natur., 49, 42-44.
- TAZIMA Y. (1964) The Genetics of the Silkworm. 253 pp., Logos Press, Academic Press, London.
- TAZIMA Y. (1978) (Ed.) The Silkworm: An Important Laboratory Tool. 307 pp., Kodansha, Tokyo.
- WESTERMAN M. (1967) The effect of x-irradiation on male-meiosis in *Schistocerca gregaria* (Forsk.). I. Chiasma frequency response. Chromosoma, 22, 401-416.
- ZHUCHENKO A.A., KOVTYUKH L.P., KOROL A.B. (1983) An examination of 'ontogenetic memory' hypothesis. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 269(6), 1493-1495. (in Russian).
- ZHUCHENKO A.A., KOROL A.B. (1985) Recombination in Evolution and Selection. 400 pp., Nauka, Moscow.

LES FREQUENCES DE *CROSSING-OVER* CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* SONT INFLUENCEES PAR LES STRESS SUBIS AU DEBUT DE L'ONTOGENESE

S.S. PALII^{1*} & V.V. KLIMENKO²

1. Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Republic of Moldova, Academiei Str. 1, Kishinev MD-2028, Moldavie.
2. Institute of Animal Science, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, P.O. Kulinichi, Kharkov 312120, Ukraine.

On a étudié les effets de certains stress environnementaux (choc thermique, hypoxie, jeûne) sur la fréquence de recombinaison entre les marqueurs re et pe sur le cinquième chromosome ainsi que l'influence du choc thermique sur les valeurs de fréquence de recombinaison entre les locus Zc et lem sur le troisième chromosome. Il est possible de provoquer des variations de fréquence de recombinaison entre les gènes chez le ver à soie par traitement à haute température et hypoxie aussi bien au stade oeufs matures non fécondés que pendant l'embryogenèse. Dans le premier cas, la fréquence de recombinaison tend à diminuer tandis que, dans le second cas, elle tend à augmenter. Les résultats obtenus montrent que certaines réactions spécifiques d'un stade donné chez l'organisme en cours de développement, dues à des phénomènes externes non optimaux, sont encore présentes au moment où se mettent en place les processus de la prophase méiotique et que ces réactions peuvent influencer les fréquences de crossing-over. Ce phénomène, observé chez plusieurs espèces, peut maintenant être étudié chez le ver à soie en utilisant le choc thermique, l'hypoxie, etc., ainsi que des lignées génétiques appropriées et des parthénoclones.

INTRODUCTION

On comprend que la plupart des agents physico-chimiques puissent agir sur les mécanismes complexes liés au processus méiotiques s'ils sont appliqués lors de sa progression dans l'organisme, les effets pouvant être constatés par les variations de fréquence de *crossing-over*. Cependant, qu'un stress produit longtemps avant le début de la méiose donne des résultats similaires, comme nous l'avons observé dans nos expériences, est plus difficile à interpréter.

On sait que certains types de stress entraînent des modifications de la recombinaison génétique s'ils sont appliqués longtemps avant le début de la méiose. Chez le criquet *Schistocerca gregaria*, les effets de l'exposition aux rayons X au cours de l'interphase préméiotique se traduisent par une diminution du nombre de chiasmas (Westerman, 1967). De même, des écarts de température survenant plusieurs cycles avant la méiose peuvent modifier les fréquences de *crossing-over* méiotiques chez *Sordaria* (Lamb, 1969). On a également obtenu des modifications induites par choc thermique des fréquences de recombinaison en agissant à un stade préméiotique chez *Sphaerocarpus* (Abel, 1965). Par la suite, Landner (1970), utilisant *Neurospora* comme outil de laboratoire, a observé que les fréquences de recombinaison étaient liées à la température, en prouvant l'existence d'un stade préméiotique sensible.

A cet égard, *Drosophila melanogaster* semble être l'insecte le plus étudié. Si les larves de *Drosophila* sont soumises au jeûne, la fréquence de recombinaison (troisième chromosome) augmente chez les femelles imagos (Neel, 1941). On peut provoquer une augmentation des valeurs de fréquence

* Auteur à contacter pour toute correspondance.

de recombinaison (rf) sur le deuxième groupe de liaison de cet insecte par exposition aux rayons X ; l'efficacité de ce traitement a également été prouvée pour certains stades sensibles de la méiose et de la préméiose (Nothel, 1974).

Une confirmation de ce phénomène a été récemment obtenue chez *Drosophila*, en soumettant des larves du premier âge à des températures basses et élevées ou à des chocs thermiques ainsi que chez des formes matérielles imaginales (Zhuchenko, 1983 ; Grushko et coll., 1991).

On a utilisé ici comme animal de laboratoire le ver à soie afin d'étudier ce problème. Avant tout, nous avons recherché l'existence de ce phénomène lui-même chez cette espèce, pour laquelle on connaît certains autres aspects du système de recombinaison. Un grand nombre de données obtenues par analyse de liaison permettent de tirer des conclusions définitives sur la différenciation locale des chromosomes du ver à soie et sur la forte intégration de leur organisation génétique (Tazima, 1964). De plus, dans des travaux sur l'effet d'agents modificateurs de la fréquence de recombinaison entre différentes paires de locus situées sur les deuxième, troisième et cinquième chromosomes, des chercheurs japonais ont démontré la spécificité chromosomique de l'effet de modification et ont proposé un modèle génétique contrôlant la recombinaison chez le ver à soie consistant en l'intervention de modificateurs de recombinaison généraux et locaux (Ebinuma et Yoshitake, 1981 ; Ebinuma, 1987).

Afin d'obtenir une caractérisation plus approfondie du système de recombinaison du ver à soie, il est intéressant de savoir si les stress environnementaux peuvent induire des modifications des fréquences de recombinaison et de connaître les stades sensibles à différents types de stress. En particulier, il serait tout à fait intéressant de connaître les mécanismes responsables de la modification de la fréquence de recombinaison après exposition à des stress subis longtemps avant la prophase méiotique. On ne connaît pas ces mécanismes chez le ver à soie ou chez d'autres organismes. Des recherches dans cette direction seraient plus concluantes si ce phénomène était étudié chez de bons systèmes modèles (Tazima, 1978). L'un de ces modèles semble être le ver à soie (Klimenko, 1990).

MATERIELS ET METHODES

Le matériel expérimental comprend deux souches (B₁ et B₂) qui sont considérées comme équivalentes respectivement de J-112 et C-108, souches utilisées comme témoins dans de nombreux pays. Ainsi qu'il est démontré ici, B₁ et B₂ diffèrent sur le plan de la fréquence de recombinaison. Les souches ont été croisées avec les lignées marqueurs *re pe* ou *Ze lem* pour obtenir les mâles hybrides F₁ destinés aux différents traitements et ensuite calculer les fréquences de *crossing-over* entre *re* et *pe* chez les F₂ ou entre *Ze* et *lem* chez les croisements issus des mâles F₁ et du parthénoclon P (+ *lem*). Il n'y a pas de *crossing-over* chez le ver à soie femelle (Sturtevant, 1915).

Les expériences décrites ici sont regroupées en fonction des agents utilisés pour agir sur l'organisme à un stade donné du développement.

Choc thermique chez les femelles avant et après l'accouplement :

Le schéma des traitements thermiques est présenté dans la figure 1. Dans la variante A, les femelles B₁ et B₂ ont été refroidies en les conservant à 16 °C pendant 24 heures ou soumises à un stress thermique pendant plusieurs heures après l'éclosion. L'accouplement a été réalisé dès la fin du traitement thermique ou 24 heures plus tard ; les femelles soumises à la chaleur ont été conservées à 16 °C dans le deuxième cas. Dans les variantes B et C (Fig. 1), les femelles B₁ ont été soumises à un stress thermique de 45 °C pendant 30 minutes avant et après l'accouplement ou seulement après l'accouplement.

Choc thermique la veille de l'éclosion :

Les traitements thermiques ont été réalisés à 40 °C pendant 12 heures dans des conditions d'humidité élevée obtenues par évaporation d'eau déposée dans des boîtes de Pétri placées dans la chambre thermique.

Hypoxie à différents stades du développement :

L'hypoxie a été obtenue en conservant les oeufs en cours de développement pendant 30 minutes dans de l'eau à 25 °C. On a utilisé le parthénoclone PK1 pour mettre en évidence les effets de l'hypoxie. Selon Astaurov (1940), un parthénoclone est le descendant d'une femelle reproduit par parthénogenèse améiotique thermique. Tous les individus d'un même clone ont un génotype identique.

Jeûne pendant une journée en sortie d'éclosion :

Dans ce traitement, les larves ont été privées de nourriture pendant 24 h juste après l'éclosion à 25 °C et dans des conditions d'humidité élevée.

Dans toutes les figures, N représente le nombre de pontes et n le nombre d'oeufs. Nos estimations peuvent ainsi être vérifiées et le modèle de répartition peut, dans une certaine mesure, montrer la structure génétique des systèmes rf étudiés.

Bien que les valeurs des fréquences de recombinaisons et leurs écarts types présentés dans les figures soient estimés en comptant le nombre de descendants présentant ou non un *crossing-over* (caractères de substitution) d'après la formule :

$$\overline{rf} \pm \sqrt{\frac{\overline{rf} \% (100 - \overline{rf}) \%}{n}}$$

la répartition des pontes pour ce qui concerne la fréquence de recombinaison est également donnée dans tous les cas pour montrer que les estimations statistiques sont parfois effectuées selon des répartitions anormales vraisemblables des échantillons comparés. Comme le montrent les travaux cités plus haut sur le système de recombinaison chez le ver à soie, on ne peut escompter des répartitions normales dans tous les cas. En fait, sans une sélection appropriée, ce système engendre plutôt des répartitions anormales (bimodales, par exemple), la situation réelle étant clairement démontrée en utilisant un « mélange » des deux systèmes rf (B₁ et B₂) avec les marqueurs *lem* et *Ze* lorsque le modèle de répartition passe de bimodal à presque normal après un stress. Dans tous les cas, cette situation n'exclue pas les comparaisons statistiques suivant différents critères (nous avons utilisé les critères t, F et χ^2). En fait, toute différence de rf supérieure à 1 % s'est révélée significative ; les différences sont indiquées dans les légendes des figures (Bernstein, 1965).

RESULTATS

Choc thermique des femelles avant et après l'accouplement :

Les résultats obtenus pour B₁ × *re pe* (Fig. 2) et B₂ × *re pe* (Fig. 3) sont concordants. La valeur de fréquence de recombinaison chez B₂ × *re pe* tombe à 4 % après le choc thermique ; cet effet sur les ovocytes matures à l'intérieur des femelles étant réversible à 16 °C et la fréquence de recombinaison revenant au niveau du témoin ou à un niveau légèrement supérieur.

Dans des expériences complémentaires sur les femelles B₂, on note une légère augmentation de la fréquence de recombinaison chez l'hybride B₂ × *re pe* après traitement thermique à 44 °C pendant 60 minutes puis refroidissement des femelles à 16 °C pendant 24 heures (Fig. 4). En l'absence de choc thermique, le refroidissement pourrait être plus efficace ; de plus, le choc thermique seul entraîne également une diminution de la fréquence de recombinaison (Fig. 4). Ceci a également été observé chez l'hybride B₁ × *re pe*. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas d'effet si le choc thermique est appliqué après l'accouplement (Fig. 5b) et qu'il n'y a pas d'effet supplémentaire si le choc thermique est répété après l'accouplement (voir Fig. 5a).

Choc thermique la veille de l'éclosion :

Comme le montre la figure 6, il n'y a pas de différence dans les moyennes de fréquence de recombinaison entre les deux variantes. Cependant, compte tenu des formes de répartition, il est possible d'interpréter les données obtenues. La série témoin montre clairement que les descendants mâles des mâles B₁ et B₂ diffèrent pour ce qui concerne la fréquence de recombinaison moyenne entre

lem et Ze. En conséquence, la répartition présente deux pics (Fig. 6b). Nous pouvons également dire que, après choc thermique d'animaux donnant deux moyennes différentes (pour B₁ et B₂), les valeurs moyennes tendent à se déplacer vers la moyenne commune ; ce qui entraîne une nouvelle répartition avec des classes intermédiaires plus importantes (Fig. 6a).

Hypoxie à différents stades du développement embryonnaire :

Le choc thermique à différents stades du développement permet de modifier la fréquence de *crossing-over* entre les différents locus d'un génome (Koroehkina et coll., 1989). Cependant, si le traitement thermique est effectué en conservant dans l'eau chaude les oeufs en cours de développement, l'effet de l'hypoxie, qui est un facteur fortement stressant chez d'autres animaux (Furdui, 1986), doit être considéré séparément, les souches de vers à soie présentant différents degrés de sensibilité à l'hypoxie. On a utilisé ici, comme exemple de la sensibilité d'une souche, le parthénoclon PKI (Fig. 7) pour définir les stades du développement les plus réactifs à l'hypoxie pour ce qui concerne la viabilité embryonnaire (incubation à 25 °C). Bien que les autres souches étudiées ici aient une résistance embryonnaire plus forte à l'hypoxie, nos résultats nous conduisent à la conclusion que les effets du stress subi sont plus importants que ce que l'analyse de la viabilité embryonnaire ne le laisse supposer. On constate donc que, chez l'hybride B₁ × *re pe*, pour lequel nous avons testé les effets de l'hypoxie aux deuxième, troisième, cinquième et huitième jours du développement sur les valeurs des fréquences de recombinaison (Fig. 8) et qui présente une viabilité embryonnaire presque normale après hypoxie (Fig. 7), on enregistre des valeurs supérieures seulement après traitement au cinquième et au huitième jour de l'incubation, lorsque la mortalité embryonnaire est maximale chez PKI.

Jeûne pendant une journée en sortie d'éclosion :

Le ver à soie a déjà été utilisé comme outil de laboratoire dans des recherches sur l'effet du jeûne. Les composants de l'appareil de traduction dans la glande séricigène postérieure sont coordonnés avec l'activité protéosynthétique dans différentes conditions physiologiques, dont le jeûne (Chavancy et Fournier, 1979).

On sait également que le jeûne, ou une alimentation insuffisante au cinquième âge, entraîne une diminution de la production d'oeufs en raison du déterminisme séquentiel du développement des ovocytes chez le ver à soie (Legay, 1975).

Dans notre étude, nous avons testé le jeûne principalement en raison de son efficacité chez *Drosophila*, comme nous l'avons indiqué plus haut. Les résultats (Fig. 9 et 10) révèlent qu'il n'y a pas de différence de fréquence de recombinaison entre les deux hybrides. Des variations de la forme de la distribution ne sont pas exclues ; cependant, des données supplémentaires sont nécessaires pour résoudre cette question.

DISCUSSION

Les travaux présentés ici montrent que les variations des fréquences de recombinaison entre les gènes peuvent être provoquées chez le ver à soie par traitement thermique et par hypoxie, tant au stade oeuf mature non fécondé qu'au cours de l'embryogenèse. Dans le premier cas, la fréquence de recombinaison tend à diminuer ; dans le second cas, elle tend à augmenter.

L'hypoxie ne produit pas d'effets visibles sur la viabilité embryonnaire et post-embryonnaire mais, parallèlement, elle peut induire une augmentation de la fréquence de *crossing-over* entre certains gènes. Il convient de noter que la sensibilité à l'hypoxie varie en fonction des souches de vers à soie et qu'elle peut être exploitée pour la sélection si certaines corrélations entre ce caractère et les caractères quantitatifs sont établies. Nous n'avons pas pu démontrer que le jeûne en sortie d'éclosion permet de modifier la fréquence de recombinaison. Contrairement à *Drosophila*, les modifications induites dans l'organisme des larves de vers à soie soumises au jeûne n'entraînent pas de variation des valeurs de fréquence de recombinaison si ce stress se produit au début du stade larvaire. Des expériences complémentaires utilisant les deux modèles de laboratoire (*Drosophila* et *Bombyx*) sont nécessaires pour obtenir des conclusions définitives.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ici permettent de démontrer que diverses réactions spécifiques d'un stade donné chez un organisme en développement apparaissant avec des conditions externes (choc thermique, hypoxie, etc.) non optimales ne disparaissent pas totalement au moment de la détermination des processus de recombinaison méiotique. Ceci est prouvé par le fait que les fréquences de recombinaison se trouvent modifiées par ces effets. Ces modifications sont importantes pour l'évolution au cours de la sélection comme stratégie de conservation et d'obtention d'une variabilité génétique dans des milieux fluctuants (Huxley, 1942 ; Zhuchenko et Korol, 1985). Pour l'étude des animaux et, en particulier, des insectes, il est très intéressant de déterminer si les influences « à longue échéance » trouvent leur origine dans les somas ou dans les cellules de lignées germinales ou encore dans les deux et de savoir sous quelle forme elles persistent avant d'entrer en action pendant la méiose. La transplantation des gonades, qui pourrait permettre d'élucider ce problème, n'a pas encore été utilisée.

EVIDENCE THAT FAT BODY MAY BE A TARGET ORGAN FOR OESTROGEN IN *BOMBYX MORI* L.

S. DAS* & A.K. RAY

Department of Animal Physiology, Bose Institute, P 1/12 CIT Scheme VII M, Calcutta 700 054, India.

*Fat body of both male and female pupae of the silkworm (*Bombyx mori* L.) responded to injections of various doses of oestrogen (E_2) given in their larval life, by increasing protein and RNA contents in comparison to the corresponding control values. The pupal haemolymph protein content in male and female silkworms was also raised by E_2 treatment. The lipogenic enzyme, i.e., mitochondrial NAD-malate dehydrogenase and cytosolic NADP-malate dehydrogenase activities in male and female pupal fat bodies also responded by dose-dependent increase after E_2 injections. Simultaneous use of tamoxifen counteracted the E_2 -induced rise in NAD-malate dehydrogenase activity in male and female pupal fat bodies, whereas it behaved as E_2 agonist in the case of NADP-malate dehydrogenase activities in this organ of pupae of both sexes. Although the nature (physiological or pharmacological) of the doses of E_2 used in this experiment has not been evaluated, the accumulation of protein in both fat body and haemolymph and the stimulation of lipogenesis in the fat body of male and female silkworm pupae indicates the probable lipoprotein (lipovitellin?) synthetic role of E_2 in this organ, as found in the liver of oviparous vertebrates, posing the fat body as a target organ for this hormone (E_2).*

Keywords: Oestrogen, fat body, vitellogenin, NAD-malate dehydrogenase, NADP-malate dehydrogenase, *Bombyx mori* L., protein, nucleic acids.

INTRODUCTION

In oviparous vertebrates, oestrogen plays an important role in induction of vitellogenin (egg yolk protein precursor) synthesis in the liver, which is then released in the plasma and subsequently taken up by maturing oocytes (Bergink *et al.*, 1974). In insects, including silkworms (*Bombyx mori* L.), oestrogenic compounds have been detected in ovaries (Mechoulam *et al.*, 1983; Ohnishi *et al.*, 1985). In an attempt Ogiso and Ohnishi (1986) found no effect of E_2 on ovarian development of the silkworms in isolated abdomens in pupal condition. The various neuroendocrine organs are involved in the reproductive processes of this insect. So, the possibility of involvement of oestrogen in the reproduction in silkmoths cannot be ruled out.

Considering the lack of knowledge on the physiological significance of the presence of oestrogen in *Bombyx mori* and specially on its role in reproductive processes, if any, the present investigation has been carried out to observe responses of the fat body of this insect to exogenous oestrogen.

MATERIALS AND METHODS

Bombyx mori L. (race Nistari) larvae were reared with fresh mulberry leaves at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 12 L + 12 D photoperiodic condition. Two-day-old fifth instar larvae were chosen for the experiment. The same individual was injected twice (on the 2nd and 5th day of the fifth instar) with different doses of estradiol-17 β (E_2 , Sigma Chemical Company, USA, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 6.0 $\mu\text{g/g}$ of body

* To whom correspondence should be addressed.

weight) through the second abdominal leg. The control animals were injected with equal volumes of the vehicle (groundnut oil). The injected volume did not exceed 5 μ l in any case. The silkworms were sacrificed on the 3rd day of pupal life. The haemolymph was collected from the pupa by a puncture in the anal margin of the wings and with a gentle pressure on the abdomen. It was then centrifuged at 4000 rpm for two minutes to make it cell-free. The fat bodies from the silkworm pupae were surgically removed in cold and rinsed with cold 0.65% saline to make it free from haemolymph contamination, homogenized in 0.25 M sucrose in a glass-Teflon homogenizer. The cell debris and nuclei were separated with a spin at $1000 \times g$ for 5 minutes. The supernatant was fractionated after centrifugation at $16,000 \times g$ for 20 minutes to collect the mitochondrial pellet. The remaining portion was centrifuged again at $105,000 \times g$ for 1 hour to get the cytosol. The entire process was handled at 4 °C.

Isolation of protein and nucleic acids from the 5% homogenate of fat body was made basically following the Schmidt-Thannhauser process, as described by Munro and Fleck (1966) and further modified by Abalain *et al.* (1980). Determination of the protein content was made by the method of Lowry *et al.* (1951). The nucleic acid content was measured by determining the optical density at 260 nm with calf thymus DNA and yeast RNA as standards (Abalain *et al.*, 1980) using Beckman Model-24 spectrophotometer.

The activity of mitochondrial NAD-linked malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37) was determined by the method of England and Siegel (1969) with a reaction mixture containing 0.3 mM NAD, 1.93 mM L-malic acid and 16.12 mM glycine-NaOH buffer at pH 10.0. The enzyme activity was measured in a Beckman Model-24 spectrophotometer at 340 nm, as a function of NAD reduction and expressed as Δ OD/min./mg protein. The cytosolic NADP-linked malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.40) was assayed following the method of Hsu and Lardy (1969) as modified by Murphy and Walker (1974) using a reaction mixture containing 0.5 mM NADP, 2.5 mM L-malic acid, 0.2 mM $MnCl_2$ and 48 mM triethanolamine buffer at pH 8.0. The rate of NADP reduction was measured at 340 nm and the specific activity was expressed as Δ OD/min./mg protein.

The data presented here are mean $\pm$ standard error of observations from 15 individual animals in each group. Statistical analysis of the data was made by Student's 't' test with a significance cut-off level at $p < 0.05$.

RESULTS

1. Changes in fat body protein and nucleic acid contents, and haemolymph protein:

Injections of different doses of E_2 at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 4.0 μ g/g caused an increase in protein and RNA contents in the fat body of male silkworm pupae in comparison to the control values (Table I). The dose-specific rise in the protein contents was found to be between 0.5 or 1.0 and 1.5 μ g/g ($p < 0.001$), and 1.0 and 2.0 μ g/g ($p < 0.001$) doses of E_2 . The level of RNA contents showed differences between 0.5 and 1.5 μ g/g ($p < 0.001$), 1.0 or 1.5 and 2.0 μ g/g ($p < 0.001$ and $p < 0.02$) doses in the male silkworm pupae.

In female silkworms, a statistically significant rise in the protein and RNA contents of the fat body was observed with 1.0, 1.5 and 2.0 μ g/g of E_2 . Both protein and RNA contents showed dose-dependent differences (rise) between 0.5 and 1.0 μ g/g ($p < 0.001$) doses of E_2 . The maximum effect of E_2 on these cellular constituents was found at 1.0 μ g/g dose. A higher dose of 4 μ g/g of E_2 did not elicit any response to the protein and RNA contents in the fat body of female silkworms in comparison to the control values.

In control male and female silkworms, there were significant changes in protein ($p < 0.01$) and RNA ($p < 0.001$) contents but no changes were observed between them after the treatment of estradiol-17 β .

In both male and female pupae, the haemolymph protein contents were increased after injections of 1.5 and 2.0 μ g/g of E_2 in comparison to the controls. The lower doses of 0.5 and 1.0 μ g/g of the hormone were without any effect. A higher dose of 4.0 μ g/g of E_2 appeared as ineffective in eliciting any response.

Table I. Effect of different doses of E₂ on protein and RNA contents in the fat body and protein content in the haemolymph of pupae of male and female silkworms.

Tableau I. Effet de différentes doses de E₂ sur les teneurs en protéines et en ARN du corps adipeux et en protéines de l'hémolymphe des chrysalides de vers à soie mâles et femelles.

Treatment	Sex	Fat body		Haemolymph
		Protein (µg/µg DNA)	RNA (µg/µg DNA)	Protein (mg/ml plasma)
Traitement	Sexe	Corps adipeux		Hémolymphe
		Protéines (µg/µg ADN)	ARN (µg/µg ADN)	Protéines (mg/ml plasma)
Control	Male / Mâle	26.51 ± 2.42	2.78 ± 0.23	66.6 ± 1.4
Témoin	Female / Femelle	38.21 ± 2.88	4.04 ± 0.11	66.2 ± 1.1
E ₂ 0.5 µg/g	Male / Mâle	35.87 ± 3.71 ^a	4.10 ± 0.32 ^b	67.4 ± 1.9
	Female / Femelle	39.55 ± 5.69	4.27 ± 0.33	73.1 ± 3.7
E ₂ 1.0 µg/g	Male / Mâle	39.80 ± 2.18 ^c	4.60 ± 0.22 ^c	60.8 ± 2.9
	Female / Femelle	63.22 ± 5.6 ^c	6.02 ± 0.31 ^c	70.3 ± 5.9
E ₂ 1.5 µg/g	Male / Mâle	64.85 ± 4.30 ^c	5.20 ± 0.26 ^c	82.9 ± 3.3 ^c
	Female / Femelle	63.38 ± 1.72 ^c	5.62 ± 0.22 ^c	92.0 ± 3.1 ^c
E ₂ 2.0 µg/g	Male / Mâle	66.28 ± 4.21 ^c	6.17 ± 0.24 ^c	83.6 ± 5.2 ^b
	Female / Femelle	59.19 ± 4.15 ^c	6.06 ± 0.21 ^c	74.3 ± 1.5 ^c
E ₂ 4.0 µg/g	Male / Mâle	33.07 ± 1.13 ^a	3.97 ± 0.51 ^a	58.8 ± 6.1
	Female / Femelle	39.47 ± 3.15	4.41 ± 0.38	66.7 ± 3.2

Level of significance in comparison to the control values / Seuil de signification par rapport aux valeurs témoins :

a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$.

Data expressed as mean ± SE of 15 individual animals in each group.

Les données correspondent à la moyenne ± l'écart type de 15 individus dans chaque groupe.

2. Changes in NAD-linked mitochondrial malate dehydrogenase in the fat body:

Injections of different doses (0.5, 1.0 and 2.0 µg/g) of E₂ caused a dose-dependent rise ($p < 0.01$) in the mitochondrial NAD-linked malate dehydrogenase activity in the fat body of 3-day-old male silkworm pupae (Fig. 1). Higher doses of 3.0 and 6.0 µg/g of E₂ showed the same magnitude of rise in the enzyme activity as found with 2.0 µg/g of E₂. Interestingly enough, the female pupae showed responsiveness of this enzyme activity to 2.0, 3.0 and 6.0 µg/g of E₂ only. A statistically significant difference in the magnitude of rise ($p < 0.001$) in the enzyme activity was observed only between 2.0 and 3.0 µg/g of E₂ doses in the fat body of the female silkworm pupae.

3. Changes in NADP-linked cytosolic malate dehydrogenase in the fat body:

Stimulation ($p < 0.02$ – $p < 0.001$) in the activity of cytosolic NADP-linked malate dehydrogenase was observed in the fat body of male silkworm pupae after treatments with different doses (0.25, 0.5,

Fig. 1: Effect of injections of different doses of E_2 on mitochondrial NAD-linked malate dehydrogenase activity in the fat body of male and female silkworm pupae.

The data are expressed as mean $\pm$ SE of 15 individual animals in each group.

Fig. 1 : Effet de l'injection de différentes doses de E_2 sur l'activité NAD-malate déshydrogénase mitochondriale dans le corps adipeux de chrysalides mâles et femelles.

Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart type de 15 individus dans chaque groupe.

—●— Male / Mâle.
—○— Female / Femelle.

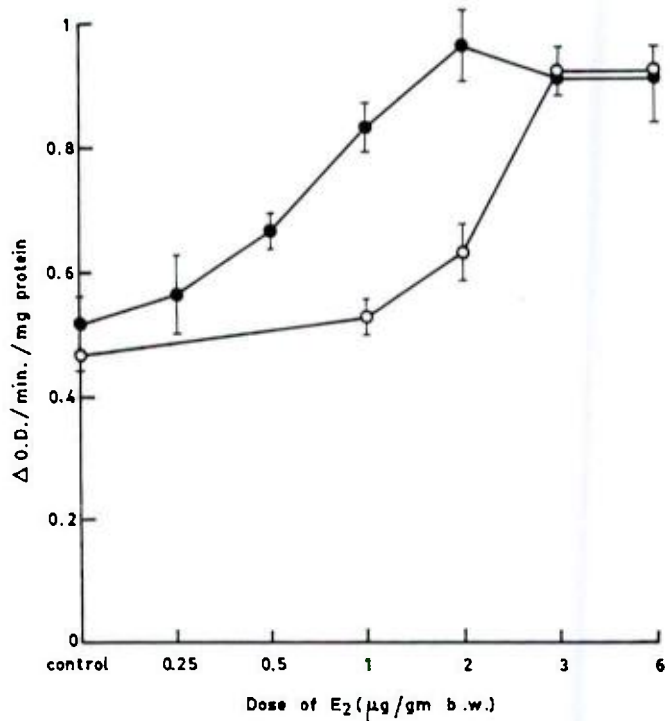


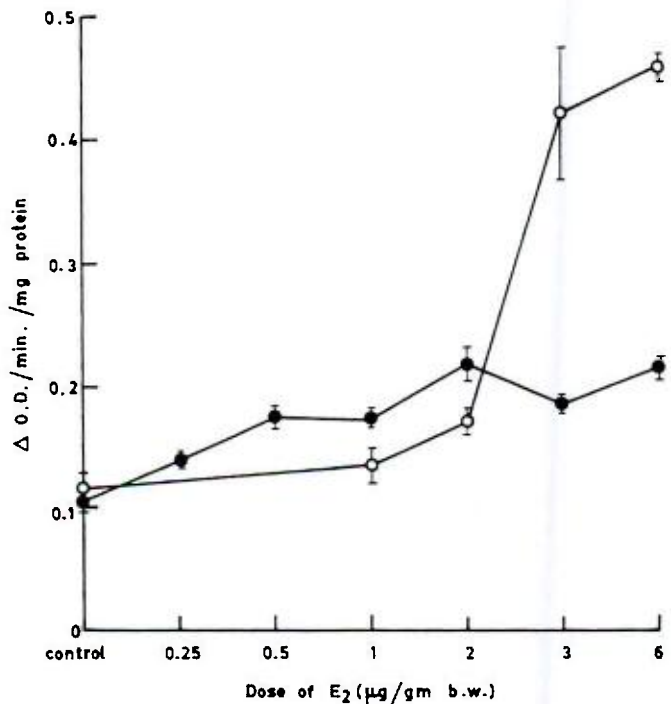
Fig. 2: Effect of injections of different doses of E_2 on cytosolic NADP-linked malate dehydrogenase activity in the fat body of male and female silkworm pupae.

The data are expressed as mean $\pm$ SE of 15 individual animals in each group.

Fig. 2 : Effet de l'injection de différentes doses de E_2 sur l'activité NADP-malate déshydrogénase cytosolique dans le corps adipeux de chrysalides mâles et femelles.

Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart type de 15 individus dans chaque groupe.

—●— Male / Mâle.
—○— Female / Femelle.



1.0, 2.0, 3.0, 6.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 (Fig. 2). The dose-response relationship of the enzyme activity was found between 0.25 and 0.5 ($p < 0.01$), and 0.5 and 2.0 $\mu\text{g/g}$ ($p < 0.01$) of E_2 doses in these animals. The higher doses (3.0 and 6.0 $\mu\text{g/g}$) of E_2 showed a similar magnitude of rise in the enzyme activity to that of 2.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 dose. The female silkworm pupal fat body responded to E_2 with a statistically significant rise ($p < 0.01$) in the enzyme activity only with 2.0, 3.0 and 6.0 $\mu\text{g/g}$ doses. A dose-dependent rise ($p < 0.001$) in the cytosolic malate dehydrogenase activity was found with 2.0 and 3.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 doses. Lower doses of 0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 were ineffective to cause any change in the enzyme activity in the fat body of female silkworm pupae, in comparison to the corresponding control values.

4. Use of tamoxifen on the NAD- and NADP-linked malate dehydrogenase activities:

The E_2 -induced rise in enzyme activity (NAD-linked malate dehydrogenase) was counteracted by simultaneous injections of tamoxifen (1.0 $\mu\text{g/g}$), an antioestrogenic compound with E_2 (2.0 $\mu\text{g/g}$). The counteraction has been shown (Fig. 3) in the fat body of both male and female silkworm pupae.

In the case of NADP-linked malate dehydrogenase activity in the fat body, tamoxifen acted as an oestrogen agonist which raised the magnitude of the enzyme activity when used alone at 1.0 $\mu\text{g/g}$ dose ($p < 0.01$). But it appeared as ineffective to counteract the E_2 effect when tamoxifen (1.0 $\mu\text{g/g}$) was used with E_2 (2.0 $\mu\text{g/g}$), as evidenced by the similar magnitude of increase in the NADP-linked malate dehydrogenase activity in male and female silkworm pupae (Fig. 4).

DISCUSSION

As the fat body of the silkworm is concerned with the production of vitellogenin protein (Bradley, 1983), we have chosen this organ to examine its sensitivity to exogenous oestrogen in the present study. The significant rise in the level of protein and RNA contents with different doses of E_2 used both in male and female pupae and also the high level of protein content in the haemolymph after E_2 (1.5 and 2.0 $\mu\text{g/g}$) treatment are indicative of increased synthesis or decreased degradation of protein and RNA materials in the fat body, and the subsequent release and accumulation of protein(s) in the haemolymph. The female pupae appeared to be less sensitive to E_2 than the males, as the dose of 0.5 $\mu\text{g/g}$ was without any effect in the female pupae in altering the protein and RNA contents in the fat body. Such a difference in the relative sensitivity may be due to adaptive changes during exposure of the female fat body to endogenous oestrogen during the course of its development. The lesser degree of increment in protein and RNA contents in fat bodies of male pupae with 4.0 $\mu\text{g/g}$ dose in comparison to other doses like 1.5 and 2.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 , and total absence of any response after treatment with 4.0 $\mu\text{g/g}$ of E_2 in the female silkworms may be due to refractoriness of this organ to E_2 owing to the events of E_2 receptor desensitization at such high levels of the hormone. The present experiment shows an E_2 -induced accumulation of protein in the fat body and haemolymph. As E_2 causes synthesis of vitellogenin protein in the liver of oviparous vertebrates (Bradley, 1983), possibility remains open for an E_2 induction of vitellogenin formation in silkworm pupae also. Further studies on search for E_2 receptors and receptor- E_2 interaction for synthesis of specific vitellogenin protein in the silkworm will be very important to establish the reproductive role of E_2 in this insect.

As lipogenesis is an essential step for formation of vitellogenin (lipovitellin) in the fat body (Chinzei *et al.*, 1981), we were much interested in understanding the magnitude of lipogenesis in this organ in response to E_2 . The dose-response relationships of both NAD- and NADP-dependent malate dehydrogenase activities to exogenous E_2 clearly indicate the high level of responsiveness of this organ to the hormone for lipogenesis in both male and female pupae. As usually, the female fat body showed responsiveness to E_2 at relatively higher doses in comparison to that found in the male fat body. Stimulation of lipoprotein synthesis in target organs of higher vertebrates is a known action of oestrogen (Roy and Chatterjee, 1983; Chan, 1983).

In our efforts to observe the specificity of oestrogen action in the fat body of silkworm larvae we have used tamoxifen (a putative anti-oestrogenic compound) simultaneously with oestrogen. Tamoxifen counteraction of the E_2 effect on NAD-malate dehydrogenase activity in both male and female pupae clearly indicates the E_2 specificity of this effect in this enzyme.

Fig. 3: Effect of simultaneous use of tamoxifen with E₂ on mitochondrial NAD-linked malate dehydrogenase activity in the fat body of male and female silkworm pupae.

The data are expressed as mean $\pm$ SE of 15 individual animals in each group.

Fig. 3 : Effet de l'utilisation simultanée du tamoxifène avec E₂ sur l'activité malate déshydrogénase dépendant de la NAD mitochondriale dans le corps adipeux de chrysalides mâles et femelles.

Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart type de 15 individus dans chaque groupe.

■ Male / Mâle.

▨ Female / Femelle.

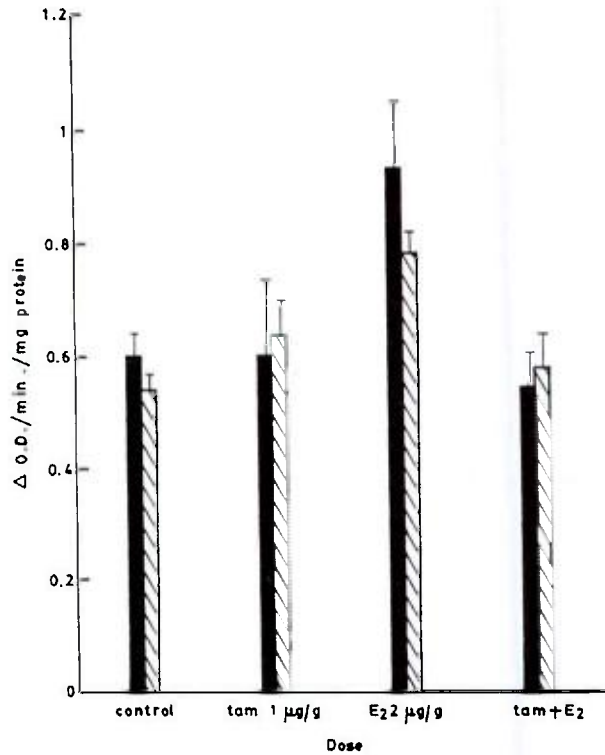


Fig. 4: Effect of simultaneous use of tamoxifen with E₂ on cytosolic NADP-linked malate dehydrogenase activity in the fat body of male and female silkworm pupae.

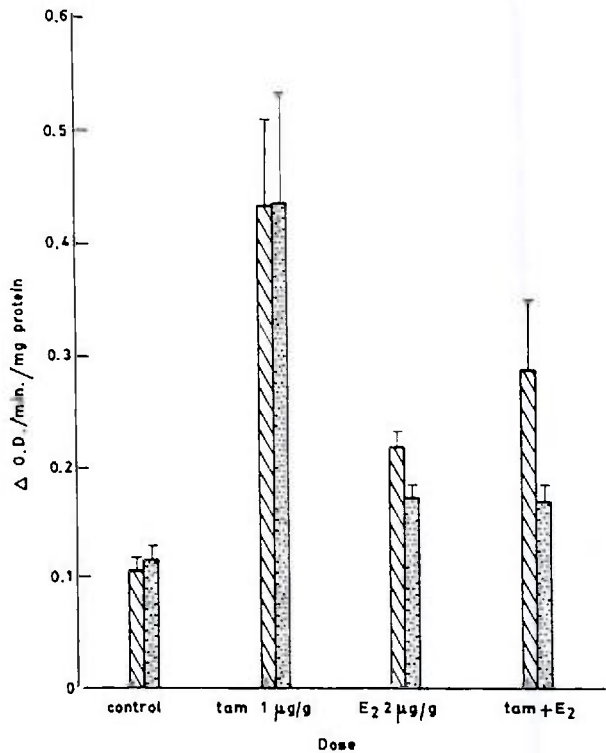
The data are expressed as mean $\pm$ SE of 15 individual animals in each group.

Fig. 4 : Effet de l'utilisation simultanée du tamoxifène avec E₂ sur l'activité malate déshydrogénase cytosolique dépendant de la NADP dans le corps adipeux de chrysalides mâles et femelles.

Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart type de 15 individus dans chaque groupe.

■ Male / Mâle.

▨ Female / Femelle.



But in NADP-malate dehydrogenase activity, tamoxifen failed to counteract the effect of E₂. Moreover, tamoxifen appeared to behave like an E₂ analogue in this enzyme activity in both male and female pupae when used alone. This may be due to the well-known oestrogen antagonistic or agonistic behaviour of tamoxifen, the nature of which depends on the animal species, organs and particular type of parameters taken into account (Capony and Williams, 1981; Blue and Williams, 1981). Further studies are in progress, using other varieties of anti-oestrogenic compounds.

Although we have not yet identified the protein(s) undergoing increased accumulation in the fat body and haemolymph in response to oestrogen, concomitant stimulation of lipogenesis by E₂ in the fat body favours much the formation of lipoproteins in this organ. The doses of E₂ (0.25 to 6.0 µg/g) we used in our experiment are probably very high in comparison to that found in the haemolymph of *Locusta* (20 pg/ml, De Loof and De Clerck, 1986) and ovaries of silkworms (176 pg/g, Ohnishi *et al.*, 1985). We do not know how much of our injected E₂ is transported to this organ to elicit such a response. Further investigations on haemolymph and fat body concentrations of E₂ after administration of such doses at different days will be much pertinent to differentiate the physiological or pharmacological nature of the doses of E₂. As indicated in our study, identification of a prominent vitellogenin protein-related reproductive role of E₂ may open up areas for manipulation of the reproductive processes in *Bombyx mori*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the Superintendent, Ranaghat Sericulture Nursery, West Bengal, for kindly supplying us the silkworm eggs.

REFERENCES

- ABALAIN J.H., JEGOP P., VALOIRE Y. (1980) Effect of 17β-estradiol on the DNA, RNA, protein contents and on the DNA, RNA polymerases in the Müllerian duct of the immature female newt (*Pleurodeles waltlii* Michah.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40, 402, 408.
- BERGINK E.W., WALLACE R.A., VAN DE BERG J.A., BOS E.S., GUBER M., AB G. (1974) Estrogen-induced synthesis of yolk proteins in roosters. *Am. Zool.*, 14, 1195-1206.
- BLUE M., WILLIAMS D.L. (1981) Induction of avian serum apolipoprotein II and vitellogenin by tamoxifen. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 98(3), 785-791.
- BRADLEY J.T. (1983) Physiology of insect vitellogenesis: protein uptake and synthesis by the ovary (a review). *J. Ala. Acad. Sci.*, 54(1), 33-47.
- CAPONY F., WILLIAMS D.L. (1981) Antiestrogen action in avian liver: the interaction of estrogens and antiestrogens in regulation of apolipoprotein B synthesis. *Endocrinology*, 108, 1862-1868.
- CHAN L. (1983) Hormonal control of apolipoprotein synthesis. *Ann. Rev. Physiol.*, 45, 615-623.
- CHINZEI Y., CHINO H., WYATT G.R. (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 11, 1-7.
- DE LOOF A., DE CLERCK D. (1986) Vertebrate type steroids in arthropods: identification, concentration and possible function. *In* Advances in Invertebrate Reproduction. M. Porchet, J.-C. Andries and A. Dhainaut (ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 117-123.
- ENGLARD S., SIEGEL L. (1968) Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *In* Methods in Enzymology. J.M. Lowenstein (ed.), Academic Press, New York, 13, pp. 99-106.
- HSU R.Y., LARDY H.A. (1969) Pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 242(3), 520-526.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDAL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MECHOULAM R., BRUEGGEMEIER R.W., DENLINGER D.L. (1984) Estrogens in insects. *Experientia*, 40, 942-944.
- MUNRO H.N., FLECK A. (1966) The determination of nucleic acids. *In* Methods of Biochemical Analysis. D. Gluck (ed.), Interscience Publishers, New York, 14, pp. 113-176.
- MURPHY G., WALKER D.G. (1974) Enzyme synthesis in the regulation of hepatic 'malic' enzyme activity. *Biochem. J.*, 144, 149-160.

- OGISO M., OHNISHI E. (1986) Does estradiol play a role in ovarian maturation or embryonic development of the silkworm? *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61, 82-86.
- OHNISHI E., OGISO M., WAKABAYASHI K., FUJIMOTO Y., IKEKAWA N. (1985) Identification of estradiol in ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60, 35-38.
- ROY A.K., CHATTERJEE B. (1983) Sexual dimorphism in liver. *Ann. Rev. Physiol.*, 45, 37-50.

LE CORPS ADIPEUX : ORGANE CIBLE PROBABLE DE L'ŒSTROGENE CHEZ *BOMBYX MORI* L.

S. DAS* & A.K. RAY

Department of Animal Physiology, Bose Institute, P 1/12 CIT Scheme VII M, Calcutta 700 054, Inde.

*Le corps adipeux de chrysalides mâles et femelles du ver à soie (*Bombyx mori* L.) réagit à l'injection de diverses doses d'œstrogène (E₂) administrées au cours du stade larvaire par une augmentation des teneurs en protéines et en ARN par rapport aux valeurs correspondantes chez les témoins. La teneur en protéines de l'hémolymphe des chrysalides mâles et femelles augmente également après administration d'E₂. L'activité des enzymes lipogènes (NAD-malate déshydrogénase mitochondriale et NADP-malate déshydrogénase cytosolique) dans le corps adipeux des chrysalides mâles et femelles augmente en fonction de la dose d'E₂ administrée. L'utilisation concomitante du tamoxifène neutralise l'augmentation de l'activité NAD-malate déshydrogénase induite par l'E₂ dans le corps adipeux des chrysalides mâles et femelles mais a un effet agoniste de l'E₂ pour ce qui concerne l'activité NADP-malate déshydrogénase dans ce même organe chez les insectes des deux sexes. Bien que la nature (physiologique ou pharmacologique) des doses d'E₂ utilisées dans ces expériences n'ait pas été définie, l'accumulation de protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe ainsi que la stimulation de la lipogenèse dans le corps adipeux des chrysalides mâles et femelles indiquent que l'E₂ joue probablement un rôle dans la synthèse des lipoprotéines (lipovitellines) dans cet organe, comme dans le foie des vertébrés ovipares : ce qui tend à prouver que le corps adipeux serait un organe cible de cette hormone (E₂).*

INTRODUCTION

Chez les vertébrés ovipares, l'œstrogène joue un rôle important dans l'induction de la synthèse de la vitellogénine (précurseur protéique du vitellus) dans le foie, la vitellogénine est ensuite libérée dans le plasma et absorbée par les ovocytes matures (Bergink et coll., 1974). Chez les insectes, y compris le ver à soie (*Bombyx mori* L.), les composés œstrogènes ont été détectés dans les ovaires (Mechoulam et coll., 1983 ; Ohnishi et coll., 1985). Ogiso et Ohnishi (1986) ont observé que l'E₂ n'avait pas d'effet sur le développement des ovaires de vers à soie prélevés dans l'abdomen au stade nymphal. Les divers organes neuroendocriniens sont impliqués dans les processus de reproduction chez cet insecte. On ne peut donc pas écarter l'éventualité de l'implication de l'œstrogène dans la reproduction chez les papillons.

Compte tenu du manque de connaissances sur la signification physiologique de la présence d'œstrogène chez *Bombyx mori* et, en particulier, sur son rôle éventuel dans les processus de reproduction, cette étude a été réalisée afin d'observer les réactions du corps adipeux de cet insecte à de l'œstrogène exogène.

MATERIELS ET METHODES

Des larves de *Bombyx mori* L. (race Nistari) ont été élevées sur des feuilles de mûrier fraîches à 25 ± 1 °C sous une photopériode 12 h/12 h. Des larves au deuxième jour du cinquième âge ont été choisies pour cette expérience. Un même individu a reçu deux injections (au deuxième et au cinquième

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

jour du cinquième âge) contenant des doses différentes (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 et 6,0 µg/g de corps) d'estradiol-17β (E₂, Sigma Chemical, USA) dans la deuxième patte abdominale. Les animaux témoins ont reçu des injections contenant des volumes identiques de vecteur (huile d'arachide). Le volume injecté ne dépasse pas 5 µl dans tous les cas. Les vers à soie ont été sacrifiés au troisième jour du stade nymphal. L'hémolymph a été prélevée dans les chrysalides en perçant la bordure anale des ailes et en exerçant une légère pression sur l'abdomen. L'hémolymph a été centrifugée à 4 000 tours/minute pour éliminer les cellules. Le corps adipeux des chrysalides a été prélevé chirurgicalement à froid et rincé dans une solution saline à 0,65% pour écarter les risques de contamination par l'hémolymph : il a ensuite été broyé dans une solution de saccharose de 0,25 M avec un piston en Téflon dans un broyeur en verre. Les débris cellulaires et les noyaux ont été séparés par centrifugation à 1 000 × g pendant 5 minutes. Le surnageant a été fractionné après centrifugation à 16 000 × g pendant 20 minutes pour prélever le culot mitochondrial. La fraction restante a été centrifugée à 105 000 × g pendant 1 heure pour obtenir le cytosol. La totalité des manipulations a été réalisée à 4 °C.

Les protéines et les acides nucléiques ont été isolés à partir d'un broyat de corps adipeux à 5 % en suivant principalement le protocole de Schmidt-Thannhauser décrit par Munro et Fleck (1966) modifié par Abalain et coll. (1980). La teneur en protéines a été déterminée suivant la méthode de Lowry et coll. (1951). La teneur en acides nucléiques a été mesurée en déterminant la densité optique à 260 nm en utilisant de l'ADN de thymus de veau et de l'ARN de levure comme standards (Abalain et coll., 1980) avec un spectrophotomètre Beckman modèle 24.

L'activité de la NAD-malate déshydrogénase mitochondriale (E.C.1.1.1.37) a été déterminée selon la méthode d'Englard et Siegel (1969) en utilisant un mélange réactif contenant un tampon 0,3 mM NAD, 1,93 mM acide L-malique et 16,12 mM glycine-NaOH, pH 10,0. L'activité enzymatique a été mesurée avec un spectrophotomètre Beckman modèle 24 à 340 nm comme fonction de la réduction de la NAD et exprimée en Δ OD/minute/mg de protéines. La NADP-malate déshydrogénase (E.C.1.1.1.40) a été dosée suivant la méthode de Hsu et Lardy (1969) modifiée par Murphy et Walker (1974) en utilisant un mélange réactif contenant un tampon 0,5 mM NADP, 2,5 mM acide L-malique, 0,2 mM MnCl₂ et 48 mM triéthanolamine, pH 8,0. Le taux de réduction de la NADP a été mesuré à 340 nm et l'activité spécifique est exprimée en Δ OD/minute/mg protéines.

Les données présentées ici correspondent à la moyenne ± l'écart type de 15 observations dans chaque groupe. L'analyse statistique a été réalisée selon le test « t » de Student avec un seuil de signification à $p < 0,05$.

RESULTATS

1. Modifications des teneurs en protéines et en acides nucléiques dans le corps adipeux et de la teneur en protéines dans l'hémolymph :

L'injection de doses différentes d'E₂ à 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 et 4,0 µg/g entraîne une augmentation des teneurs en protéines et en ARN dans le corps adipeux des chrysalides mâles par rapport aux témoins (Tableau I). L'expression de la dose-réponse pour la teneur en protéines en fonction de la dose d'E₂ administrée va de 0,5 ou 1,0 à 1,5 µg/g ($p < 0,001$) et de 1,0 à 2,0 µg/g ($p < 0,001$). La variation des teneurs en ARN s'obtient pour les doses entre 0,5 et 1,5 µg/g ($p < 0,001$), et entre 1,0 ou 1,5 et 2,0 µg/g ($p < 0,001$ et $p < 0,02$) chez les chrysalides mâles.

Chez les vers à soie femelles, on observe une augmentation statistiquement significative des teneurs en protéines et en ARN dans le corps adipeux avec 1,0 et 2,0 µg/g d'E₂. Les teneurs en protéines et en ARN présentent des augmentations pour les doses administrées entre 0,5 et 1,0 µg/g ($p < 0,001$). L'effet de l'E₂ est maximal sur ces composants cellulaires à la dose de 1 µg/g. Une dose élevée (4 µg/g d'E₂) n'entraîne aucune modification des teneurs en protéines et en ARN dans le corps adipeux des femelles par rapport aux témoins.

Chez les mâles et les femelles témoins, on observe des variations significatives des teneurs en protéines ($p < 0,01$) et en ARN ($p < 0,001$) mais aucune modification n'apparaît après administration d'estradiol-17β.

Chez les chrysalides mâles et femelles, la teneur en protéines dans l'hémolymph augmente par rapport au témoin après injection de 1,5 et 2,0 µg/g d'E₂. Les doses de 0,5 et 1,0 µg/g d'hormones,

qui sont faibles, n'ont pas d'effet. La dose maximale de 4,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂ n'entraîne pas non plus de réaction.

2. Variations de la NAD-malate déshydrogénase mitochondriale dans le corps adipeux :

L'injection de différentes doses (0,5, 1,0 et 2,0 $\mu\text{g/g}$) d'E₂ entraîne une augmentation dose-dépendante ($p < 0,01$) de l'activité NAD-malate déshydrogénase mitochondriale dans le corps adipeux des chrysalides mâles âgées de trois jours (Fig. 1). Des doses supérieures (3,0 et 6,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂) donnent la même amplitude d'augmentation de l'activité enzymatique que celle observée avec l'administration de 2,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂. Il est intéressant de noter que les chrysalides femelles présentent une variation de réaction à l'activité de cette enzyme seulement si l'hormone est administrée à 2,0, 3,0 et 6,0 $\mu\text{g/g}$. La différence de l'amplitude d'augmentation de l'activité enzymatique dans le corps adipeux des chrysalides femelles est statistiquement significative uniquement après administration de 2,0 à 3,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂.

3. Modifications de la NADP-malate déshydrogénase cytosolique dans le corps adipeux :

On observe une stimulation ($p < 0,02$ à $p < 0,001$) de l'activité NADP-malate déshydrogénase cytosolique dans le corps adipeux des chrysalides mâles après administration de différentes doses d'E₂ (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 6,0 $\mu\text{g/g}$) (Fig. 2). La relation dose-réponse de l'activité enzymatique apparaît aux doses de 0,25 à 0,5 ($p < 0,01$) et de 0,5 à 2,0 $\mu\text{g/g}$ ($p < 0,01$) d'E₂ chez ces animaux. Les doses plus élevées (3,0 et 6,0 $\mu\text{g/g}$) d'E₂ donnent une amplitude d'augmentation de l'activité enzymatique similaire à celle obtenue avec la dose de 2,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂. Le corps adipeux des chrysalides femelles réagit à l'E₂ par une augmentation statistiquement significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique uniquement pour les doses de 2,0, 3,0 et 6,0 $\mu\text{g/g}$. On obtient une augmentation liée à la dose ($p < 0,001$) de l'activité malate déshydrogénase cytosolique uniquement pour les doses de 2,0 et 3,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂. Des doses plus faibles de 0,25, 0,5 et 1,0 $\mu\text{g/g}$ d'E₂ ne provoquent pas de modifications de l'activité enzymatique dans le corps adipeux des chrysalides femelles par rapport aux valeurs obtenues chez les témoins.

4. Effet du tamoxifène sur les activités NAD- et NADP- malate :

L'augmentation induite par E₂ de l'activité enzymatique (NAD-malate déshydrogénase) est neutralisée par l'injection concomitante de tamoxifène (1,0 $\mu\text{g/g}$), composé anti-œstrogène de l'E₂ (2,0 $\mu\text{g/g}$). Cette neutralisation est observée dans le corps adipeux des chrysalides mâles et femelles (Fig. 3).

Pour ce qui concerne l'activité NADP-malate déshydrogénase dans le corps adipeux, le tamoxifène a une action agoniste de l'œstrogène qui se traduit par une augmentation de l'activité enzymatique lorsqu'il est administré seul à la dose de 1,0 $\mu\text{g/g}$ ($p < 0,01$). Néanmoins, le tamoxifène à 1,0 $\mu\text{g/g}$ appliqué avec l'E₂ (2,0 $\mu\text{g/g}$) n'a pas d'action neutralisante sur l'effet de l'E₂, comme le montre l'amplitude d'augmentation de l'activité NADP-malate déshydrogénase qui est identique chez les chrysalides mâles femelles (Fig. 4).

DISCUSSION

Le corps adipeux du ver à soie ayant pour fonction de produire les protéines de vitellogénine (Bradley, 1983), nous avons choisi cet organe afin d'examiner sa sensibilité à l'œstrogène exogène. L'augmentation significative des teneurs en protéines et en ARN après injection de doses différentes d'E₂ sur des chrysalides mâles et femelles ainsi que la teneur élevée en protéines dans l'hémolymphe après injection d'E₂ (1,5 et 2,0 $\mu\text{g/g}$) dénotent une synthèse accélérée ou bien une diminution de la dégradation des matériaux protéiques et ARN dans le corps adipeux, la libération et l'accumulation consécutives d'une ou plusieurs protéines dans l'hémolymphe. Les chrysalides femelles semblent moins sensibles à l'E₂ que les mâles, car la dose de 0,5 $\mu\text{g/g}$ ne modifie pas les teneurs en protéines et en ARN dans leur corps adipeux. Cette différence de sensibilité relative peut être due à une adaptation pendant l'exposition du corps adipeux femelle à l'œstrogène exogène au cours de son développement. Le fait que l'augmentation des teneurs en protéines et en ARN du corps adipeux des chrysalides mâles soit inférieure après administration d'une dose de 4,0 $\mu\text{g/g}$ à celle obtenue avec

d'autres doses d'E₂ (par exemple 1,5 et 2,0 µg/g) et l'absence totale de réaction après injection de 4,0 µg/g d'E₂₁ chez les vers à soie femelles pourraient être dus à la nature réfractaire de cet organe à l'E₂ du fait des événements de désensibilisation des récepteurs d'E₂ à des concentrations hormonales très élevées. L'expérience décrite ici fait apparaître une accumulation induite par l'E₂ de protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe. L'E₂ provoquant la synthèse des protéines de vitellogénine dans le foie des vertébrés ovipares (Bradley, 1983), il est possible que l'E₂ induise la formation de vitellogénine également chez les chrysalides de vers à soie. Il sera essentiel de procéder à des études complémentaires visant à rechercher les interactions entre récepteurs et E₂ dans la synthèse des protéines de vitellogénines spécifiques chez le ver à soie pour établir le rôle de l'E₂ dans la reproduction de cet insecte.

Afin de déterminer la spécificité de l'action de l'œstrogène dans le corps adipeux des larves de vers à soie, nous avons utilisé le tamoxifène (un composé potentiellement anti-œstrogène) et l'œstrogène simultanément. La neutralisation de l'effet de l'E₂ sur l'activité NAD-malate déshydrogénase par le tamoxifène chez les chrysalides mâles et femelles indique clairement que l'E₂ a un effet spécifique sur cette enzyme.

Cependant, le tamoxifène n'a pas d'action neutralisante de l'effet de l'E₂ sur l'activité NADP-malate déshydrogénase. En outre, le tamoxifène semble agir comme un analogue de l'E₂ sur l'activité de cette enzyme chez les chrysalides mâles et femelles lorsqu'il est utilisé seul. Ce comportement à la fois agoniste et antagoniste du tamoxifène est fonction des espèces animales, des organes et de certains paramètres à prendre en compte (Capony et Williams, 1981 ; Blue et Williams, 1981). Des études complémentaires utilisant d'autres variétés de composés anti-œstrogènes sont en cours.

Bien que nous n'ayons pas encore identifié la ou les protéines qui subissent une augmentation d'accumulation dans le corps adipeux et l'hémolymphe en réaction à l'œstrogène, la stimulation concomitante de la lipogenèse par l'E₂ dans le corps adipeux plaide pour la formation de lipoprotéines dans cet organe. Les doses d'E₂ (0,25 à 6,0 µg/g) que nous avons utilisées dans notre expérience sont probablement beaucoup plus élevées que celles qui se trouvent dans l'hémolymphe de *Locusta* (20 pg/ml, De Loof et De Clerck, 1986) et dans les ovaires de vers à soie (176 pg/g, Ohnishi et coll., 1985). Nous ignorons dans quelle proportion l'E₂ injecté est transporté vers cet organe pour provoquer une telle réaction. D'autres études sur les concentrations en E₂ dans l'hémolymphe et dans le corps adipeux après administration de doses élevées à différents moments (jours) permettront de déterminer si les doses d'E₂ sont de nature physiologique ou pharmacologique. Comme nous l'avons indiqué ici, la mise en évidence du rôle dans la reproduction, lié aux protéines de vitellogénine, joué par l'E₂ permettra d'ouvrir de nouvelles voies dans la manipulation des processus de reproduction chez *Bombyx mori*.

ECONOMICS OF MULBERRY CULTIVATION AND SILKWORM REARING

G. SRINIVASA, P. KUMARESAN & M.N.S. IYENGAR

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

It is necessary to note that sustainability of the sericulture sector depends on the economic viability of the industry. Hence, an attempt is made to study the economic viability of the sericulture enterprise in Karnataka State. The data were collected through random sampling method from 60 sericulturists spread over six villages in Kolar district of Karnataka and analyzed using the project appraisal techniques considering time value of money. The results indicated that the establishment cost of mulberry gardens was Rs. 6,480.00 per ha and that of rearing assets was Rs. 29,557.50. The net present value at the discount rate of 12.00 per cent was found to be Rs. 70,940.08. The internal rate of return was 35.02 per cent and the benefit-cost ratio was worked out to be 2.82 at the discount rate of 12.00 per cent. From the study, it can be concluded that the investment on silkworm rearing is highly lucrative and economically viable, in spite of the risk of fluctuations in labour wages, cocoon yield and cocoon price.

Keywords: Pay-back period, net present value, internal rate of return, benefit-cost ratio, discount rate.

INTRODUCTION

India is the second largest producer of silk in the world next only to China with vast potentialities for expansion. Sericulture, which involves growing of mulberry and rearing of silkworms, provides employment for about one million families in India. In Karnataka, which accounts for about 55 per cent of the silk produced in the country, sericulture is practised as a traditional rural industry. Considering the potentiality of this industry, a sum of Rs. 8 607.60 million has been allotted in the Eighth Five-Year Plan (1992-'93 to 1996-'97) for the development of sericulture. However, it is necessary to note that sustainability of the sericulture sector depends on the economic viability of the industry. Hence, an attempt is made in this paper to study the profitability of mulberry cultivation and silkworm rearing in Karnataka State.

MATERIALS AND METHODS

Kolar district was purposely selected for the study, as it is a traditional and the largest mulberry growing district in Karnataka. In this district, six villages were randomly selected from Sidlagatta Taluk and ten commercial crossbreed silkworm cocoon producers in irrigated conditions from each village were interviewed at random to collect the required information. The data collected pertained to the year 1991-'92. The cost and return data for different age groups ranging from below one year to 15 years were collected and compiled.

Since mulberry, the food plant for silkworms, is a perennial crop, the following techniques were used for evaluating the economic viability of the investments considering the time value of money.

(i) Pay-back period:

The pay-back period is the period necessary to recover the cash outlay invested in a project. This concept is very useful when liquidity is an important consideration, but the major limitation of this method is ignoring the profits accrued after the pay-back period and the time value of money.

(ii) Benefit-cost ratio (B:C ratio):

The benefit-cost ratio is the ratio between the present value of the cash outflow and present value of cash inflow of an investment at a required rate of return.

$$\text{B:C ratio} = \frac{\sum_{t=1}^n R_t / (1+i)^t}{\sum_{t=1}^n C_t / (1+i)^t}$$

where,

R_t = Cash inflow in the year t

C_t = Cash outflow in the year t

i = Discount rate and

n = Project life period

(iii) Net present value (NPV):

The net present value is calculated as the present value of the benefits obtained from the project less the present value of the costs incurred in the project at a desired rate of return.

$$\text{NPV} = \frac{R_t - C_t}{1 + i}$$

where,

R_t = Cash inflow in the year t

C_t = Cash outflow in the year t

i = Discount rate and

n = Project life period

(iv) Internal rate of return (IRR):

The internal rate of return is the rate of return at which the present value of cash inflow is equated with the present value of cash outflow of an investment. At this rate, the NPV of an investment is zero.

While working out the economics of mulberry cultivation and silkworm rearing, the economic age of the mulberry garden was assumed to be 15 years. Establishment of the mulberry garden and rearing assets were considered as initial investment and accounted in the first year. Disease-free laying (dfl) costs, rearing chemical costs, labour costs, chemical fertilizer and manure costs, plant protection costs, irrigation costs, land revenue and marketing and transportation costs were considered as annual cash outflows and the returns from the sale of cocoons and by-products were included in cash inflows. The data regarding costs have a downward bias, as the initial investment is not taken into account.

RESULTS AND DISCUSSION

The agewise costs and returns of mulberry cultivation and silkworm rearing are given in Table I. Establishment costs include those operations such as land preparation, preplanting application of manures and fertilizers, planting, etc., conducted once and for all during the production period. The

Table I. Cash flow statement for mulberry cultivation and silkworm rearing (Rs./acre).**Tableau I. Marge brute d'autofinancement pour la culture du mûrier et l'élevage des vers à soie (Rs./acre).**

Particulars Données	Years / Années					
	I	II	III	IV	V	VI
Cash outflow / Dépenses						
Establishment of mulberry garden <i>Etablissement de la mûraie</i>	6480.00					
Rearing assets cost <i>Coût des actifs d'élevage</i>	29557.50					
Mulberry labour cost <i>Coût main-d'œuvre mûrier</i>	680.05 (14.07)	823.33 (11.39)	993.33 (13.46)	924.00 (12.27)	754.00 (9.89)	852.00 (9.94)
Chemical fertilisers and manure <i>Engrais chimiques et fumure</i>	380.00 (7.86)	300.00 (4.15)	344.44 (4.67)	394.33 (5.24)	304.67 (4.00)	324.33 (3.79)
Mulberry chemicals cost <i>Coût produits chimiques mûrier</i>	119.95 (2.48)	275.00 (3.82)	141.56 (1.92)	155.20 (2.06)	67.33 (0.88)	109.33 (1.28)
Irrigation cost <i>Coûts d'irrigation</i>	440.03 (9.11)	550.00 (7.61)	600.00 (8.13)	331.60 (4.40)	283.33 (3.72)	534.00 (6.23)
Land revenue <i>Location de la terre</i>	45.00 (0.93)	45.00 (0.62)	45.00 (0.61)	45.00 (0.60)	45.00 (0.59)	45.00 (0.53)
Dfl cost <i>Coût des pontes</i>	300.00 (6.20)	775.00 (10.72)	816.67 (11.07)	1054.67 (14.01)	1443.33 (18.94)	1297.08 (15.14)
Rearing chemical costs <i>Coût produits chimiques élevage</i>	178.00 (3.68)	365.00 (5.05)	468.50 (6.35)	413.85 (5.50)	391.07 (5.13)	591.17 (6.90)
Rearing labour cost <i>Coût main-d'œuvre élevage</i>	2199.97 (45.53)	3480.00 (48.16)	3235.56 (43.84)	3368.40 (44.73)	3457.33 (45.37)	
Cocoon transport and marketing cost <i>Coût transport et vente cocons</i>	489.00 (10.12)	612.80 (8.48)	735.45 (9.96)	843.30 (11.20)	873.65 (11.47)	885.35 (10.33)
Initial investment / <i>Apport initial</i>	36037.50					
Total working costs <i>Coûts totaux de fonctionnement</i>	4832.00	7226.13	7380.51	7530.35	7619.72	8567.60
Cash inflow / Produits						
Cocoon production (kg) <i>Production de cocon (kg)</i>	44.05	96.88	98.76	119.98	161.52	162.77
Return from sale of cocoons* <i>Recettes sur vente cocons*</i>	6000.00	13195.00	13451.70	16341.28	21999.04	22169.65
Return from sale of by-products <i>Recettes sur vente produits dérivés</i>	400.00	643.75	959.26	913.20	837.80	720.47
Gross income / <i>Revenu brut</i>	6400.00	13838.75	14410.96	17254.48	22836.84	22890.12
Net income** / <i>Revenu net**</i>	-34469.50	6612.62	7030.46	9724.13	15217.12	14322.52

Figures in parentheses indicate percentage to total working costs. By-products include twigs and manure.

Les chiffres entre parenthèses donnent le pourcentage par rapport aux coûts totaux de fonctionnement. Les produits dérivés comprennent les rameaux et la fumure.

* at the rate of cocoon price Rs. 136.20/kg / au prix de Rs 136.20/kg.

** Net cash flow / Marge nette d'autofinancement.

Table I. Continued.

Tableau I. Suite

Years / Années									Average Moyenne
VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	
937.73	806.91	889.20	722.38	719.63	776.94	616.46	692.00	728.00	
(10.07)	(8.17)	(8.39)	(6.99)	(6.81)	(6.69)	(5.42)	(6.60)	(6.71)	(9.17)
303.67	326.05	512.00	305.39	201.67	291.67	229.69	150.45	200.00	
(3.49)	(3.30)	(4.83)	(2.96)	(1.19)	(2.51)	(2.02)	(1.43)	(1.84)	(3.60)
93.17	160.20	190.00	68.77	65.93	87.64	37.95	52.27	160.00	
(1.07)	(1.62)	(1.79)	(0.67)	(0.62)	(0.76)	(0.33)	(0.50)	(1.47)	(1.42)
348.00	182.26	390.00	293.50	170.83	460.56	190.97	300.00	420.00	
(4.00)	(1.84)	(3.68)	(2.84)	(1.62)	(3.97)	(1.68)	(2.86)	(3.87)	(4.37)
45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00		
(0.52)	(0.46)	(0.42)	(0.44)	(0.43)	(0.39)	(0.40)	(0.43)	(0.41)	(0.52)
1280.00	1846.03	1984.00	2101.43	2233.33	2541.67	2637.50	2071.82	1960.00	
(14.72)	(18.68)	(18.72)	(20.34)	(21.17)	(21.90)	(23.17)	(19.75)	(18.07)	(16.84)
485.80	520.65	540.76	535.06	578.50	546.33	526.41	503.25	576.00	
(5.59)	(5.27)	(5.10)	(5.18)	(5.48)	(4.71)	(4.63)	(4.80)	(5.31)	(5.24)
4296.00	5035.97	5120.80	5268.90	5553.33	5846.67	5998.75	5662.27	5760.00	
(49.42)	(50.97)	(48.31)	(51.01)	(52.56)	(50.37)	(52.71)	(53.99)	(53.90)	(49.06)
903.85	958.15	927.25	989.00	997.65	1010.25	1098.50	1011.25	1000.55	
(10.40)	(9.70)	(8.75)	(9.57)	(9.44)	(8.70)	(9.65)	(9.64)	(9.22)	(9.78)
8693.22	9881.22	10599.01	10329.43	10565.87	11606.72	11381.23	10488.32	10849.55	
198.06	205.97	224.80	277.37	266.76	297.31	332.51	316.16	272.69	
26975.60	28053.48	30617.92	37777.33	36333.33	40493.33	45288.13	43061.59	37140.00	
1309.80	1590.49	1180.16	1141.35	848.06	1770.93	1250.70	1151.50	2160.00	
28285.40	29643.97	31798.08	38918.68	37181.39	42264.26	46538.83	44213.09	39300.00	
19592.18	19762.75	21199.07	28589.26	26615.52	30657.54	35157.40	33724.77	28450.45	

establishment cost of a mulberry garden was Rs. 6,480.00 and the cost of rearing assets was Rs. 29,557.50.

Among annual expenditures, labour costs, including silkworm rearing and mulberry cultivation, constituted around 58.23 per cent, which supports the fact that silkworm rearing is a labour-intensive activity. Hence, if there is a small change in the wage structure, the profitability of the investment is affected very much. Next to labour, among the cost components, silkworm seed costs (dfls costs) and marketing and transportation costs shared around 16.84 per cent and 9.78 per cent, respectively. The remaining costs were relatively small in composition and their contribution was less than 15 per cent in total. The returns are obtained from the sale of cocoons as well as from the sale of by-products.

In the first year, the investment gave a negative net return (Rs. 34,469.50) because there was a huge investment spent on establishment of mulberry garden and rearing assets. But from the second year onwards, the profit increased steadily and touched the peak (Rs. 35,157.60) in the thirteenth year and again started declining.

For studying the economic viability of silkworm rearing, pay-back period, net present value, internal rate of return and benefit-cost ratio were worked out and the results are presented in Table II.

Table II. Measures of investment on profitability of mulberry cultivation and silkworm rearing.

Tableau II. Calcul des investissements en fonction de la rentabilité de la culture du mûrier et l'élevage du ver à soie.

Criteria Critères	Discount rate Taux d'escompte	
Pay-back period / Période de recouvrement		3 years 1 month / 3 ans 1 mois
Net present value / Valeur actuelle nette	12%	Rs. 70,940.08
Internal rate of return / Taux interne de profit		35.02%
Benefit-cost ratio / Taux de rentabilité	12%	2.82

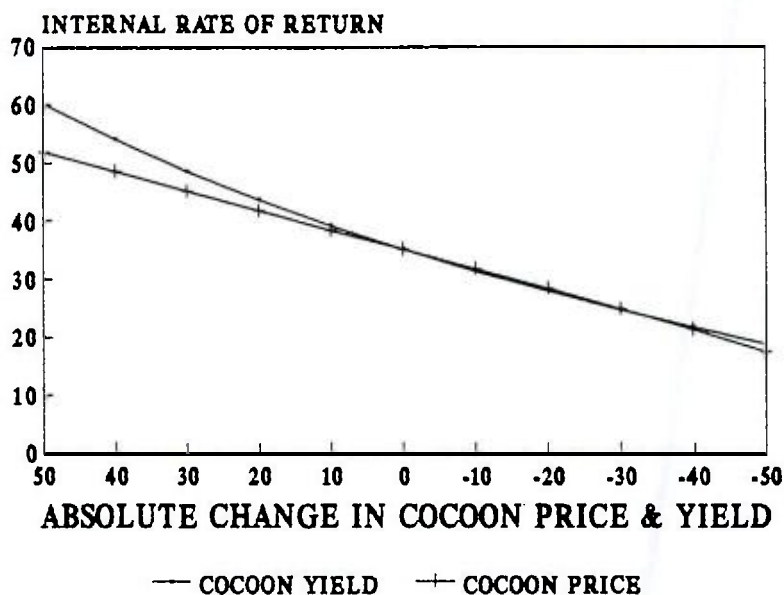
Since the net present value and benefit-cost ratio are the functions of their discount rate, these measures were obtained at the rate of 12 per cent, which is the commercial banks' lending rate of interest. Table II also shows that the pay-back period from the sampled silkworm units was three years and one month. The net present value at the discount rate of 12 per cent was Rs. 70,940.08. The internal rate of return was 35.02 per cent and the benefit-cost ratio was also very high with 2.82.

The sensitivity analysis was carried out by computing the changes in IRR for absolute changes in price and yield levels keeping other variables constant to know the effect of fluctuations in cocoons price and yield on the profitability. The results are presented in Fig. 1. It clearly indicates that any fluctuation in either the cocoon yield or cocoon price would affect the profitability of the project considerably.

On the basis of these investment criteria and sensitivity analyses, the results indicate that the investment on mulberry cultivation and silkworm rearing is very lucrative and economically viable even though profitability depends on the fluctuations in labour wages, cocoon yield and cocoon price.

Fig. 1: Effect of fluctuations of cocoon prices and cocoon yield on the internal rate of return.

Fig. 1 : Effet des fluctuations des prix et du rendement en cocons sur le taux interne de profit.



SUMMARY AND CONCLUSIONS

The primary objective of this paper was to study the economic viability of the sericulture enterprise in Karnataka State. The data were collected through random sampling method from 60 sericulturists spread over six villages in Kolar district of Karnataka and analyzed using project appraisal techniques considering the time value of money.

The results showed that the establishment cost of mulberry gardens was Rs. 6,480.00 and that of rearing assets was Rs. 29,557.50. The net present value at the discount rate of 12.00 per cent was found to be Rs. 70,940.08. The internal rate of return was 35.02 per cent and the benefit-cost ratio was worked out to be 2.82 at the discount rate of 12.00 per cent. From the study, it can be concluded that the investment on silkworm rearing is highly lucrative and economically viable in spite of the risk in fluctuations in labour wages, cocoon yield and cocoon price.

REFERENCE

GITTINGER J.D. (1972) Economic Analysis of Agricultural Projects. II. John Hopkins University, Baltimore.

RENTABILITE DE LA CULTURE DU MURIER ET DE L'ELEVAGE DU VER A SOIE

G. SRINIVASA, P. KUMARESAN & M.N.S. IVENGAR

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

La viabilité du secteur séricicole dépend de la rentabilité de l'industrie. Une étude a donc été réalisée afin de déterminer la rentabilité de l'industrie séricicole dans l'Etat du Karnataka. Les données ont été collectées par échantillonnage aléatoire chez 60 sériciculteurs répartis dans six villages du district de Kolar (Karnataka) et analysées selon les techniques d'évaluation des projets en tenant compte de la valeur temps de l'argent. Les résultats indiquent que le coût d'établissement d'une plantation de mûrier est de 6 480,00 roupies par hectare et celui des actifs d'élevages de 29 557,50 roupies par hectare. La valeur actuelle nette est de 35,02 % et l'indice de rentabilité est de 2,82 pour un taux d'escompte de 12,00 %. Cette étude permet de conclure que l'investissement dans l'élevage du ver à soie est fortement lucratif et économiquement viable, en dépit des risques de fluctuations des salaires, du rendement et du prix des cocons.

INTRODUCTION

L'Inde est le deuxième producteur mondial de soie derrière la Chine et dispose d'un vaste potentiel d'expansion. La sériciculture, qui comprend la culture du mûrier et l'élevage du ver à soie, fournit de l'emploi pour environ un million de familles en Inde. Dans le Karnataka, dont la production représente environ 55 % de la soie produite dans le pays, la sériciculture est une industrie rurale traditionnelle. Compte tenu du potentiel de cette industrie, un budget de 8 607,60 millions de roupies a été attribué, dans le cadre du huitième plan quinquennal (1992-1993 à 1996-97), au développement de la sériciculture. Cependant, il convient de noter que la viabilité du secteur économique est fonction de la rentabilité de l'industrie. Cette étude a donc été entreprise afin de déterminer la rentabilité de la culture du mûrier et de l'élevage du ver à soie dans l'Etat du Karnataka.

MATERIELS ET METHODES

On a choisi le district de Kolar pour cette étude car c'est une région à tradition séricicole et le plus grand district de culture du mûrier de l'Etat du Karnataka. Six villages de ce district ont été sélectionnés au hasard dans Sidlagatta taluk et on a interrogé dix producteurs de cocons de vers à soie hybrides en terrain irrigué dans chacun des villages afin de réunir les informations recherchées. Les données collectées concernent l'année 1991-1992. Les données portant sur les coûts et les bénéfices pour différents groupes d'âge de 1 à 15 ans ont été réunies et analysées.

Le mûrier, seule nourriture du ver à soie, étant une culture pérenne, les techniques suivantes ont été utilisées pour évaluer la rentabilité des investissements en tenant compte de la valeur temps de l'argent.

1) Période de recouvrement :

La période de recouvrement est le laps de temps nécessaire pour recouvrer les débours investis dans un projet. Ce concept est très utile lorsque la liquidité est un aspect important mais la limitation principale de cette méthode est qu'elle ne tient pas compte des bénéfices dérivés après la période de recouvrement et de la valeur temps de l'argent.

2) Indice de rentabilité :

L'indice de rentabilité est le rapport de la valeur actuelle des charges sur la valeur actuelle des produits d'un investissement pour un taux de profit souhaité.

$$\text{Indice de rentabilité} = \frac{\sum_{t=1}^n R_t / (1 + i)^t}{\sum_{t=1}^n C_t / (1 + i)^t}$$

R_t = charges dans l'année t

C_t = produits dans l'année t

i = taux d'escompte

n = durée de vie du projet

3) Valeur actuelle nette :

La valeur actuelle nette est calculée d'après la valeur actuelle des bénéfices dérivés du projet moins la valeur actuelle des dépenses engagées pour le projet pour un taux de profit souhaité.

$$\text{Valeur actuelle nette} = \frac{R_t - C_t}{1 + i}$$

R_t = Produits dans l'année t

C_t = Charges dans l'année t

i = taux d'escompte

n = durée de vie du projet

4) Taux interne de profit :

Le taux interne de profit est le taux de profit auquel la valeur actuelle des charges égale la valeur actuelle des produits d'un investissement. A ce taux, la valeur actuelle nette d'un investissement est nulle.

Pour l'étude de l'aspect financier de la culture du mûrier et de l'élevage du ver à soie, la rentabilité d'une plantation de mûrier est supposée être de 15 ans. L'investissement initial comprend l'établissement d'une plantation de mûrier et des actifs d'élevage et est comptabilisé dans la première année. Les coûts des pontes saines, des produits chimiques, des salaires, des engrais chimiques, de la fumure, de la protection des plantes, de l'irrigation, de la location de la terre, de la commercialisation et du transport entrent dans les charges annuelles et les bénéfices obtenus par la vente des cocons et des produits dérivés entrent dans les produits. Les données concernant les coûts dessinent une courbe descendante car l'investissement initial n'est pas pris en compte.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les charges et produits annuels de la culture du mûrier et de l'élevage du ver à soie sont présentés dans le tableau I. Les coûts d'établissement comprennent les opérations concernant la préparation de la terre, l'application de fumure et d'engrais avant la plantation, la plantation, etc., réalisées une seule fois pour toute la période de production. Le coût d'établissement de la plantation de mûrier s'élève à 6 480,00 roupies et le coût des actifs d'élevage à 29 557,50 roupies.

Parmi les charges annuelles, le coût des salaires, qui concerne l'élevage du ver à soie et la culture du mûrier, représente environ 58,23 % ; ce qui étaye le fait que l'élevage du ver à soie est une activité demandant une main-d'œuvre importante. Aussi, une variation insignifiante de la structure des salaires affectera-t-elle fortement la rentabilité des investissements. Derrière les salaires viennent le

coût des pontes saines et le coût du transport et de la commercialisation des graines qui entrent pour respectivement 16,84 % et 9,78 % du total. Les autres coûts sont relativement faibles et leur contribution globale ne dépasse pas 15 % du total. Les produits proviennent de la vente des cocons et des produits dérivés.

Dans la première année, on obtient un résultat net négatif (34 469,50 roupies) en raison de l'investissement élevé engagé dans l'établissement de la plantation de mûrier et des actifs d'élevage. Cependant, à partir de la deuxième année, le bénéfice augmente de façon constante et atteint la valeur maximale (35 157,60 roupie) dans la troisième année, puis commence à diminuer.

Pour étudier la rentabilité de l'élevage du ver à soie, on a calculé la période de recouvrement, la valeur actuelle nette, le taux interne de profit et le taux de rentabilité ; les résultats sont présentés dans le tableau II. La valeur actuelle nette et le taux de rentabilité étant fonction de leur taux d'escompte, ces valeurs ont été obtenues au taux de 12 % qui est le taux de crédit fixé par les banques de prêts. Le tableau II montre également que la période de recouvrement des unités séricicoles considérées est de trois ans et un mois. La valeur actuelle nette du taux d'escompte de 12 % est de 70 940,08 roupies. Le taux interne de profit est de 35,02 % et l'indice de rentabilité, également très élevé, de 2,82.

L'analyse de signification a été calculée sur la base des fluctuations du taux interne de profit pour la variation absolue des prix et rendements, les autres variables étant constantes, afin de déterminer l'effet des fluctuations des prix et rendements des cocons sur la rentabilité. Les résultats sont présentés dans la figure 1. Cette figure montre clairement que toute fluctuation, que ce soit du rendement en cocons ou du prix des cocons, affecte fortement la rentabilité du projet.

Sur la base des critères d'investissements et des analyses de signification, les résultats indiquent que l'investissement dans la culture du mûrier et l'élevage du ver à soie est fortement lucratif et économiquement viable bien que la rentabilité soit fonction des fluctuations des salaires, du rendement et du prix des cocons.

RESUME ET CONCLUSIONS

Le but principal de cet article est d'étudier la viabilité économique de l'activité séricicole dans l'Etat du Karnataka. Les données ont été collectées par échantillonnage aléatoire chez 60 sériciculteurs répartis dans six villages du district de Kolar (Etat du Karnataka) et analysées selon les techniques d'évaluation des projets en tenant compte de la valeur temps de l'argent.

Les résultats montrent que le coût d'établissement d'une plantation de mûrier est de 6 480,00 roupies et celui des actifs d'élevage de 29 557,50 roupies. La valeur actuelle nette, pour un taux d'escompte de 12 %, est de 70 940,08 roupies. Le taux interne de profit est de 35,02 % et l'indice de rentabilité de 2,82 pour un taux d'escompte de 12 %. Cette étude montre que l'investissement dans l'élevage du ver à soie est lucratif et économiquement viable en dépit des risques de fluctuation des salaires, du rendement et du prix des cocons.

PATH ANALYSIS FOR LEAF YIELD COMPONENTS IN MULBERRY (*MORUS* SPP.) GROWN UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS

S. MASILAMANI¹, V. THIAGARAJAN², B.N. SUSHEELAMMA³ & R.K. DATTA³

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

2. Regional Sericultural Research Station, Chamarajnagar - 571 313, India.

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

Twelve promising genotypes of mulberry were studied for correlation of possible comparisons of the leaf yield and its components. Phenotypic and genotypic correlation agreed closely in maximum comparison with genotypic coefficients being mostly higher than the phenotypic coefficient. The leaf yield showed a significant positive correlation with the height of the plant, number of leaves, weight of 100 leaves and number of primary branches. The number of nodes per metre length of a branch showed a significant negative correlation with the leaf yield, number of leaves per plant, weight of 100 leaves and number of primary branches per plant. Path coefficient analysis revealed that, among all the characters studied, the height of the plant had the highest direct positive effect on the leaf yield. The number of nodes per metre length of a branch and number of branches per plant had a direct negative effect on the leaf yield per plant. The number of leaves per plant and weight of 100 leaves had little direct contribution to offer but produced a reasonably high indirect effect via the height of the plant and number of nodes per metre length of a branch.

Keywords: Mulberry, leaf yield components, genotypic correlation, phenotypic correlation, path coefficient analysis.

INTRODUCTION

Direct introduction of an improved mulberry variety from one country to the other has not met with success due to non-adaptability and environmental conditions (Tazima, 1958). Hence, considerable interest has been shown in recent years on quantitative and qualitative improvement of mulberry (*Morus* spp.) through breeding.

Evaluation of gene pool for important agronomic traits is a prerequisite for mulberry improvement. A review of literature shows that, although much has been done in mulberry improvement, work on the relation between various plant characteristics is negligible. Das and Krishnaswamy (1969) investigated the interrelations among three characters, i.e., leaf yield, plant height and average number of branches, in 256 mulberry strains and reported that mutual correlation both at the phenotypic and genotypic levels is positive and highly significant. Susheelamma *et al.* (1988, 1989) studied the association of important yield components with the leaf yield under stress and non-stress conditions. The final level of yield, quality and crop performance is often governed by a series of genetic traits and cumulative effect of multiple factors (Dandin and Kumar, 1989). In order to understand the multiple factors controlling and limiting the growth and leaf output of mulberry, genetic traits and their association are to be identified and measured.

In selecting traits, priority of a trait has to be decided depending upon the need for which correlations are helpful in determining the component characters of a complex entity, yet they do not give an exact picture of the relative importance of direct and indirect effects of the various attributes. Path coefficient analysis helps us not only to identify the cause and effect relationship between yield

and characters but also the relative importance of each as they affect the leaf yield both directly and indirectly.

In the present investigation, an attempt has been made to analyse the associations between the leaf yield and its related components in mulberry (*Morus* spp.) by the path coefficient method, originally developed by Wright (1921). A path coefficient is simply a standardised partial regression coefficient and measures the direct influence of one variable upon another and permits separation of the correlation coefficient into components of direct and indirect effects.

MATERIALS AND METHODS

Twelve genotypes of mulberry (Table I) from the germplasm collection of the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, were brought and raised under the pit system with a spacing of 1.20 × 0.9 m in a randomised rod row design with three replications during May 1991 at the Regional Sericultural Research Station, Coonoor (Tamil Nadu). The station is located in the Western Ghats of South India between 11° and 22° north latitude and 76°15' and 77° east longitude at an altitude of 1850 meters above mean sea level. After the establishment of plants, the crown height was fixed at 50 cm. Out of 30 plants in each replication, five plants were randomly selected and tagged for 90 days' (crop duration) growth observation. The observations were made in three seasons, i.e., spring, summer and autumn, for the year 1993-94. A large number of metric traits were recorded in the three replications but correlation and path coefficient analysis was carried out with only those characters which were found to influence the leaf yield mostly, i.e., plant height, number of leaves, weight of 100 leaves, number of nodes per metre length of a branch and number of primary branches (Dandin and Kumar, 1989). The data were averaged to single plant basis for the purpose of statistical analysis.

Phenotypic and genotypic correlation coefficients were worked out on a plant mean basis for all possible comparisons from the variance and covariance components. Genotypic correlation coefficients were partitioned into components of direct and indirect effects by path coefficient analysis, as suggested by Dewey and Lu (1959).

RESULTS AND DISCUSSION

The means of the different agronomic characters associated with the leaf yield are presented in Table I. The correlation coefficients for all possible combinations of the leaf yield studied are presented in Table II. Phenotypic and genotypic correlation agreed closely in maximum comparison with genotypic coefficients being mostly higher than the phenotypic coefficients. The leaf yield per plant showed a significant positive correlation with the height of the plant, weight of 100 leaves, number of leaves per plant and number of primary branches per plant. The height of the plant was also positively correlated with the number of leaves and weight of 100 leaves. The leaf yield advantage of taller plants may be due in part to their having more leaf surface, resulting in greater photosynthetic activity. The correlation between plant height and number of branches (0.210) was relatively low. This was probably due to the crowded conditions and the competition for water and light. There is no assurance that the same associations would hold for more widely spaced plants. The correlation between the number of leaves per plant and number of primary branches and between weight of 100 leaves were found highly significant. The weight of 100 leaves correlated negatively with the number of nodes per metre length of a branch. Since the negative genotypic correlation between weight of 100 leaves and number of branches was found non significant, this may not disturb the selection of any one of these characters in breeding programmes. The correlation between the number of nodes per metre length of a branch and number of primary branches was found negative.

Hence, the trend of correlation in different genotypes indicates that in mulberry the height of the plant, weight of 100 leaves, number of leaves and number of branches were important in the leaf yield. It is apparent that maximum characters are correlated because of a mutual association with other characters.

Table I. Leaf yield and associated characters of 12 mulberry genotypes (mean value).**Tableau I. Rendement en feuilles et caractères associés au rendement de 12 génotypes de mûrier (valeurs moyennes).**

Sl no.	Genotype	Characters					
		Leaf yield (g)	Plant height (cm)	Number of leaves/ plant	Weight of 100 leaves (g)	Number of nodes/m length of a branch	Number of primary branches
N° d'ordre	Génotype	Caractères					
		Rendement en feuilles (g)	Hauteur du plant (cm)	Nombre de feuilles par plant	Poids de 100 feuilles (g)	Nombre de noeuds par mètre	Nombre de ramifications primaires
1	K-2	609.23	191.87	180.77	335.03	17.67	15.37
2	S-13	302.57	166.30	137.93	227.70	25.33	13.50
3	TR-4	987.93	209.73	248.50	407.73	16.33	18.47
4	TR-8	774.00	202.90	239.63	325.33	18.33	22.13
5	TR-10	851.27	213.27	156.47	522.83	18.00	11.50
6	CW	417.00	165.53	166.37	250.20	16.33	17.90
7	EB	505.97	158.57	129.63	390.10	16.67	14.60
8	CP	955.23	199.50	186.40	504.83	15.00	13.97
9	S-34	336.17	183.80	139.67	240.40	26.67	12.43
10	S-1301	510.00	175.00	162.43	314.50	16.67	13.67
11	C-776	490.57	172.47	175.83	279.57	17.33	17.10
12	MS-2	259.77	158.67	114.93	226.70	20.33	11.63

CW: China White; EB: English Black; CP: Cuckpilla.

Since the yield is composed of a number of other simple characters which contribute to it directly as well as indirectly through each other, the study of correlation alone may not give a clear picture of the contribution to yield of its components. The path coefficient analysis provides an effective means of untangling direct and indirect causes of the association and measures the relative importance of each causal factor.

A path diagram (Fig. 1) shows that the leaf yield is in part the result of the plant height, number of leaves, weight of 100 leaves, number of nodes per metre length of a branch, number of branches and a composite variable that includes all other factors affecting the leaf yield in this study. The above 5 factors are themselves interrelated. Consequently, each factor influences the leaf yield by a direct contribution and by acting in combination with the other 4 factors with which it is correlated. The residual variable, $XR = 0.045$, is assumed to be independent, which permits precise explanation about the pattern of interaction of other possible components of the leaf yield.

An example will illustrate the path coefficient method as an aid in analysing correlation coefficients.

Table II. Phenotypic (rp) and genotypic (rg) correlation coefficients among six agronomic characters of mulberry.**Tableau II. Coefficients de corrélation phénotypique (rp) et génotypique (rg) entre six caractères agronomiques du mûrier.**

Correlated characters	Correlation coefficients				
	Leaf yield (g)	Plant height (cm)	Number of leaves/plant	Weight of 100 leaves (g)	Number of nodes/m length of a branch

Caractères corrélés	Coefficients de corrélation				
	Rendement en feuilles (g)	Hauteur du plant (cm)	Nombre de feuilles par plant	Poids de 100 feuilles (g)	Nombre de noeuds par mètre

1. Plant height	rp	0.833			
1. Hauteur du plant	rg	0.886**			
2. Number of leaves/plant	rp	0.765	0.696		
2. Nombre de feuilles/plant	rg	0.753**	0.723**		
3. Weight of 100 leaves	rp	0.868	0.664	0.648	
3. Poids de 100 feuilles	rg	0.862**	0.709**	0.583**	
4. Number of nodes/m length of branch	rp	-0.555	-0.241	-0.493	-0.515
4. Nombre de noeuds/m	rg	-0.634**	-0.255	-0.516**	-0.609**
5. Number of branches/plant	rp	0.367	0.291	0.840	-0.285
5. Nombre de branches/plant	rg	0.332*	0.210	0.896**	-0.396*

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

The correlation coefficient of the plant height with the leaf yield, $r = 0.886$, consists of 5 components, the relative contribution of which can be shown as follows:

Plant height vs. leaf yield	$r = 0.886$
Direct effect	$Px1 \quad y = 0.609$
Indirect effect via number of leaves	$r12 \quad Px2 \quad y = 0.211$
Indirect effect via weight of 100 leaves	$r13 \quad Px3 \quad y = 0.008$
Indirect effect via number of nodes per m length of a branch	$r14 \quad Px4 \quad y = 0.104$
Indirect effect via number of branches	$r15 \quad Px5 \quad y = -0.046$
Total	0.886

With the correlation coefficient partitioned into its components, we realise what contributes to the relationship. The direct effect has more influence on the leaf yield followed by the indirect effect via the number of leaves, number of nodes per metre length of a branch and weight of 100 leaves. The indirect effect via the number of primary branches exerted a negative influence on the leaf yield.

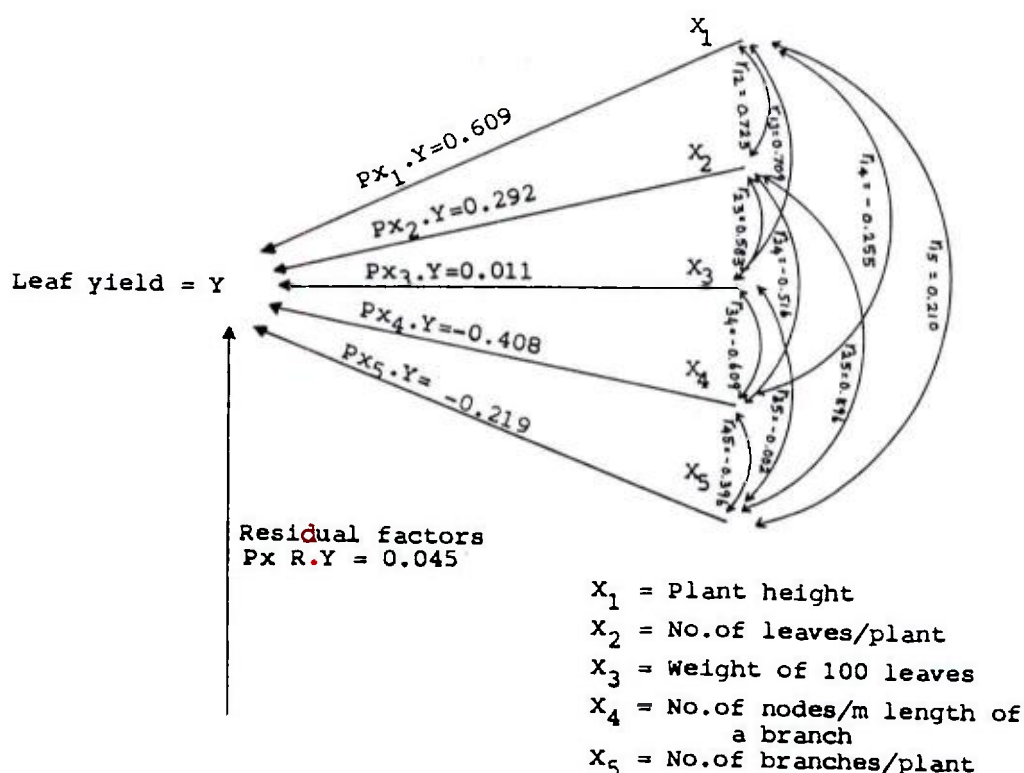


Fig. 1: A diagramme of path coefficients of factors influencing the leaf yield in mulberry.

Fig. 1 : Diagramme des coefficients de trajets des facteurs influençant le rendement en feuilles chez le mûrier.

An examination of the correlation components (Table III) shows that the plant height followed by the number of leaves per plant and weight of 100 leaves were the 3 factors that exerted the greatest influence both directly and indirectly on the leaf yield. However, the number of primary branches had a negative influence on the leaf yield directly, which in turn had more influence on the leaf yield via the number of leaves per plant. The number of nodes per metre length of a branch influenced the leaf yield indirectly via the number of primary branches per plant. The indirect effect of the weight of 100 leaves via the number of primary branches per plant and vice versa was '0.000', which indicated that selection of any one of these characters may not affect the other.

The results obtained in this investigation are in agreement with previous reports on the subject. For example, Das and Krishnaswamy (1989) found that the mutual correlation of three characters, i.e., leaf yield, plant height and number of primary branches per plant, both at the phenotypic and genotypic levels were positive and highly significant, which is in agreement with the present study. Further, the number of nodes per metre length of a branch showed significant negative correlation with the leaf yield, as reported by Sarkar *et al.* (1987). However, the difference in our results on the indirect effect of the weight of 100 leaves via plant height from the previous report (Susheelamma *et al.*, 1988) may be ascribed to the altitudinal change and type of spacing adopted for raising genotypes.

Table III. Path coefficient analysis of genotypic correlations of five agronomic characters with leaf yield in mulberry.*Tableau III. Analyse des coefficients de trajets des corrélations génotypiques de cinq caractères agronomiques avec le rendement en feuilles chez le mûrier.*

Correlated characters	Direct effect and indirect effect via					
	Plant height (cm)	Number of leaves/plant	Weight of 100 leaves (g)	Number of nodes/m length of a branch	Number of branches per plant	Genotypic correlation with yield
<i>Caractères corrélés</i>	<i>Effets direct et indirect par</i>					
	<i>Hauteur du plant (cm)</i>	<i>Nombre de feuilles par plant</i>	<i>Poids de 100 feuilles (g)</i>	<i>Nombre de noeuds par mètre</i>	<i>Nombre de branches par plant</i>	<i>Corrélation génotypique avec le rendement</i>
1. Plant height <i>1. Hauteur du plant</i>	(0.609+)	0.440	0.432	-0.155	0.128	0.886
2. Number of leaves/plant <i>2. Nombre de feuilles/plant</i>	0.211	(0.292)	0.171	-0.151	0.262	0.753
3. Weight of 100 leaves <i>3. Poids de 100 feuilles</i>	0.008	0.006	(0.011)	-0.007	0.000	0.862
4. No. of nodes/m length of branch <i>4. Nombre de noeuds/m</i>	0.104	0.211	0.248	(-0.408)	0.161	-0.634
5. Number of branches/plant <i>5. Nombre de branches/plant</i>	-0.046	-0.196	0.000	0.087	(-0.219)	0.332

Figures in parentheses denote the direct effects / *Les chiffres entre parenthèses indiquent les effets directs.*
 Residual effect / *Effet résiduel* = 0.045

CONCLUSION

The information obtained by this technique helps in direct and indirect selection of traits for genetic improvement of the yield. Since the height of the plant had a positive direct effect on the leaf yield, direct selection of this trait will be rewarding for leaf yield improvement. However, characters like number of leaves per plant and weight of 100 leaves exerted maximum indirect influence through another component trait, indirect selection through such trait will be effective. An understanding of the nature of association of the yield with their agronomic traits would give appropriate suggestions in the selection procedure for breeding programmes. The component traits that are strongly correlated with the yield as the basis of selection would minimise the effect of epistasis, then linkage will not influence the progeny mean for any trait.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to record their deep sense of gratitude to Dr A. Sarkar, Joint Director, Mulberry Breeding and Genetics Section, CSR & TI, Mysore, for the supply of genetic material in carrying out the present investigation and thanks are also due to Shri S. Sekar, Stenographer, Regional Sericultural Research Station, Coonoor, for his assistance.

REFERENCES

- DANDIN S.B., KUMAR R. (1989) Evaluation of mulberry genotypes for different growth and yield parameters. *In* Genetic Resources of Mulberry and its Utilisation. Published by CSRTI, Mysore, pp. 143-151.
- DAS B.C., KRISHNASWAMY S. (1969) Estimation of components of variation of leaf yield and its related traits in mulberry. *J. Sericult. Sci. Japan*, 38(3), 242-248.
- DEWEY D.R., LU K.H. (1959) A correlation and path coefficient analysis of components of crested wheat grass seed production. *Agron. J.*, 51, 515-518.
- SARKAR A., ROY B.N., GUPTA K.K., DAS B.C. (1987) Character association in mulberry under close planting. *Indian J. Seric.*, 26(2), 76-78.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., KSHMA GIRIDHAR, DWIVEDI N.K., SURYANARAYANA N. (1988) Correlation and path analysis in mulberry under stress and non-stress conditions. *Sericologia*, 28(2), 239-243.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., SENGUPTA K. (1989) Evaluation of germplasm for stress resistance. *In* Genetic Resources of Mulberry and its Utilisation. Published by CSRTI, Mysore, pp. 153-158.
- TAZIMA Y. (1985) Report on Sericulture Industry in India. Published by the Central Silk Board, Bangalore.
- WRIGHT S. (1921) The biometrics relations between parent and offspring. *Genetics*, 6, 111-122.

ANALYSE DE TRAJETS DES COMPOSANTS DU RENDEMENT EN FEUILLES CHEZ LE MURIER (*MORUS*) CULTIVE A HAUTE ALTITUDE

S. MASILAMANI¹, V. THIAGARAJAN², B.N. SUSHEELAMMA³ & R.K. DATTA³

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

2. Regional Sericultural Research Station, Chamarajnagar 571 313, India.

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

On a effectué la comparaison des corrélations entre le rendement en feuilles et les composés du rendement chez douze génotypes de mûrier prometteurs. Les corrélations phénotypiques et génotypiques sont en accord étroit pour la comparaison maximale, les coefficients génotypiques étant plus élevés que les coefficients phénotypiques. Le rendement en feuilles présente une corrélation positive et significative avec la hauteur du plant, le nombre de feuilles, le poids de 100 feuilles et le nombre de ramifications primaires. Le nombre de noeuds par mètre de branche présente une corrélation négative et significative avec le rendement en feuilles, le nombre de feuilles par plant, le poids de 100 feuilles et le nombre de ramifications primaires par plant. L'analyse des coefficients de trajet révèle que, sur tous les caractères étudiés, la hauteur du plant donne l'effet direct positif le plus élevé sur le rendement en feuilles. Le nombre de noeuds par mètre de branche et le nombre de branches par plant ont un effet direct négatif sur le rendement en feuilles par plant. Le nombre de feuilles par plant et le poids de 100 feuilles ont une contribution directe faible mais produisent un effet indirect assez élevé par l'intermédiaire de la hauteur du plant et du nombre de noeuds par mètre de branche.

INTRODUCTION

L'introduction directe d'une variété de mûrier améliorée d'un pays vers un autre réussit rarement en raison de l'inadaptation et des conditions environnementales (Tazima, 1958). Aussi, ces dernières années, on s'est beaucoup intéressé à l'amélioration quantitative et qualitative du mûrier (*Morus*) par la sélection.

L'évaluation d'un pool génétique pour déterminer les caractères d'intérêt agronomique est indispensable à l'amélioration du mûrier. La lecture de la documentation montre que, bien que de nombreux efforts aient été faits pour améliorer le mûrier, les recherches sur la relation entre les différentes caractéristiques de la plante sont négligeables. Das et Krishnaswamy (1969) ont étudié les corrélations entre trois caractères (le rendement en feuille, la hauteur du plant et le nombre moyen de branches) chez 256 souches de mûrier et ont observé que les corrélations réciproques aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau génotypique sont positives et fortement significatives. Susheelamma et coll. (1988, 1989) ont étudié l'association des composés importants du rendement avec le rendement en feuilles dans des conditions de stress et en l'absence de stress. Le rendement final, la qualité et la performance de la récolte sont souvent gouvernées par une série de caractères génétiques et par l'effet cumulatif de facteurs multiples (Dandin et Kumar, 1989). Afin de comprendre les facteurs multiples régissant et limitant la croissance et la production de feuilles chez le mûrier, il est nécessaire d'identifier et de mesurer l'effet des caractères génétiques et leur association.

Lors de la sélection, l'importance d'un caractère doit être décidée en fonction du besoin de corrélations permettant de déterminer les caractères composant une entité complexe ; cependant, ces corrélations ne donnent pas une représentation exacte de l'importance relative des effets directs et indirects des différents attributs. L'analyse des coefficients de trajet permet non seulement d'identifier

la relation de cause à effet entre le rendement et les caractères mais également l'importance relative de chacun d'entre eux car ils affectent le rendement tant directement qu'indirectement.

Dans cette étude, nous avons tenté d'analyser les associations entre le rendement en feuilles et ses attributs chez le mûrier (*Morus*) par la méthode des coefficients de trajets élaborée par Wright (1921). Un coefficient de trajet est un coefficient de régression partielle standardisé qui mesure l'influence directe d'une variable sur une autre et permet de répartir les coefficients de corrélation en composants d'effets directs et indirects.

MATERIELS ET METHODES

Douze génotype de mûrier (Tableau I) provenant de la collection du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore ont été cultivés dans des cavités à espacement de $1,20 \times 0,9$ m, selon la méthode des parcelles à rangées aléatoires avec trois répétitions en mai 1991 à la *Regional Sericultural Research Station* de Coonoor (Tamil Nadu). Cette station se situe dans les Ghats occidentaux du sud de l'Inde entre 11° et 22° de latitude nord et $76^\circ 15'$ et 77° de longitude est, à une altitude de 1 850 mètres. Après établissement des plants, la hauteur de la couronne a été fixée à 50 cm. Cinq plants ont été choisis au hasard parmi les 30 plants de chacune des répétitions et ont été marqués afin d'observer leur croissance sur 90 jours (durée de la culture). Les observations ont été réalisées au cours de trois saisons, à savoir le printemps, l'été et l'automne, en 1993-94. Un grand nombre de caractères métriques ont été relevés chez les trois répétitions mais l'analyse de corrélation et des coefficients trajectométriques a été effectuée seulement pour les caractères ayant la plus forte influence sur le rendement en feuilles : ceux-ci sont : la hauteur du plant, le nombre de feuilles, le poids de 100 feuilles, le nombre de noeuds par mètre de branche et le nombre de ramifications primaires (Dandin et Kumar, 1989). On a fait la moyenne des données obtenues sur la base d'un plant pour les analyses statistiques.

Les coefficients de corrélations phénotypiques et génotypiques ont été déterminés en fonction de la moyenne d'un plant pour toutes les comparaisons possibles de la variance et de la covariance entre les composants. Les coefficients de corrélations génotypiques ont été répartis en composants des effets directs et indirects d'après l'analyse des coefficients de trajet proposée par Dewey et Lu (1959).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les moyennes des différents caractères agronomiques associés avec le rendement en feuilles sont présentées dans le tableau I. Les coefficients de corrélation pour toutes les combinaisons possibles des composants du rendement en feuilles sont présentés dans le tableau II. Les corrélations phénotypiques et génotypiques sont en accord étroit pour la comparaison maximale, les coefficients génotypiques étant plus élevés que les coefficients phénotypiques. Le rendement en feuilles par plant présente une corrélation positive et significative avec la hauteur du plant, le poids de 100 feuilles, le nombre de feuilles par plant et le nombre de ramifications primaires par plant. La hauteur du plant est également corrélée de manière positive avec le nombre de feuilles et le poids de 100 feuilles. La supériorité du rendement en feuilles des plants de haute taille pourrait être due en partie au fait qu'ils ont une surface foliaire plus importante, ce qui entraîne une activité plus importante de la photosynthèse. La corrélation entre la hauteur du plant et le nombre de branches (0,210) est relativement faible. Ceci est probablement dû au manque d'espace et à la compétition pour l'eau et la lumière. Il n'est pas certain que ces mêmes associations puissent s'appliquer pour des espacements plus larges. La corrélation entre le nombre de feuilles par plant, le nombre de ramifications primaires et le poids de 100 feuilles est fortement significative. Le poids de 100 feuilles est corrélé négativement avec le nombre de noeuds par mètre de branche. Etant donné que la corrélation génotypique négative entre le poids de 100 feuilles et le nombre de branches n'est pas significative, le choix de l'un ou l'autre de ces caractères n'a pas de conséquence sur le programme de sélection. La corrélation entre le nombre de noeuds par mètre de branche et le nombre de ramifications primaires est négative.

La tendance des corrélations chez les différents génotypes indique donc que, chez le mûrier, la hauteur du plant, le poids de 100 feuilles, le nombre de feuilles et le nombre de branches contribuent

fortement au rendement en feuilles. Il est clair que les caractères maximaux sont corrélés en raison d'une association réciproque avec les autres caractères.

Le rendement étant composé d'un certain nombre de caractères simples qui, par leur interaction, contribuent au rendement tant de manière directe qu'indirecte, l'étude de corrélation ne permet pas à elle seule d'avoir une représentation précise de la contribution des composants au rendement. L'analyse des coefficients de trajets constitue une méthode efficace pour éclaircir les causes directes et indirectes de l'association et permet de mesurer l'importance relative de chacun des facteurs responsables.

Le diagramme des trajets (Fig. 1) montre que le rendement en feuilles résulte en partie de la hauteur du plant, du nombre de feuilles, du poids de 100 feuilles, du nombre de noeuds par mètre de branche, du nombre de branches et d'une variable composite qui comprend tous les autres facteurs affectant le rendement dans cette étude. Les cinq facteurs énoncés ci-dessus sont eux-mêmes corrélés. De ce fait, chaque facteur influence le rendement en feuilles par une contribution directe et en agissant en combinaison avec les quatre autres facteurs avec lesquels ce facteur est corrélé. Si l'on suppose que la variable résiduelle ($XR = 0,045$) est indépendante, on obtient une explication précise quant au profil de l'interaction des autres composants possibles du rendement en feuilles.

L'exemple présenté ci-dessous montre comment la méthode des coefficients de trajet permet d'aider à l'analyse des coefficients de corrélation.

Le coefficient de corrélation de la hauteur du plant avec le rendement en feuilles ($r = 0,886$) comprend cinq composés dont les contributions relatives seraient les suivantes :

Hauteur du plant contre rendement en feuilles		$r = 0,886$
Effet direct	Px1	$y = 0,609$
Effet indirect par le nombre de feuilles	r12 Px2	$y = 0,211$
Effet indirect par le poids de 100 feuilles	r13 Px3	$y = 0,008$
Effet indirect par le nombre de noeuds/m	r14 Px4	$y = 0,104$
Effet indirect par le nombre de branches	r15 Px5	$y = -0,046$
Total		0,886

La répartition des coefficients de corrélation en composants permet de mettre en évidence les facteurs contribuant à cette relation. L'effet direct a plus d'influence sur le rendement en feuilles que l'effet indirect par le nombre de feuilles, le nombre de noeuds par mètre de branche et le poids de 100 feuilles. L'effet indirect par le nombre de ramifications primaires exerce une influence négative sur le rendement en feuilles.

L'examen des composants de la corrélation (Tableau III) montre que la hauteur du plant, puis le nombre de feuilles par plant et le poids de 100 feuilles sont les trois facteurs qui exercent la plus forte influence aussi bien directement qu'indirectement sur le rendement en feuilles. Cependant, le nombre de ramifications primaires a une influence directe négative sur le rendement en feuilles et a davantage d'influence sur le rendement en feuilles par l'intermédiaire du nombre de feuilles par plant, le nombre de noeuds par mètre de branche et la hauteur du plant. Le nombre de noeuds par mètre de branche influence indirectement le rendement en feuilles par l'intermédiaire du nombre de ramifications primaires par plant. L'effet indirect du poids de 100 feuilles par l'intermédiaire du nombre de ramifications primaires et inversement est de 0,000, ce qui indique que la sélection de l'un de ces caractères n'affectera pas les autres.

Les résultats obtenus dans cette étude corroborent les travaux déjà réalisés sur cette question. Par exemple, Das et Krishnaswamy (1969) ont observé que les corrélations réciproques entre trois caractères (rendement en feuilles, hauteur du plant et nombre de ramifications primaires par plant) aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau génotypique sont positives et fortement significatives : ce qui est en accord avec nos observations. De plus, le nombre de noeuds par mètre de branche présente une corrélation négative et significative avec le rendement en feuilles, comme l'ont observé Sarkar et coll. (1987). Cependant, la différence obtenue entre nos résultats et des résultats antérieurs (Susheelamma et coll., 1988) pour l'effet indirect du poids de 100 feuilles par l'intermédiaire de la hauteur du plant pourrait être attribuée au changement d'altitude et au type d'espacement adopté pour la culture des génotypes.

CONCLUSION

Les informations obtenues par cette technique permettent d'aider à la sélection directe et indirecte des caractères pour l'amélioration génétique du rendement. La hauteur du plant ayant un effet positif direct sur le rendement en feuilles, la sélection directe de ce caractère donnera une amélioration du rendement. Cependant, les caractères comme le nombre de feuilles par plant et le poids de 100 feuilles exerçant une influence indirecte maximale par l'intermédiaire d'un autre composant du rendement, la sélection de ces caractères donnera également de bons résultats. La compréhension de la nature des associations du rendement avec les caractères agronomiques débouchera sur des propositions appropriées pour les protocoles dans les programmes de sélection. Le choix, comme base de sélection, de composants fortement corrélés au rendement permet de minimiser l'effet de l'épistasie, ainsi la liaison n'influencera pas les moyennes des descendants pour aucun des caractères.

TESTING OF THE HYBRID OFFSPRING OF THE MULBERRY VARIETIES KINRIU AND KOKUSO UNDER FREE POLLINATION

Z.M. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgaria.

The morphological and economical characteristics of the leaves of the hybrid offspring of the mulberry varieties Kinriu and Kokuso under free pollination and the food values, utilization by the silkworms as well as their productivity have been investigated. It was established that in the tested mulberry offspring after the tenth year since their planting the percentage of trees with entire leaves decreased and stabilized by 54-61% on average during the spring and by 49-57% during the summer for Kokuso and by 79-82% and 73.76%, respectively, for Kinriu. A strong effect on the economic and productive characteristics of the hybrid offspring was exerted by initial selection in the nursery in regard to growth and leaf shape (entire leaves). The leaf yield produced from two harvests (spring and summer-autumn) of the hybrid offspring of Kokuso exceeded that of Kinriu by 15% and that of the control, cultivar 106, by 5%. The freely pollinated hybrid generation of Kokuso was characterized by a relatively high food value, technological parameters of silkworm cocoons and total productivity; this generation may be utilized in the creation of new mulberry plantations needed in silkworm rearings.

Keywords: Mulberry, hybrid offspring, free pollination.

INTRODUCTION

Production of mulberry seedlings (Rangaswami *et al.*, 1976) using vegetative propagation methods leads to a prolongation of the reproduction process. High-quality mulberry seedlings can be produced through seeds by free- or cross-pollinated selected cultivars (Pulatov, 1979; Fonseca and Venkorski, 1981).

Initial growth of some selected mulberry hybrids was investigated by Penkov (1979) who found that during the infant period the hybrid offspring are very uniform and have mainly entire leaves, after that leaf shape segregation was observed. Nikuradze (1965) reported that during the spring season the nutritive value of some hybrid generations is higher than in some other mulberry varieties.

Very good results have been obtained by Petkov and Penkov (1976) in Bulgaria in silkworms fed with leaves of some selected mulberry hybrids.

In the present study, morphological and productive characters of hybrid populations of the mulberry varieties Kinriu and Kokuso under free pollination and their utilization by the silkworm, *Bombyx mori* L., were analyzed in detail with the purpose of eventuating their utilization in the future.

MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out at the Sericultural Experiment Station, Vratza, with hybrid populations obtained from free-pollinated Kinriu and Kokuso cultivars. Mulberry seeds from these hybrids were collected and sowed in the nursery. In the next year, some seedlings with strong growth and entire leaves were selected. Selected and non-selected seedlings from two hybrid offspring were planted as a low-stem plantation (3300 trees per hectare).

The study was carried out using selected and non-selected Kinriu and Kokuso hybrid offspring during the period 1988-1993. The tested trees were cultivated under rainfed conditions, according to the agricultural techniques accepted at the Station.

The tested trees were arranged in the following groups according to the leaf shape during the spring and summer seasons, respectively:

- 1st group: trees with more than 75% entire leaves;
- 2nd group: trees with more than 75% lobed leaves;
- 3rd group: trees with more than 75% serrated leaves.

In the spring the leaves were harvested in the middle of the fifth silkworm instar by cutting whole branches, and the summer-autumn harvesting was done by cutting 1/3 of the top of branches. Representative leaf samples were collected and analyzed at Sofia Plant Physiology Institute for determination of the chemical composition.

Feeding experiments were conducted using Super 1 $\times$ 157 K silkworm hybrid to determine the leaf utilization. The larvae from each group were fed separately with leaves from selected and non-selected trees from hybrid offspring and the data obtained were compared with those of the control, cultivar 106. In each group, four replications of 100 larvae in the fifth instar were used. The larvae were fed three times a day with 2.13-2.15 kg of leaves per 100 larvae for the whole fifth instar. Silkworms were reared in enough space and according to the standard procedure (Petkov and Penkov, 1980). Daily, missing larvae were compensated by replacing them with larvae from a control batch maintained separately.

The nutritive value of the leaves of hybrid populations was computed on the basis of silkworm biological characters, cocoon technological characters and the data characterizing the leaf utilization.

Determination of the common productivity of the mulberry trees was made following the method suggested by Kafian (1964) and Petkov (1995).

RESULTS AND DISCUSSION

The biological and economic values of the mulberry hybrids and their offspring are determined not only by their leaf yield but also according to their leaf shape homogeneity and leaf lamina size. There was a constant in the leaf shape fluctuation, as indicated by Fedoroff (1954), of mulberry leaf offspring caused by the genetic speciality in the initial forms, tree development phases, their cultivation and the ecological conditions.

The data on the leaf shape fluctuation of mulberry hybrid populations (Table I) show that there was still a segregation for the leaf shape and that the trees with entire leaves were predominant. In spite of the variability of the entire leaf percentage over the years in Kinriu offspring, this percentage was approximately the same, like the typical percentage in some other mulberry cultivars. The percentage of entire leaves in the seedlings selected from the two hybrid offspring was higher than that obtained for non-selected ones, therefore the initial selection was very important in this process.

The data on the classification of the two offspring for leaf lamina shape differed from those obtained by Penkov and Jankov (1962) who reported that about a half of mulberry hybrid offspring have entire leaves. The results obtained in our study show that 61% of Kokuso and 82% of Kinriu offspring had entire leaves, therefore the hybrid population manifested a higher homogeneity.

There were some differences in the number of trees with various types of leaves in the summer mulberry growth in comparison to the spring growth. The percentage of trees with entire leaves declined and these data confirmed the report by Ha Van Fuk (1981) that there are some differences between mulberry offspring with respect to their leaf shape in these seasons.

The data characterizing some leaf traits of the tested hybrid offspring are presented in Table II. The hybrids had large leaves and their size and weight were higher than in the control, cultivar 106. The leaf size in hybrid offspring ranged in a wider limit in comparison to female cultivars. According to Penkov (1978), the leaf lamina size inheritance is intermediate, and the size of leaves in the hybrid offspring is lower than in the parents.

Table 1. Variation (%) in the shape of the leaf blade in the hybrid offspring.**Tableau 1. Variation (%) de la forme de la feuille chez les descendants hybrides.**

Hybrid offspring	Plant number	Spring growth			Summer-autumn growth		
		Group I	Group II	Group III	Group I	Group II	Group III
Descendants hybrides	Nombre de plants	Croissance de printemps			Croissance d'été-automne		
		Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Kokuso selected	25	61.03	12.38	26.64	57.98	24.41	17.68
Kokuso sélectionnés							
Kokuso non-selected	141	54.39	17.71	27.90	49.71	32.34	17.95
Kokuso non-sélectionnés							
Kinriu selected	64	82.54	10.29	7.17	75.67	17.96	6.37
Kinriu sélectionnés							
Kinriu non-selected	91	79.64	8.32	11.94	73.53	17.73	8.74
Kinriu non-sélectionnés							

Group I: trees with more than 75% entire leaves / Groupe 1 : arbres comportant plus de 75 % de feuilles entières.

Group II: trees with more than 75% lobed leaves / Groupe 2 : arbres comportant plus de 75 % de feuilles lobées.

Group III: trees with more than 75% serrated leaves / Groupe 3 : arbres comportant plus de 75 % de feuilles dentelées.

Table 2. Morphological characteristics of the hybrid offspring.**Tableau 2. Caractères morphologiques des descendants hybrides.**

Hybrid offspring	Spring growth				Summer-autumn growth			
	Length (cm)	Width (cm)	Mass of 1 leaf (g)	% of the control	Length (cm)	Width (cm)	Mass of 1 leaf (g)	% of the control
Descendants hybrides	Croissance de printemps				Croissance d'été-automne			
	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse d'une feuille (g)	% par rapport au témoin	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse d'une feuille (g)	% par rapport au témoin
Kokuso selected	14.80	10.46	1.428	105.31	17.96	14.24	1.929	106.34
Kokuso sélectionnés								
Kokuso non-selected	14.32	10.26	1.376	101.47	17.73	13.35	1.848	101.87
Kokuso non-sélectionnés								
Kinriu selected	15.83	11.95	1.573	116.00	20.99	16.13	2.002	110.36
Kinriu sélectionnés								
Kinriu non-selected	14.57	11.43	1.476	108.85	20.17	15.57	1.936	106.73
Kinriu non-sélectionnés								
106 (control / témoin)	14.43	10.18	1.356	100.00	17.26	13.66	1.814	100.00

The data on the leaf chemical composition in tested populations (Table III) indicate that they had a higher water content than the control. There was low variation in the chemical composition in the two hybrid offspring, but the differences were insignificant. Leaves from Kokuso offspring were characterized by higher water, crude protein, fat and ash contents in comparison with Kinriu offspring.

Table III. Chemical composition of the leaves of the hybrid offspring.

Tableau III. Composition chimique des feuilles des descendants hybrides.

Hybrid offspring	Water (%)	Percentage of the air dry weight				
		Crude protein (%)	Crude fats (%)	Crude fibre (%)	Crude ash (%)	NES (%)
Descendants hybrides	Eau (%)	Pourcentage du poids sec à l'air				
		Protéines brutes (%)	Matières grasses (%)	Fibres brutes (%)	Minéraux bruts (%)	NES (%)
Kokuso selected / Kokuso sélectionnés	74.86	20.06	4.17	11.09	6.82	57.86
Kokuso non-selected / non-sélectionnés	74.40	21.83	4.06	10.31	6.92	56.88
Kinriu selected / Kinriu sélectionnés	75.37	22.36	6.21	12.08	6.85	51.50
Kinriu non-selected / non-sélectionnés	75.60	22.65	5.19	12.08	7.04	51.83
106 (control / témoin)	72.36	22.65	4.76	13.11	7.81	51.67

NES: Nitrogen-free extract substance / Extrait sans azote.

The data in Table IV show that the tested populations differed from one another in relation to the characters determining the leaf yield. The maximum leaf yield in the spring season was obtained in Kokuso hybrid offspring while the control exceeded Kinriu offspring yield by 7%. The leaf yield obtained in the second (summer-autumn) harvest in the two offspring was lower than that of the control by 4% for Kokuso and by 20% for Kinriu offspring. The highest leaf yield for the two harvests (1185.79 kg/0.1 ha) was obtained in Kokuso hybrid offspring.

The data characterizing the silkworm biological trait values obtained by feeding the leaves of the tested hybrid offspring are presented in Table V. The highest silkworm survival rate was observed in the group fed with Kinriu hybrid leaves, which exceeded the control by 0.65%, while the highest cocoon yield for one box of silkworm eggs was obtained in the silkworms fed with Kokuso hybrids leaves, 33.46 kg and 32.25 kg for selected and non-selected seedlings, respectively.

The data from Table VI indicate that cocoon characters in the tested offspring were near or higher than the control ones. The silkworms fed with Kokuso offspring leaves spun the largest cocoons (length/width ratio: 34.05-34.59/19.03-19.10 mm, respectively). This group recorded the highest silk ratio, reelability and raw silk percentage and the lowest denier. Therefore, some differences of silkworm biological characters and cocoon technological traits were obtained between silkworms fed with leaves from selected and non-selected hybrid offspring.

The data in Table VII indicate that the amount of mulberry leaves used for producing 1 kg of raw cocoons and raw silk was lowest with the Kokuso hybrid leaves. For 1 kg cocoons, the amount

Table IV. Productivity of the hybrid offspring.

Tableau IV. Productivité des descendants hybrides.

Hybrid offspring	Spring growth			Summer-autumn growth		Total leaf yield/0.1 ha (kg)
	Leafiness (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Leaf yield /tree (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Leaf yield /0.1 ha (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Leaf yield /tree (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Leaf yield /0.1 ha (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	
Descendants hybrides	Croissance de printemps			Croissance d'été-automne		Rendement en feuilles total/0,1 ha (kg)
	Abundance foliaire (%) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Rendement en feuilles /arbre (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Rendement en feuilles /0,1 ha (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Rendement en feuilles /arbre (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Rendement en feuilles /0,1 ha (kg) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Kokuso selected / Kokuso sélectionnés	46,40 ± 0.2***	4.44 ± 0.06***	985.32 ± 11.3***	0.903 ± 0.04	200.46 ± 6.2	1185.79 ± 14.5***
Kokuso non-selected / non sélectionnés	46.48 ± 0.3***	4.24 ± 0.05*	940.36 ± 10.4***	0.881 ± 0.05	195.58 ± 7.1	1135.95 ± 11.4**
Kinriu selected / Kinriu sélectionnés	47.58 ± 0.2***	3.89 ± 0.03	862.63 ± 8.7**	0.764 ± 0.02*	170.27 ± 8.0***	1032.91 ± 10.5***
Kinriu non-selected / non sélectionnés	45.96 ± 0.3***	3.71 ± 0.06**	823.54 ± 11.2***	0.724 ± 0.04**	160.73 ± 5.8***	984.27 ± 9.6***
106 (control / témoin)	48.53 ± 0.4	4.03 ± 0.07	894.65 ± 10.7	0.928 ± 0.06	206.02 ± 7.0	1100.67 ± 11.2
CD at 5%	0.25	0.17	19.86	0.13	16.43	20.34
CD at 1%	0.34	0.23	27.08	0.18	22.40	27.73
CD at 0.1%	0.46	0.32	36.65	0.24	30.31	37.52

* Verified at P = 5% / Vérifié à P = 5 %.

** Verified at P = 1% / Vérifié à P = 1 %.

*** Verified at P = 0.1% / Vérifié à P = 0,1 %.

Table V. Biological characteristics of silkworms fed on leaves of the hybrid offspring.

Tableau V. Caractéristiques biologiques des vers à soie nourris avec des feuilles des descendants hybrides.

Parameters	Hybrid offspring				Control 106	CD		
	Kokuso selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kokuso non-selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu non-selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$		5%	1%	0.1%
Paramètres	Descendants hybrides				Témoin 106	Seuil à		
	Kokuso sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kokuso non sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu non sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$		5%	1%	0.1%
Mass of 10 silkworms (g) <i>Poids de 10 larves (g)</i>	41.50 $\pm$ 0.43 ***	41.43 $\pm$ 0.38	42.18 $\pm$ 0.19 ***	41.08 $\pm$ 0.42 ***	43.00 $\pm$ 0.62	0.35	0.48	0.65
Survival rate of silkworms (%) <i>Taux de survie des larves (%)</i>	96.33 $\pm$ 1.05	96.15 $\pm$ 0.78	97.13 $\pm$ 0.68	97.63 $\pm$ 0.53	96.75 $\pm$ 0.70	NS	NS	NS
Cocoon yield/1 box (kg) <i>Rendement en cocons/boîte (kg)</i>	33.46 $\pm$ 0.31 ***	32.35 $\pm$ 0.25	32.11 $\pm$ 0.18	31.51 $\pm$ 0.20 **	32.16 $\pm$ 0.42	0.23	0.31	0.42
Quality of cocoons / <i>Qualité des cocons :</i>								
1st grade / <i>1er choix (%)</i>	90.24 $\pm$ 0.73	90.03 $\pm$ 0.46	96.72 $\pm$ 0.33	94.13 $\pm$ 0.64	94.13 $\pm$ 0.68	NS	NS	NS
Double / <i>Doubles (%)</i>	7.05 $\pm$ 0.21	6.80 $\pm$ 0.09	2.61 $\pm$ 0.05	4.78 $\pm$ 0.11	4.37 $\pm$ 0.30	NS	NS	NS
Defective / <i>Défectueux (%)</i>	2.71 $\pm$ 0.08	3.17 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.22	1.09 $\pm$ 0.24	1.50 $\pm$ 0.16	NS	NS	NS

* Verified at P = 5% / *Vérifié à P = 5 %.*** Verified at P = 1% / *Vérifié à P = 1 %.**** Verified at P = 0.1% / *Vérifié à P = 0,1 %.*NS: Not significant / *Non significatif.*

Table VI. Technological parameters of the cocoons from silkworms fed on leaves of the hybrid offspring.**Tableau VI. Paramètres technologiques des cocons de vers à soie nourris avec des feuilles des descendants hybrides.**

Parameters	Hybrid offspring				Control 106	CD		
	Kokuso selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kokuso non-selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu non-selected $\bar{x} \pm S\bar{x}$		5%	1%	0.1%
Paramètres	Descendants hybrides				Témoin 106	Seuil à		
	Kokuso sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kokuso non sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Kinriu non sélectionné $\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	5%	1%	0.1%
Cocoon size (length/width) (mm) <i>Taille du cocon (L/l) (mm)</i>	34.57/19.10	34.07/19.03	34.47/19.34	33.37/19.00	33.75/18.98			
Filament length (m) <i>Longueur de la bave (m)</i>	1142 ± 12**	1092 ± 14	1121 ± 25*	1096 ± 36	1073 ± 21	38	51	69
Shell ratio (%) <i>Richesse soyeuse (%)</i>	22.28 ± 0.03***	21.68 ± 0.28	21.48 ± 0.34	21.00 ± 0.37***	21.00 ± 0.75	0.25	0.34	0.46
Reelability (%) <i>Dévidabilité (%)</i>	90.74 ± 0.48**	90.27 ± 0.33	89.81 ± 0.87	89.92 ± 0.57	90.15 ± 0.71	0.22	0.43	0.59
Raw silk yield (%) <i>Rendement en soie grège</i>	43.21 ± 0.28*	43.00 ± 0.33	42.07 ± 0.30***	41.75 ± 0.26***	42.87 ± 0.44	0.25	0.38	0.47

* Verified at P = 5% / Vérifié à P = 5 %.

** Verified at P = 1% / Vérifié à P = 1 %.

*** Verified at P = 0.1% / Vérifié à P = 0,1 %.

Table VII. Amount (kg dry matter) of mulberry leaves used to produce 1 kg cocoons and raw silk.

Tableau VII. Quantité (kg de matière sèches) de feuilles de mûrier utilisées pour produire 1 kg de cocons et 1 kg de soie grège.

Hybrid offspring	For 1 kg cocoons			For 1 kg raw silk		
	Ingested $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Digested $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Consumed $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Ingested $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Digested $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Consumed $\bar{x} \pm S\bar{x}$
Descendants hybrides	Pour 1 kg de cocons			Pour 1 kg de soie grège		
	Ingéré $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Digéré $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Consommé $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Ingéré $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Digéré $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Consommé $\bar{x} \pm S\bar{x}$
Kokuso selected / Kokuso sélectionnés	10.91 $\pm$ 0.24**	7.31 $\pm$ 0.36*	2.29 $\pm$ 0.07*	68.99 $\pm$ 0.30	46.31 $\pm$ 0.32***	14.04 $\pm$ 0.31**
Kokuso non-selected / non-sélectionnés	11.30 $\pm$ 0.16	7.58 $\pm$ 0.28	2.38 $\pm$ 0.11	71.44 $\pm$ 0.45	47.96 $\pm$ 0.14	14.54 $\pm$ 0.18
Kinriu selected / Kinriu sélectionnés	11.39 $\pm$ 0.32	7.63 $\pm$ 0.43	2.39 $\pm$ 0.05	71.97 $\pm$ 0.31	48.32 $\pm$ 0.66**	14.66 $\pm$ 0.18*
Kinriu non-selected / non-sélectionnés	11.60 $\pm$ 0.41	7.78 $\pm$ 0.35	2.44 $\pm$ 0.36	73.33 $\pm$ 0.22***	49.22 $\pm$ 0.39**	14.93 $\pm$ 0.32*
106 (control / témoin)	11.37 $\pm$ 0.30	7.62 $\pm$ 0.18	2.39 $\pm$ 0.17	71.86 $\pm$ 0.22	48.24 $\pm$ 0.40	14.63 $\pm$ 0.15
CD at 5%	0.30	0.27	0.09	0.70	0.56	0.31
CD at 1%	0.44	0.37	0.13	0.96	0.76	0.43
CD at 0.1%	0.56	0.50	0.17	1.30	1.03	0.58

* Verified at $P = 5\%$ / Vérifié à $P = 5\%$.

** Verified at $P = 1\%$ / Vérifié à $P = 1\%$.

*** Verified at $P = 0.1\%$ / Vérifié à $P = 0.1\%$.

spent in supplied and ingested food was 5% less than with Kinriu hybrid offspring and 4% less than with the control.

Table VIII. Total productivity of the hybrid offspring.

Tableau VIII. Productivité totale des descendants hybrides.

Hybrid offspring	Cocoon yield/0.1 ha (kg)	Raw silk yield/0.1 ha (kg)
<i>Descendants hybrides</i>	<i>Rendement en cocons pour 0,1 ha (kg)</i>	<i>Rendement en soie grège pour 0,1 ha (kg)</i>
Kokuso selected / <i>Kokuso sélectionnées</i>	90.31 ± 0.74***	14.24 ± 0.42***
Kokuso non-selected / <i>Kokuso non-sélectionnées</i>	83.33 ± 0.27***	13.16 ± 0.21***
Kinriu selected / <i>Kinriu sélectionnées</i>	75.74 ± 0.81***	11.90 ± 0.28**
Kinriu non-selected / <i>Kinriu non sélectionnées</i>	70.99 ± 0.92***	11.23 ± 0.14***
106 (control / <i>témoin</i>)	78.68 ± 0.19	12.45 ± 0.33
CD at 5%	0.45	0.31
CD at 1%	0.62	0.43
CD at 0.1%	0.87	0.58

* Verified at P = 5% / *Vérifié à P = 5 %.*

** Verified at P = 1% / *Vérifié à P = 1 %.*

*** Verified at P = 0.1% / *Vérifié à P = 0,1 %.*

The data characterizing the food expenditure for producing 1 kg of raw silk (Table VIII) were similar, and this demonstrated the higher nutritive value of Kokuso hybrid offspring leaves. The highest general productivity (cocoon and raw silk yield for 0.1 ha) was obtained in the Kokuso hybrid population, therefore it is especially suitable for silkworm rearing in the spring season.

REFERENCES

- FEDOROFF A. (1954) Moriculture. Moscow.
 FONSECA T., VENKORSKI R. (1981) Breeding of eleven artificial mulberry hybrids by estimation of some parameters. Bull. Indust. Animal Sci., 338, 1, 85-105.
 HA VAN FUK (1981) Investigation of some biological characters of mulberry hybrid generation. Ph.D. thesis.
 JANKOV A., PENKOV I. (1962) Investigation of mulberry offspring obtained from free- and cross-pollinated mulberry varieties. Reports of RIAB, Kostinbrod, 16, 205-216.
 KAFIAN A. (1964) Instruction for silkworm rearing. Tbilisi.

- PENKOV A. (1979) Investigation of morphological and economic characters of hybrids by some mulberry varieties. I: Hybrids from free pollination. Horticultural and Viticultural Sci., 3, 4, 11-19.
- PENKOV I. (1980) Morphological characters and economic traits of hybrids from some mulberry varieties. III: Nutritive value of mulberry leaves. Animal Sci., 17, 117-122.
- PETKOV M., PENKOV I. (1976) Influence of feeding with leaves from different varieties on silkworm productivity. I: At spring season. Animal Sci., 1, 116-122.
- PETKOV Z. (1995) Determination of total mulberry productivity. Annual Report. Sericult. Exp. Sta. Vratza, 35-38.
- PULATOV A. (1979) New mulberry hybrids for summer-autumn rearings. SANISH Reports, 13, 59-66.
- RANGASWAMI C. *et al.* (1976) Manual of Sericulture. I: Mulberry Cultivation. FAO Agricultural Bulletin. Rome. 150 pp.

ETUDE SUR LES DESCENDANTS HYBRIDES DES VARIETES DE MURIER KINRIU ET KOKUSO EN POLLINISATION LIBRE

Z.M. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgarie.

On a étudié les caractéristiques morphologiques et économiques des feuilles de descendants hybrides obtenus par pollinisation libre des variétés de mûrier Kinriu et Kokuso ainsi que leur valeur nutritionnelle, leur utilisation par les vers à soie et leur productivité. Il est établi que, chez les descendants testés, le pourcentage d'arbres comportant des feuilles entières diminue après la dixième année et se stabilise à 54-61 % en moyenne au printemps et à 49-57 % en été pour Kokuso et à 79-82 % et 73,76 % respectivement pour Kinriu. La sélection initiale en pépinière exerce un effet marqué sur les caractères économiques et sur la productivité des descendants hybrides pour ce qui concerne la croissance et la forme de la feuille (feuilles entières). Le rendement en feuilles après deux récoltes (printemps et été-automne) des descendants hybrides de Kokuso est supérieur de 15 % à celui des descendants de Kinriu et de 5 % à celui du témoin, le cultivar 106. La population obtenue par pollinisation libre de Kokuso se caractérise par une valeur nutritionnelle, des paramètres technologiques et une productivité totale relativement élevés ; cette population peut donc être utilisée pour créer de nouvelles plantations de mûrier nécessaires à l'élevage du ver à soie.

INTRODUCTION

La production de plantules de mûrier (Rangaswami et coll., 1976) à l'aide des méthodes de propagation végétative entraîne un allongement du processus de reproduction. Il est possible d'obtenir des plantules de mûrier performantes en utilisant des graines issues de cultivars sélectionnés propagés par pollinisation croisée ou libre (Pulatov, 1979 ; Fonseca et Venkorski, 1981).

La croissance initiale de certains hybrides de mûrier sélectionnés a été étudiée par Penkov (1979) ; il a observé que les descendants hybrides sont tout à fait homogènes en début de croissance et comportent en général des feuilles entières puis qu'une ségrégation de la forme de la feuille s'opère par la suite. Nikuradze (1965) a observé qu'au printemps, la valeur nutritionnelle de certaines générations hybrides est plus élevée que chez d'autres variétés de mûrier.

D'excellents résultats ont été obtenus par Petkov et Penkov (1976) en Bulgarie chez des vers à soie nourris avec des feuilles issues d'hybrides de mûriers sélectionnés.

Dans cette étude, on a analysé en détail les caractéristiques morphologiques et la productivité de populations hybrides obtenues par pollinisation libre des variétés de mûrier Kinriu et Kokuso ainsi que leur utilisation par le ver à soie *Bombyx mori* en vue de leur exploitation future.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza sur des populations hybrides obtenues par pollinisation libre des cultivars Kinriu et Kokuso. Des graines de mûrier de ces hybrides ont été prélevées et semées en pépinière. L'année suivante, on a sélectionné des plantules présentant une croissance vigoureuse et des feuilles entières. Des plantules sélectionnées et non sélectionnées des deux descendants hybrides ont été plantées en taille basse (3 300 arbres par hectare).

Cette étude a été effectuée sur des descendants hybrides de Kinriu et Kokuso sélectionnés et non sélectionnés de 1988 à 1993. Les arbres testés ont été cultivés sans irrigation, selon les techniques agricoles approuvées à la Station.

Les arbres testés ont été répartis dans les groupes suivants, en fonction de la forme de leurs feuilles au printemps et à l'automne :

1er groupe : arbres comportant plus de 75 % de feuilles entières ;

2ème groupe : arbres comportant plus de 75 % de feuilles lobées ;

3ème groupe : arbres comportant plus de 75 % de feuilles dentelées.

Au printemps, les feuilles ont été récoltées au milieu du cinquième âge larvaire en coupant des branches entières et la récolte d'été-automne a été effectuée en coupant le premier tiers des branches. Des échantillons de feuilles représentatifs ont été prélevés et analysés à l'Institut de physiologie des végétaux de Sofia pour déterminer leur composition chimique.

Les expériences de nourrissage ont été réalisées avec l'hybride de ver à soie Super 1 $\times$ 157 K afin de déterminer l'utilisation des feuilles. Les larves de chacun des groupes ont été nourries séparément avec des feuilles d'arbres sélectionnés et non sélectionnés de descendants hybrides ; les données obtenues ont été comparées à celles obtenues avec le témoin (cultivar 106). Chaque groupe comporte quatre répétitions de 100 larves au cinquième âge. Les larves ont été nourries trois fois par jour avec 2,13 à 2,15 kg de feuilles pour 100 larves pendant toute la durée du cinquième âge. L'élevage a été réalisé en laissant suffisamment de place aux larves et selon le protocole standard (Petkov et Penkov, 1980). Les larves manquantes ont été remplacées quotidiennement par de nouvelles larves provenant d'un lot témoin maintenu séparément.

La valeur nutritive des feuilles des populations hybrides a été déterminée en fonction des caractères biologiques du ver à soie, des caractéristiques technologiques du cocon et des données relatives à l'utilisation de la nourriture.

La productivité commune des mûriers a été déterminée suivant la méthode proposée par Kafian (1964) et Petkov (1995).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs biologiques et économiques des hybrides et de leurs descendants sont déterminées non seulement par leur rendement en feuilles mais également d'après l'homogénéité de la forme et de la taille de la feuille. On observe une constante dans les fluctuations de la forme de la feuille, comme l'a indiqué Fedoroff (1954), chez les descendants hybrides due à la spécificité génétique des formes initiales, aux phases du développement, aux méthodes culturales et aux conditions écologiques.

Les données concernant les fluctuations de la forme de la feuille chez les populations hybrides (Tableau I) montrent que la ségrégation de la forme continue d'opérer et que les arbres à feuilles entières sont prédominants. Malgré la variabilité du pourcentage de feuilles entières sur plusieurs années chez les descendants Kinriu, ce pourcentage reste approximativement identique comme le pourcentage typique chez d'autres cultivars de mûrier. Le pourcentage de feuilles entières chez les plantules sélectionnées des deux descendants hybrides est supérieur à celui obtenu pour les plantules non sélectionnées : la sélection initiale est donc très importante dans ce processus.

Les données concernant la classification de la forme de la feuille chez les deux descendants diffèrent de celles obtenues par Penkov et Jankov (1962) qui ont observé que, chez le mûrier, environ la moitié des descendants hybrides ont des feuilles entières. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que 61 % des descendants Kokuso et 82 % des descendants Kinriu ont des feuilles entières ; les populations hybrides présentent donc une homogénéité plus importante.

On relève des différences pour ce qui concerne le nombre d'arbres comportant plusieurs types de feuilles pendant la croissance d'été par rapport à la croissance de printemps. Le pourcentage d'arbres à feuilles entières diminue ; ceci confirme les études de Ha Van Fuk (1981) qui a observé des différences entre les saisons chez les descendants pour ce qui concerne la forme de la feuille.

Les données portant sur les caractères foliaires des descendants hybrides testés sont présentées dans le tableau II. Les hybrides ont des feuilles de grande taille, leur taille et leur poids sont supérieurs

à ceux du témoin (cultivar 106). La taille de la feuille chez les descendants hybrides varie dans une proportion plus importante que chez les cultivars femelles. D'après Penkov (1978), la transmission héréditaire de la taille de la feuille est intermédiaire et la taille des feuilles chez le descendant hybride est inférieure à celle obtenue chez les parents.

Les données sur la composition chimique des feuilles des populations testées (Tableau III) montrent qu'elles ont un contenu en eau plus élevé que le témoin. On note une légère variation de la composition chimique des feuilles chez les deux descendants hybrides mais les différences ne sont pas significatives. Les feuilles des descendants Kokuso se caractérisent par un contenu plus élevé en eau, en protéines brutes, en matières grasses et en minéraux que les descendants Kinriu.

Les données du tableau IV montrent que les populations testées diffèrent entre elles pour ce qui concerne les caractères déterminant le rendement en feuilles. Le rendement en feuilles est maximal au printemps avec les descendants hybrides Kokuso tandis que le rendement du témoin dépasse de 7 % celui des descendants Kinriu. Le rendement en feuilles obtenu pour la deuxième récolte (été-automne) chez les deux descendants est inférieur de 4 % pour les descendants Kokuso et de 20 % pour les descendants Kinriu à celui du témoin. On obtient le rendement en feuilles maximal pour les deux récoltes (1185,79 kg/0,1 ha) avec les descendants hybrides Kokuso.

Les données portant sur les valeurs des caractères biologiques des vers à soie obtenues par nourrissage avec des feuilles des descendants hybrides testés sont présentées dans le tableau V. Le taux de survie des larves est maximal chez le groupe nourri avec des feuilles issues d'hybrides Kinriu et dépasse de 0,65 % celui obtenu pour le témoin, tandis que le rendement en cocons pour une boîte d'oeufs est maximal chez les vers à soie nourris avec des feuilles d'hybrides Kokuso (33,46 kg pour les plantules sélectionnées et 32,25 kg pour les plantules non sélectionnées).

Les données du tableau VI indiquent que les caractères du cocon pour les descendants testés approchent ou sont plus élevés que ceux obtenus avec le témoin. Les vers à soie nourris avec des feuilles de descendants Kokuso filent les cocons les plus gros (rapport longueur/largeur : 34,05-34,59/19,03-19,10 mm, respectivement). Ce groupe enregistre les valeurs maximales pour la richesse soyeuse, la dévidabilité et le pourcentage de soie grège et la valeur minimale pour le denier. On obtient donc des différences dans les caractères biologiques du ver à soie et les caractères technologiques du cocon entre les larves nourries avec des feuilles de descendants hybrides sélectionnés et celles nourries avec des feuilles de descendants non sélectionnés.

Les données du tableau VII montrent que la quantité de feuilles de mûrier utilisée pour produire 1 kg de cocons frais et de soie grège est minimale pour les feuilles d'hybrides Kokuso. Pour 1 kg de cocons, la quantité dépensée en nourriture ingérée et digérée est inférieure de 5 % à celle nécessaire avec les descendants hybrides Kinriu et de 4 % à celle nécessaire avec le témoin.

Les données portant sur la dépense de nourriture pour produire un kilogramme de soie grège (Tableau VIII) sont similaires : ce qui démontre la valeur nutritive supérieure des feuilles provenant de descendants hybrides Kokuso. La productivité totale (en cocons et soie grège pour 0,1 ha) est maximale pour les populations d'hybrides Kokuso : ces populations sont donc particulièrement adaptées à l'élevage des vers à soie au printemps.

BIOLOGY OF THE MEALY BUG, *MACONELLICOCCLUS HIRSUTUS*, CAUSING TUKRA IN MULBERRY

D. MANJUNATH, RAM KISHORE, K. SATHYA PRASAD, VINOD KUMAR, P. KUMAR
& R.K. DATTA

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

*The biology of the mealy bug, **Maconellicoccus hirsutus**, which causes malformation of the apical shoot in mulberry, popularly known as tukra, is described in relation to mulberry as the host plant. An attempt is also made to monitor the seasonal incidence of tukra and the mode of occurrence of tukra. The life cycle of the male mealy bug occupies 23 days $23 \text{ h} \pm 16 \text{ h}$, while that of the female runs for 25 days $11 \text{ h} \pm 19 \text{ h}$. Pre-oviposition, oviposition and post-oviposition periods were 3 days $4 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$, 6 days $10 \text{ h} \pm 13 \text{ h}$ and 3 days $4 \text{ h} \pm 12 \text{ h}$, respectively. The fecundity (mean) per female was 265 ± 9 eggs. The incidence of tukra was significantly higher during summer (February-May) compared to rainy (June-September) and winter (October-January) months. Symptoms of tukra failed to appear when methods, i.e., mechanical, cultural, inarch grafting and planting cuttings, were adopted. On the other hand, tukra symptoms occurred only when the mealy bugs infested the mulberry plant, thus ruling out the possibility of the involvement of a virus as presumed earlier.*

Keywords: Mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus*, tukra, inarch grafting, mulberry.

INTRODUCTION

The mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae), is a polyphagous insect infesting more than 125 species of plants in various zoogeographical regions (Ghose, 1972), of which 28 are reported from India alone (Mani, 1988, 1989). These host plants comprise a few species of economic importance, including mulberry. The attack on mulberry by *M. hirsutus* was reported for the first time as early as 1919 by Misra. He established it as the causal organism of what is popularly known as tukra disease. Tukra-affected mulberry plants show malformation on the apical part, resulting in stunted growth. Depletion in quality (Kumar *et al.*, 1992) and quantity (unpublished data) of the leaves of such plants does not allow the farmers to make an expected profit out of silk worm rearing for unit area of garden.

In recent years, the problem of tukra has become rampant in the sericultural belt located in South India, especially in Tamil Nadu (Manjunath *et al.*, 1993). Although the problem of tukra has assumed an alarming dimension, there is a dearth of biological information that is essential to formulate suitable management strategies against this insect popularly designated as 'hard-to-kill' pest.

The present paper describes for the first time the important biological features of *M. hirsutus* in relation to mulberry.

MATERIALS AND METHODS

a) Colonisation of *M. hirsutus*:

Colonies of *M. hirsutus* were raised in the laboratory following the methods outlined by Chaco *et al.* (1978). Such colonies served as the sources of this insect used in the following studies.

b) Development of *M. hirsutus*:

Newly emerged adult females of *M. hirsutus* at 1 per plant were released on mulberry plants 40-50 days after pruning. Various biological parameters, i.e., pre-oviposition period (period from adult emergence to the formation of the ovisac), oviposition period, incubation period, nymphal duration and number of nymphal instars, post-oviposition period, fecundity and adult longevity, were recorded. There were 10 replications. The studies were conducted at $28 \pm 1.5^\circ\text{C}$ and $65 \pm 5\%$ relative humidity.

c) Seasonal incidence of mealy bug infestation:

The incidence of mealy bug infestation was monitored every month for a period of three years (April 1990-March 1993) in the mulberry gardens of Mysore District (Karnataka) as per the methods suggested by Ananthakrishnan (1986). In all, 60 mulberry gardens, each having about 10,800 plants (spacing 60 cm $\times$ 60 cm), were covered and observed for infestation by *M. hirsutus*.

d) Mode of occurrence/transmission of the tukra disease:**i) Mechanical transmission:**

In this, the procedures outlined by Hill (1984) were followed. Aqueous extracts of tukra-affected leaves were gently smeared on the leaves of normal plants which were rubbed prior with Carborundum abrasive powder to cause injury on the leaf surfaces.

ii) Grafting:

Tukra-affected and normal plants were inarch-grafted, as detailed by Raychaudhuri *et al.* (1961). They adopted this method to study the transmission of the yellow-net vein (virus) disease on mulberry.

iii) Planting cuttings:

Mulberry cuttings devoid of mealy bugs were procured from tukra-affected plants and planted in earthen pots to raise plants from them. In all the above studies, the mulberry plants/cuttings were kept free from the attack of mealy bugs by spraying them with 0.2% DDVP (Nuvan) prepared in 0.5% soap solution at weekly intervals till the experiments were concluded.

iv) Release of mealy bugs on mulberry plants:

Ovipositing adults of *M. hirsutus* in varying numbers, i.e., 1, 10, 20, 30, 40 and 50, were released on 40-day-old (after pruning) potted mulberry plants to infest them.

Each of the above studies contained 10 replicates, each with 3 plants of K-2 variety. Observations were made daily on the occurrence of symptoms of the 'tukra disease'.

RESULTS AND DISCUSSION**a) Biology of *M. hirsutus*:**

The results are presented in Table I. The period of life cycle of males of *M. hirsutus* occupied 23 days $23 \text{ h} \pm 16 \text{ h}$, while that of females was 25 days $11 \text{ h} \pm 19 \text{ h}$. The other biological parameters, i.e., pre-oviposition period, oviposition period and post-oviposition period, were 3 days $4 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$, 6 days $10 \text{ h} \pm 13 \text{ h}$ and 3 days $4 \text{ h} \pm 12 \text{ h}$, respectively. The average fecundity/female was 265 ± 9 eggs.

Although several studies on the biology of *M. hirsutus* on various host plants are available (Hall, 1921; Dutt *et al.*, 1951; Singh and Ghosh, 1970), the investigations using mulberry as a host plant are limited to those by Misra (1919) and Ghose (1972). As such, the duration of the life cycle of *M. hirsutus* on mulberry ranged from 23-29 days and pre-oviposition from 5-6 days. But these authors did not present any account on oviposition and post-oviposition periods. The data gathered from the present studies with regard to periods of oviposition and post-oviposition form an additional information to the existing knowledge on the biology of *M. hirsutus* on mulberry. Nevertheless, the results of our investigation on other biological parameters closely agree with those of Misra (1919) and Ghose (1972).

b) Seasonal occurrence of the tukra disease:

The results are presented in Figure 1. The average incidence of tukra (mealy bug) recorded for a period of 3 years (from April 1990-March 1993) was 34.24%. It was highest (45.92%) during summer (February-May), followed by rainy (June-September) (32.75%) and winter (October-January) (25.04%) months. The incidence of tukra during summer was significantly higher ($P < 0.01$) than during other seasons. However, the difference in tukra incidence between rainy and winter months was not significant.

Misra (1919) reported severe infestation of mulberry nurseries in Murshidabad District (West Bengal) by *M. hirsutus* in the month of April which corresponds to the summer season. He, however, did not furnish any account on the seasonal variation in mealy bug infestation.

Table I. Biological data of *M. hirsutus* reared on mulberry plants.

Tableau I. Données biologiques concernant *M. hirsutus* élevé sur plants de mûrier.

Parameters <i>Paramètres</i>	Mean period $\pm$ SD <i>Durée moyenne $\pm$ SD</i>
Pre-oviposition / <i>Pré-oviposition</i>	3 d 4 h $\pm$ 5h
Oviposition	6 d 10 h $\pm$ 13 h
Incubation	5 d $\pm$ 3 h
Post-oviposition	3 d 4 h $\pm$ 12 h
Adult longevity (females) / <i>Longévité de l'adulte (femelle)</i>	13 d 17 h $\pm$ 36 h
Developmental period / <i>Durée du développement</i>	
Male / <i>Mâle</i>	23 d 23 h $\pm$ 16 h
Femelle / <i>Femelle</i>	25 d 11 h $\pm$ 19 h
Fecundity (number of eggs) / <i>Fécondité (nombre d'oeufs)</i>	265 $\pm$ 9

SD: Standard deviation / *Ecart type*. d: days / *jours*.

c) Mode of occurrence of the tukra disease:

Symptoms of the 'tukra disease' failed to appear when various plant disease transmission methods, i.e., mechanical, cultural, grafting and planting cuttings, were adopted. On the other hand, the symptoms of tukra appeared when the mealy bugs were released for infesting mulberry plants and this took 16 days. Further, the number of apical leaves showing tukra symptoms followed an increasing trend with the increase in the number of mealy bugs released, which clearly demonstrates that the degree of tukra symptoms on a plant is dependent on the density of mealy bug population attacking the plants. However, literature is silent on the mode of occurrence of the 'tukra disease' in mulberry.

The present investigations therefore demonstrate that:

1. The symptoms of tukra appear in about a fortnight's time following the release of mealy bugs on the mulberry plant.
2. The season has an influence on the incidence of the 'tukra disease'.
3. There is no involvement of a virus in causing tukra symptoms as presumed by Sastry (1984), and
4. The symptoms of tukra occur only when the mulberry plants are infested with *M. hirsutus* and tukra is not an infectious disease.

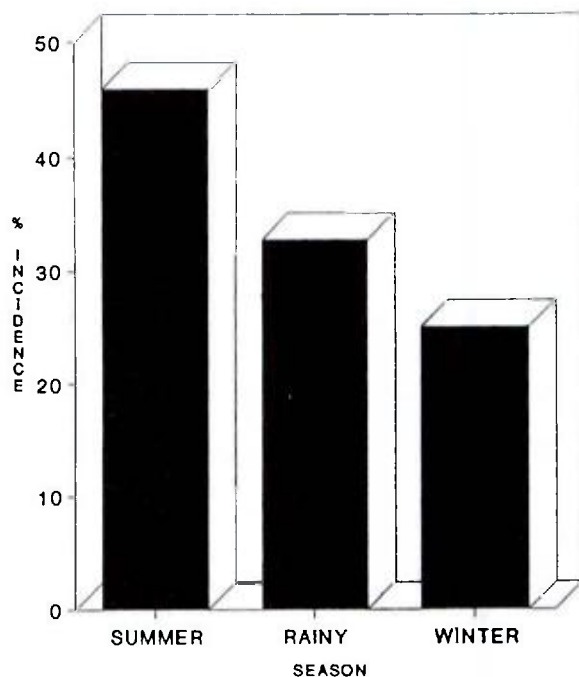


Fig. 1: Seasonal incidence (%) of tukra in mulberry (1990-93).

Fig. 1 : Incidence saisonnière (%) du tukra chez le mûrier (1990-93).

In fact, the symptoms of tukra appear only as manifestations of mealy bug attack and these are limited to only the apical part of the plant. However, the present findings do not rule out the presence of a toxic saliva in *M. hirsutus* which is injected into the host plant system while feeding on the apical portion, resulting in the bushy appearance (malformation) of that part of the plant (Hill, 1983).

REFERENCES

- ANANTHAKRISHNAN T.N. (1986) UGC Instructional Seminar on Insect Plant Interactions. Entomological Research Institute, Madras, India, 115 pp.
- CHACO M.J., BHAT P.K., ANANDA RAO L.V., DEEPAK SINGH M.B., RAMANARAYANAN E.P., SREEDHARAN K. (1978) The use of the ladybird beetle, *Cryptolaemus montrouzieri*, for the control of coffee mealy bug. *J. Coffee Res.*, 8(1), 14-19.
- DUTT N., MUKHERJEE P.K., SEN GUPTA N. (1951) Preliminary effect on the growth of *Hibiscus sabdariffa* L. and *V. altissima* Hort. *Indian J. Agricult. Sci.*, 21, 231-237.
- GHOSE S.K. (1972) Biology of the mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Pseudococcidae: Hemiptera). *Indian Agric.*, 16(4), 323-332.
- HALL W.J. (1921) The hibiscus mealy bug, *Pseudococcus hibiscici* (Hemip.). *Bull. Soc. Ent. Egypte, Cairo*, 14, 17-29.
- HILL D.S. (1983) *Agricultural Insect Pests of the Tropics and their Control*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, pp. vii + 746.
- HILL S.A. (1984) *Methods in Plant Virology*. British Society for Plant Pathol., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, V + 167 pp.
- KUMAR P., RAM KISHORE, NOAMANI M.K.R., SENGUPTA K. (1992) Effect of feeding tukra affected mulberry leaves on silkworm rearing performance. *Indian J. Seric.*, 31(1), 27-29.
- MANI M. (1988) Bioecology and management of grapevine mealy bug. *Indian Inst. Hort. Res. Tech. Bull.*, 5, 32.

- MANI M. (1989) A review of the pink mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green). Insect Sci. Applic., 10(2), 157-167.
- MANJUNATH D., PRADIP KUMAR, RAM KISHORE, SATHYA PRASAD K., NARAYANASWAMY K.C., DATTA R.K. (1993) Towards understanding tukra and its management. Indian Silk, 32(3), 6-9.
- MISRA C.S. (1919) Tukra disease of mulberry. Proc. 3rd Ent. Mtg. Pusa, p. 610-618.
- RAYCHAUDHURI S.P., CHATTERJEE S.N., DHAR H.K. (1961) Preliminary note on the occurrence of the yellow-net vein disease of mulberry. Indian Phytopathol., 14, 94-95.
- SASTRY C.R. (1984) Mulberry varieties, exploitation and pathology. Sericologia, 24(3), 333-359.
- SINGH M.P., GHOSH S.N. (1970) Studies on *Maconellicoccus hirsutus* (Green) causing bunchy top in mesta. Indian J. Sci. & Industry, 4, 99-105.

BIOLOGIE DE L'ALEURODE *MACONELLICOCCUS HIRSUTUS* RESPONSABLE DU TUKRA CHEZ LE MURIER

D. MANJUNATH, RAM KISHORE, K. SATHYA PRASAD, VINOD KUMAR, P. KUMAR & R.K. DATTA

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

Cet article décrit la biologie de l'aleurode *Maconellicoccus hirsutus*, responsable de la malformation de la pousse apicale chez le mûrier communément appelée « tukra ». L'incidence saisonnière du tukra et son mode d'apparition ont également été étudiés. Le cycle de l'aleurode mâle dure 23 jours $23 \text{ h} \pm 16 \text{ h}$, tandis que celui de la femelle dure 25 jours $11 \text{ h} \pm 19 \text{ h}$. Les stades pré-oviposition, oviposition et post-oviposition sont respectivement de 3 jours $4 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$, 6 jours $10 \text{ h} \pm 13 \text{ h}$ et 3 jours $4 \text{ h} \pm 12 \text{ h}$. La fécondité (moyenne) par femelle est de 265 ± 9 oeufs. L'incidence du tukra est nettement plus élevée en été (février à mai) qu'à la saison pluvieuse (juin à septembre) et en hiver (octobre à janvier). Les symptômes du tukra n'apparaissent pas lorsque l'on adopte certaines méthodes mécaniques ou culturales comme le greffage par approche ou le bouturage. Les symptômes du tukra apparaissent seulement si le mûrier est infesté par les aleurodes, ce qui écarte l'hypothèse de l'implication d'un virus, comme cela avait été avancé précédemment.

INTRODUCTION

L'aleurode *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera : Pseudococcidae) est un insecte polyphage infestant plus de 125 espèces de végétaux dans diverses régions zoogéographiques (Ghose, 1972), dont 28 en Inde (Mani, 1988, 1989). Ces plantes hôtes comprennent quelques espèces d'intérêt économique comme le mûrier. L'infestation du mûrier par *M. hirsutus* a été observée pour la première fois dès 1919 par Misra. Il a démontré qu'il s'agissait de l'organisme responsable de la maladie communément appelée tukra. Les plants de mûrier atteints de tukra présentent une malformation de la partie apicale entraînant un arrêt de la croissance. La diminution de la qualité (Kumar et coll., 1992) et de la quantité (données non publiées) des feuilles issues de ces plants se traduit pour les fermiers par une perte de rentabilité des élevages de vers à soie par unité de surface.

Au cours de ces dernières années, les problèmes causés par le tukra se sont accrûs dans la ceinture séricicole du sud de l'Inde, en particulier dans le Tamil Nadu (Manjunath et coll., 1993). Bien que le tukra ait atteint des proportions alarmantes, on manque de données biologiques essentielles à la mise au point de stratégies de lutte contre cet insecte, communément appelé « parasite difficile à tuer ».

Dans cet article, sont présentées pour la première fois les caractéristiques biologiques importantes de *M. hirsutus* par rapport au mûrier.

MATERIELS ET METHODES

a) Colonisation par *M. hirsutus* :

Des colonies de *M. hirsutus* ont été élevées en laboratoire suivant les méthodes proposées par Chaco et coll. (1978). Ces colonies ont été utilisées comme source pour les expériences suivantes :

b) Développement de *M. hirsutus* :

Des femelles adultes de *M. hirsutus* sorties d'éclosion ont été déposées à raison de une par plant sur des mûriers 40 à 50 jours après la taille. On a enregistré les paramètres biologiques concernant

la période pre-oviposition (période allant de l'émergence à la formation de l'ovisac), la période d'oviposition, la période d'incubation, la durée nymphale, le nombre d'âges nymphaux, la période post-oviposition, la fécondité et la longévité de l'adulte. Les expériences ont été réalisées sur 10 répétitions à $28 \pm 1,5$ °C et 65 ± 5 % d'humidité relative.

c) Incidence saisonnière de l'infestation par l'aleurode :

L'incidence de l'infestation par l'aleurode a été relevée mensuellement sur une période de trois ans (avril 1990 à mars 1993) dans les mûraies du district de Mysore (Karnataka) suivant les méthodes proposées par Ananthakrishnan (1986). L'étude de l'infestation par *M. hirsutus* a couvert au total 60 mûraies, chacune comportant 10 800 plants (espacement : 60 cm x 60 cm).

d) Mode d'apparition/de transmission de la maladie de tukra :

1) Transmission mécanique :

Pour cette étude, on a suivi les protocoles définis par Hill (1984). Des extraits aqueux de feuilles atteintes de tukra ont été étalés avec soin sur des feuilles de plants normaux préalablement frottées avec une poudre abrasive de Carborundum afin de provoquer des lésions à la surface.

2) Greffage :

Des plants infestés par le tukra et des plants normaux ont été greffés par approche, selon le protocole de Raychaudhuri et coll. (1961) qui ont adopté cette méthode pour l'étude de la transmission du réticulum jaune (maladie virale) chez le mûrier.

3) Plantation des boutures :

Des boutures de mûrier exemptes d'aleurodes ont été réalisées à partir de plants infestés par le tukra et plantées dans des pots en terre. Pour toutes ces expériences, les plants et/ou boutures de mûrier ont été vaporisés, pour les préserver de l'infestation par l'aleurode, avec du DDVP à 0,2 % (Nuvan) préparé dans une solution de savon à 0,5 % toutes les semaines jusqu'à la fin des expériences.

4) Introduction de l'aleurode sur les plants de mûrier :

Des adultes au stade oviposition de *M. hirsutus* en nombres variables de 1, 10, 20, 30, 40 et 50 ont été déposés sur des plants de mûrier en pot, taillés depuis 40 jours, pour permettre l'infestation.

Chacune des expériences décrites ci-dessus comprend dix répétitions de trois plants de la variété K2. On a relevé quotidiennement l'évolution des symptômes de la maladie de tukra.

RESULTATS ET DISCUSSION

a) Biologie de *M. hirsutus* :

Les résultats sont présentés dans le tableau I. La durée du cycle de *M. hirsutus* est de 23 jours 23 ± 16 h chez les mâles et de 25 jours 11 ± 19 h chez les femelles. Pour ce qui concerne les autres paramètres biologiques, la période précédant l'oviposition, la période d'oviposition et la période post-oviposition sont respectivement de 3 jours 4 ± 5 h, 6 jours 10 ± 13 h et 3 jours 4 ± 12 h. La fécondité moyenne par femelle est de 265 ± 9 oeufs.

Bien qu'il existe un certain nombre d'études sur la biologie de *M. hirsutus* chez diverses plantes hôtes (Hall, 1921 ; Dutt *et al.*, 1951 ; Singh et Ghosh, 1970), les recherches portant sur le mûrier comme plante hôte se limitent aux travaux de Misra (1919) et de Ghose (1972). D'après ces derniers, la durée du cycle de *M. hirsutus* sur le mûrier varie de 23 à 29 jours et la période pré-oviposition de 5 à 6 jours. Toutefois, ces auteurs n'ont pas fourni d'informations sur les périodes d'oviposition et de post-oviposition. Les données obtenues dans cette étude pour ces paramètres permettent de dégager des éléments complémentaires aux connaissances actuelles sur la biologie de *M. hirsutus* chez le mûrier. Néanmoins, les résultats de nos recherches sur les autres paramètres biologiques corroborent fortement ceux de Misra (1919) et Ghose (1972).

b) Incidence saisonnière de la maladie de tukra :

Les résultats sont présentés dans la figure 1. L'incidence moyenne du tukra (aleurode), enregistrée sur une période de trois ans (d'avril 1990 à mars 1993), est de 34,24 %. Elle est maximale (45,92 %) en été (février à mai), devant la saison pluvieuse (32,75 %) (juin à septembre) et l'hiver (25,04 %) (octobre à janvier). L'incidence du tukra est significativement plus élevée ($P < 0,01$) en été que pendant les autres saisons. Cependant, la différence d'incidence entre la saison pluvieuse et l'hiver n'est pas significative.

Misra (1919) a observé que les pépinières de mûrier du district de Murshidabad (Bengale occidentale) étaient fortement infestées par *M. hirsutus* au cours du mois d'avril, qui correspond à l'été. Cependant, il n'a pas fourni d'informations sur les variations saisonnières de l'infestation par l'aleurode.

c) Mode d'apparition de la maladie de tukra :

Les symptômes de la maladie de tukra n'apparaissent pas lorsque l'on adopte diverses méthodes de transmission valables pour les maladies virales comme les méthodes mécaniques et culturales, le greffage et le bouturage. En revanche, les symptômes du tukra se manifestent en 16 jours lorsque les aleurodes sont introduits sur les plants de mûrier. De plus, le nombre de feuilles apicales présentant les symptômes du tukra suit une courbe ascendante proportionnelle à l'augmentation du nombre d'aleurodes introduits, ce qui montre clairement que le degré de symptômes tukra sur une plante est fonction de la densité de la population d'aleurodes infestant cette plante. Cependant, la documentation ne donne aucune information sur le mode d'apparition de la maladie de tukra chez le mûrier.

Cette étude permet donc de démontrer les points suivants :

- 1) Les symptômes du tukra apparaissent en approximativement quinze jours après l'introduction des aleurodes sur la plante.
- 2) La saison a une influence sur l'incidence de la maladie de tukra.
- 3) Aucun virus n'est impliqué dans cette maladie, contrairement à l'hypothèse de Sastry (1984).
- 4) Les symptômes du tukra apparaissent seulement si les plants de mûrier sont infestés par *M. hirsutus*, le tukra n'est donc pas une maladie infectieuse.

En fait, les symptômes du tukra constituent simplement une manifestation de l'infestation par l'aleurode et se limitent à la partie apicale de la plante. Cependant, les résultats présentés ici ne permettent pas d'écarter la possibilité de la présence d'une salive toxique chez *M. hirsutus* qui est injectée dans le système de la plante hôte lorsque le parasite mange la partie apicale, d'où un aspect touffu (malformation) de cette partie de la plante (Hill, 1983).

STUDIES ON ENHANCING EGG PRODUCTION IN THE TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA MYLITTA* D., BY GLUCOSIDES OF STEROIDS AND POLYPHENOLICS

S.K. CHOWDHARY¹, A.B. CHOUDHARY², R.K. KHAJURIA¹ & S.M. JAIN¹

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

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

*The present study relates to egg production enhancer and diapause reducer compounds in the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., with particular reference to fecundity-enhancing and diapause-reducing materials containing sitosterol-3- β -D-glucoside, kaempferol-3- β -rutinoside and quercetin-7- β -rhamnoside, which are useful for reducing the diapause time and increasing fecundity in *A. mylitta* D., isolated from buanol extract of aerial parts of *Cassia tora* Linn.*

Keywords: *Cassia tora*, *Antheraea mylitta* D., fecundity, diapause, sitosterol-3- β -glucoside, kaempferol-3- β -rutinoside and quercetin-7- β -rhamnoside.

INTRODUCTION

Growth and maturation of insect ovaries are under hormonal control. In the majority of species, ovaries are immature in the adult at emergence but become functional after a period ranging from several days to several months. In insects of this type, juvenile hormones seem to play a central role in maturation of ovaries, as revealed by Koeppel *et al.* (1985). On the contrary, in species belonging to the families Saturniidae and Bombycidae, ovaries mature during the pharate adult period and adults are able to copulate and lay eggs immediately after emergence. In insects of these families ecdysteroids seem to replace the function of juvenile hormones (Hagedron, 1985). Ecdysteroids were found to be capable of increasing the weight of ovaries and number of eggs by application of ponasterone A in *Bombyx mori* L., as indicated by Sakurai and Hasegawa (1969). An increase in the number of oocytes was also observed after implantation of ventral glands in *Locusta migratoria* (Jolly, 1971). Insect moulting hormones are found to be widely distributed in the plant kingdom (Nakanishi *et al.*, 1966), since then more than 100 phytoecdysones have been isolated from plants, the most common ones being 20-hydroxyecdysone, ponasterone A and ecdysone in addition to inokosterone, polypodine B and others occurring less frequently in quantity. Various ecdysteroids differing in number and position of their hydroxyl groups were examined for their stimulatory activities in comparison with that of ecdysone or 20-hydroxyecdysone. It was concluded that the hydroxyl group at C2, C20 and C22 has an enhancing effect, whereas that at C24, C25 and C26 has an inhibitory effect on the growth and maturation of ovaries in the case of *Bombyx mori* L., as studied by Ohnishi (1987).

The tasar silkworm, *Antheraea* sp., has very low fecundity as compared to *Bombyx mori* L. The egg laying by female moths occurs also for a prolonged period of 7-8 days in *Antheraea* as compared to one day in *B. mori* L. In addition, it produces 2-3 crops in a year and then undergoes pupal diapause for a period of 5-7 months in trivoltine and bivoltine areas, respectively. Erratic moth emergence and loss of pupae because of high fluctuations in temperature and humidity are again responsible for reducing the seed quantity. This affects directly the tasar industry because the demand for seed is increasing every year for increasing production.

It has been reported that pupal diapause of *Antheraea* sp. can be manipulated through photoperiodism (Beck, 1980), hormonal treatment (Jolly *et al.*, 1973; Chowdhary *et al.*, 1992) and

change in temperature and altitude (Choudhary, 1960). The bioassay of diapause phenomena clearly established that the inactivation of prothoracic glands leads to deficiency of ecdysteroids, which causes pupal diapause. Moreover, termination of pupal diapause of *A. mylitta* has also been studied by the application of phytoecdysteroids (Jolly *et al.*, 1973; Chowdhary *et al.*, 1992). The highest and most rapid emergence of moths of *A. proylei* J. was recorded from diapausing pupae after light treatment of 16 hours for at least 20 days.

Studies on the effect of phytoecdysteroids on the termination of diapause in *A. mylitta* have shown that some phytoecdysteroids from fern species, i.e., *Polystrichum accleatum* and *Pteris cretica*, are effective up to 44-50%, as reported by Jolly *et al.* (1973). Cyasterone when injected to the diapausing pupae gave 80% moth emergence within 3-4 weeks (AR, CSB, 1972-1974). Preservation of seed cocoons of temperate tasar silkworms (*A. proylei*) at low temperatures (15 °C, 10 °C, 5 °C and 2 °C) showed a better survival rate (80-94%) during unfavourable periods (AR, CSB, 1980).

Pupal diapause of *A. mylitta* D. and *A. proylei* J. can be influenced by photoperiods (Tanaka, 1957), low temperatures (Mansingh and Smallman, 1971) and phytoecdysones (Jolly *et al.*, 1973; Chowdhary *et al.*, 1992), but the physiology of diapause, its determination and induction, including erratic moth emergence are still unexplored.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of compounds for preparation of fecundity-enhancing material:

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

Aerial part of *Cassia tora* (425 g) was 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 with chloroform, ethyl acetate and finally with n-butanol. The n-butanol extract was concentrated under reduced pressure to give the residue (8 g). The residue from the n-butanol extract was charged over a silica-gel (60-120 mesh) column. The column was started in ethyl acetate and four active principles were isolated. These compounds were coded as D, E, F and G.

Compound D: The compound was eluted in the ethyl acetate:methanol (90:10) fraction and was crystallised in methanol, m.p. 284°, identified as sitosterol-β-D-glucoside (D) as is evidenced by its ¹H-NMR and the mass spectral data.

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

Compound F: It was eluted in the ethyl acetate:methanol (85:15) fraction and the fractions having the same pattern on the TLC were mixed and the compound was crystallised in methanol. The compound was identified as kaempferol-3-O-rutinoside (F) on the basis of the ¹H-NMR and the mass spectral data of the aglycone and its hydrolysis products (Kim *et al.*, 1992).

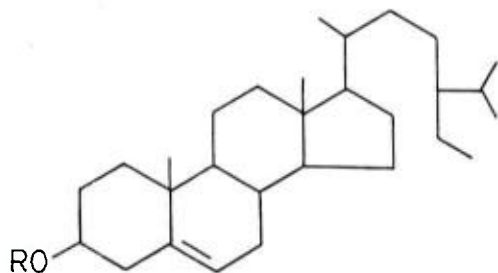
Compound G: The compound was eluted in ethyl acetate:methanol, m.p. 222°. It was identified as quercetin-7-O-rhamnoside (G) on the basis of its hydrolysis products and comparison of ¹H-NMR and the mass spectral data (Mabry *et al.*, 1970).

Chrysophanol-1-O-β-glucoside was also isolated from the butanolic extract of *Cassia tora* but did not show any significant activity.

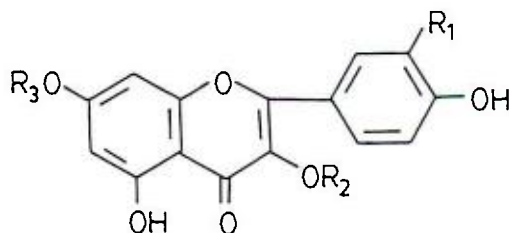
Test animals and method of application:

Sitosterol-3-O-β-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside and quercetin-7-O-rhamnoside were applied to pupae of the tasar silkworm, *A. mylitta*, at 120 days, 150 days and twice at 120 and 150 days, respectively, with a dose of 30 µg/pupa in the first and second treatment and two doses of 10 µg and 15 µg per pupa, respectively, in the third treatment. In the second experiment, a repeated dose of 30 µg

per pupa was applied on the 6th day (1st week), 11th day (2nd week) and 18th day (3rd week), respectively. Pupae of the same size and weight were taken and the compound application was done by dipping abdominal terga in acetone-compound solution in the case of topical application whereas the injection was given with a microsyringe, and isopropyl alcohol was used as solvent. For each compound twelve batches of test animals were taken and each batch consisted of three replicates. Each replicate contained thirty larvae. The control was run by treating with only acetone.



D, R=β-D-glucopyranosyl



F, R₁=H, R₂= β-D-rutinosyl, R₃=H

G, R₁=OH, R₂=H, R₃=β-D-rhamnosyl

Fig. 1: Showing the structures of the compounds used in this study.

Fig. 1 : Structure des composés utilisés dans cette étude.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the application of the three compounds, i.e., sitosterol-3-0-β-D-glucoside, kaempferol-3-0-rutinoside and quercetin-7-0-rhamnoside, are presented in Tables I, II, III and IV. A perusal of the tables shows that the time of application is highly significant with respect to enhancement of fecundity, reduction in time and synchronising of male and female emergence.

Fecundity:

It is evident from Tables I, II, III and IV that all three compounds are effective in increasing fecundity in both the number of eggs laid and the total number of eggs. The most significant results

Table I. Effect of different extracts and pure compounds on the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., showing an increase in egg production.

Tableau I. Effet de différents extraits et de composés purs sur le ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D., montrant une augmentation de la production d'œufs.

Treatment	Nature of application	Sex	Number of pupae treated	Moth emergence span	Number of moths emerged ⁽¹⁾	Time taken for emergence (days)	Egg production (avg.)			Hatching	Pupal mortality no.
							Laid	Unlaid	Total		
Traitement	Type d'application	Sexe	Nombre de chrysalides traitées	Période de l'émergence des papillons	Nombre de papillons émergés ⁽¹⁾	Durée avant l'émergence (jours)	Production d'œufs (moyenne)			Éclosion	Mortalité nymphale (nombre)
							Pondus	Non pondus	Total		
T1	Topical	F	26	17/6-26/7	14 (53.85%)	50.50	153	17	170	79.71	01
	Topique	M	30	18/6-13/7	12 (40.00%)	51.75					03
	Injection	F	13	24/6-8/7	5 (38.46%)	55.80	150	38	188		-
		M	14	18/6-24/7	5 (35.71%)	53.20					01
T2	Topical	F	30	6/6-19/7	20 (66.67%)**	49.85**	295	21	360	91.31	01
	Topique	M	30	4/6-20/7	13 (43.33%)**	47.38**					02
	Injection	F	15	5/6-20/7	6 (40.00%)	46.50**	272	40	312		01
		M	15	2/6-22/7	8 (53.33%)**	48.50**					01
T3	Topical	F	30	18/5-7/7	15 (50.00%)	44.60	241	23	264	63.46	02
	Topique	M	30	31/5-18/7	7 (23.33%)	47.86					07
T4	Topical	F	30	29/5-30/6	14 (46.67%)	48.43	248	20	268	82.28	02
	Topique	M	30	1/6-23/7	18 (60.00%)	42.78					01
Control	Topical	F	30	11/6-27/7	13 (43.33%)	50.61	184	14	198	63.16	-
Témoin	Topique	M	30	24/6-25/7	10 (33.33%)	56.00					-
	Injection	F	15	18/6-18/7	7 (46.67%)	52.47	139	68	207		01
		M	15	23/6-26/7	2 (13.33%)	54.00					01

(1) 1.6.91 to 30.6.1991 / du 01/06/1991 au 30/06/1991.

T1: Alcoholic extract of *Cassia tora* / *Extrait alcoolique de Cassia tora*. **T2:** Butanolic extract of *Cassia tora* / *Extrait butanolique de Cassia tora*. **T3:** Compound F / *Composé F*, kaempferol-3-O-rutinoside. **T4:** Compound G / *Composé G*, quercetin-7-O-rhamnoside.

** Indicates the highest and most significant number of males and females emerged and could mate properly.

** Dénote le nombre le plus élevé et le plus significatif de mâles et de femelles émergés avant pu s'accoupler.

Table II. Effect of phytohormones (30 µg/pupa) applied topically at 150 days of diapause (single treatment) in *Antheraea mylitta* D.

Tableau II. Effet de l'application topique de phytohormones (30 µg/chrysalide) au 150^e jour du développement de la diapause (traitement unique) chez *Antheraea mylitta* D.

Treatment	Sex	Number of pupae	Moth emergence span	Moths emerged (no. and %)	Time taken for emergence (days)	Moth weight (g)	Egg production (No.)			Hatching %	Pupal mortality (No. and %)
							Laid	Unlaid	Total		
Traitement	Sexe	Nombre de chrysalides	Période de l'émergence des papillons	Émergence des papillons (nombre et %)	Durée de l'émergence (jours)	Poids du papillon (g)	Production d'oeufs (nombre)			Éclosion (%)	Mortalité nymphale (nombre et %)
							Pondus	Non pondus	Total		
Control (acetone) Témoin (acétone)	M	30	6/6/93-12/7/93 = 37 days / jours	24 (80.00%)	202.54 ± 2.22	2.76 ± 0.08	-	-	-	-	6 (20.00%)
	F	30	2/6/93-10/7/93 = 38 days / jours	25 (83.33%)	197.47 ± 1.97	6.35 ± 0.21	165 ± 13	31 ± 5	196 ± 12	84.58 ± 2.05	5 (16.67%)
Compound F Composé F	M	30	5/6/93-7/7/93 = 30 days / jours	27 (90.00%)	200.567 ± 1.93	2.89 ± 0.12	-	-	-	-	3 (10.00%)
	F	30	5/6/93-21/7/93 = 46 days / jours	26 (86.67%)	203.08 ± 2.35	6.92 ± 0.25	170 ± 10	51 ± 9	221 ± 10	84.83 ± 2.63	4 (13.33%)
	M	30	6/6/93-14/7/93 = 38 days / jours	26 (86.67%)	200.35 ± 2.37	2.95 ± 0.11	-	-	-	-	4 (13.33%)
	F	30	6/6/93-17/7/93 = 41 days / jours	26 (86.67%)	203.35 ± 2.42	7.10 ± 0.17	215 ± 11	32 ± 4	247 ± 11	83.97 ± 1.86	4 (13.33%)
Compound G Composé G	M	30	14/6/93-13/7/93 = 30 days / jours	24 (80.00%)	204.83 ± 1.93	3.01 ± 0.10	-	-	-	-	6 (20.00%)

Table III. Effect of phytohormones (30 µg/pupa) applied topically at 120 days of diapause development (single treatment) in *Antheraea mylitta* D.

*Tableau III. Effet de l'application topique de phytohormones (30 µg/chrysalide) au 120^e jour du développement de la diapause (traitement unique) chez *Antheraea mylitta* D.*

Treatment	Sex	Number of pupae	Moth emergence span	Moths emerged (no. and %)	Time taken for emergence (days)	Moth weight (g)	Egg production (No.)			Hatching %	Pupal mortality (No. and %)
							Laid	Unlaid	Total		
							Production d'oeufs (nombre)				
Traitement	Sexe	Nombre de chrysalides	Période de l'émergence des papillons	Emergence des papillons (nombre et %)	Durée avant l'émergence (jours)	Poids du papillon (g)	Pondus	Non pondus	Total	Eclosion (%)	Mortalité nymphale (nombre et %)
Control (acetone) Témoin (acétone)	M	30	12/6/93-11/7/93 = 30 days / jours	24 (80.00%)	205.25 ± 1.58	2.87 ± 0.09	-	-	-	-	6 (20.00%)
	F	30	6/6/93-18/7/93 = 43 days / jours	20 (66.67%)	206.50 ± 2.88	6.74 ± 0.37	137 ± 15	63 ± 18	200 ± 21	84.24 ± 2.67	10 (3.33%)
Compound F Composé F	M	30	8/6/93-8/7/93 = 31 days / jours	25 (83.33%)	200.72 ± 1.68	3.42 ± 0.26	-	-	-	-	5 (16.67%)
	F	30	14/6/93-13/7/93 = 30 days / jours	15 (50.00%)	207.00 ± 2.42	6.90 ± 0.32	174 ± 15	51 ± 11	225 ± 13	75.05 ± 5.04	15 (50.00%)
Compound G Composé G	M	30	14/6/93-13/7/93 = 30 days / jours	28 (93.33%)	209.75 ± 1.50	2.66 ± 0.05	-	-	-	-	2 (6.67%)
	F	60	13/6/93-17/7/93 = 35 days / jours	51 (85.00%)	209.88 ± 1.21	7.06 ± 0.15	217* ± 11	27 ± 3	244* ± 11	85.68 ± 1.36	9 (15.00%)
Compound D Composé D	M	30	7/6/93-7/7/93 = 47 days / jours	25 (83.33%)	200.32 ± 1.70	3.20 ± 0.11	-	-	-	-	5 (16.67%)
	F	30	4/6/93-20/7/93 = 31 days	25 (83.33%)	208.04 ± 2.09	6.90 ± 0.24	220* ± 17	36 ± 8	256* ± 14	86.40 ± 1.78	5 (16.67%)

* Indicates the highest number of eggs produced / Dénote le plus grand nombre d'oeufs produits.

Table IV. Effect of phytohormones applied topically twice at 120 and 150 days of diapause development in *Antheraea mylitta* D.⁽¹⁾

Tableau IV. Effet des phytohormones appliquées de manière topique en deux doses au 120^e et au 150^e jour du développement de la diapause chez *Antheraea mylitta* D.⁽¹⁾

Treatment (days)	Sex	Number of pupae	Moth emergence span	Moths emerged (no. and %)	Time taken for emergence (days)	Moth weight (g)	Egg production (No.)			Hatching %	Pupal mortality (No. and %)
							Laid	Unlaid	Total		
Traitement	Sexe	Nombre de chrysalides	Période de l'émergence des papillons	Emergence des papillons (nombre et %)	Durée avant l'émergence (jours)	Poids du papillon (g)	Production d'oeufs (nombre)			Eclosion (%)	Mortalité nymphe (nombre et %)
							Pondus	Non pondus	Total		
Control (acetone)	M	60	9/6/93-13/7/93 = 35 days / jours	45 (75.00%)	206.52 ± 1.06	2.60 ± 0.06	-	-	-	-	15 (25.00%)
Témoin (acétone)	F	60	3/6/93-13/7/93 = 41 days / jours	30 (50.00%)	202.34 ± 2.21	6.11 ± 0.16	118 ± 13	30 ± 6	148 ± 12	79.37 ± 2.31	30 (50.00%)
Compound F	M	60	5/6/93-14/7/93 = 40 days / jours	38 (63.33%)	199.61 ± 1.43	3.36 ± 0.13	-	-	-	-	22 (36.67%)
Composé F	F	60	6/6/93-13/7/93 = 38 days / jours	38 (63.33%)	204.29 ± 1.51	6.51 ± 0.17	151 ± 10	42 ± 7	193 ± 9	78.81 ± 1.59	22 (36.67%)
Compound G	M	60	14/6/93-20/7/93 = 37 days / jours	58 (96.00%)	207.91 ± 1.63	2.82 ± 0.05	-	-	-	-	2 (3.33%)
Composé G	F	60	7/6/93-16/7/93 = 40 days / jours	45 (75.00%)	208.63 ± 1.63	6.82 ± 0.16	190* ± 17	42 ± 6	232* ± 11	83.34 ± 1.64	15 (25.00%)
Compound D	M	60	31/8/93-13/7/93 = 44 days / jours	42 (70.00%)	200.03 ± 1.68	3.18 ± 0.12	-	-	-	-	18 (30.00%)
Composé D	F	60	8/6/93-10/7/93 = 33 days / jours	31 (51.67%)	200.10 ± 1.68	6.95 ± 0.18	138 ± 11	49 ± 7	187 ± 11	85.41 ± 1.97	29 (48.33%)

⁽¹⁾ The doses were 10 µg/pupa and 15 µg/pupa on 120th and 150th day, respectively / Les doses utilisées sont de 10 µg/chrysalide au 120^e jour et de 15 µg/chrysalide au 150^e jour.

were obtained with kaempferol-3-0-rutinoside when application was done at 120 days after pupation. The highest increase of 217 ± 11 eggs as compared to 137 ± 15 eggs in the control (Table III), followed by 190 ± 17 eggs as compared to 118 ± 13 eggs in the control (Table IV), was obtained when two doses were given with compound F. It is clear that the most effective time of application is 120 days after pupation. Application on green pupae from the 6th to the 18th day is not very significant, although a slight increase was observed. Similar observations were made by Chowdhary *et al.* (1992) with alcoholic plant extracts in *A. proylei* J. and Sakurai and Hasegawa (1969) in *Bombyx mori* L. by use of ponasterone A. There was a reduction in the time period of emergence when these 3 compounds were applied. The decrease was from 43 days in the control in females to 30 days and 35 days when sitosterol-3-0- β -D-glucoside and kaempferol-3-0-rutinoside were applied at 120 days after pupation.

Synchronisation of emergence of males and females could also be obtained with application of β -sitosterol-3-0-glucoside to females and kaempferol-3-0-rutinoside to males, as is evident in Table I. Jolly *et al.* (1973) also observed similar results by the use of phytoecdysteroids isolated from fern species of *Polystichum acclatum* and *Pteris cretica* on *A. mylitta*. Chowdhary *et al.* (1992) in *A. proylei*. Chrysophanol glucoside was also studied but it did not show any activity hence it is not included in the tables on the list.

In the present study, the activity of fecundity enhancing and reduction in diapause period was carried out with the formulation from compounds that were steroidal and polyphenolic in nature but giving an activity similar to that of ecdysteroid mimics.

The tasar industry is facing a lot of problems due to the very low fecundity of the tasar silkworm, *A. mylitta* D. The application of glucosides of polyphenols and steroids enhances the production to almost double and hence the problem of shortage of eggs can be solved.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to the Department of Biotechnology (Government of India) for the financial assistance for undertaking these studies. The authors are also thankful to Dr K. Thangavelu, Ex-director, CTR & TI, Ranchi.

REFERENCES

- AR (1972-1974) Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi.
- AR (1979-1980) Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi.
- BECK S.D. (1980) Insect Photoperiodism. Academic Press, New York, 387 pp.
- CHOWDHARY S.K., JAIN S.M., GOYAL R., SHARMA S.D., OGRA R.K. (1992) Plant extracts increasing fecundity in the tasar silkworm, *Antheraea roylei*. Advances in Regulation of Insect Production, p. 51.
- CHOUDHARY S.N. (1960) Diapause and voltinism in some Saturniidae. Bull. Nat. Inst. Sci., 140-147.
- HAGEDRON H.H. (1985) In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert Ed., Pergamon Press, Oxford, New York and Toronto, 8, 205-206.
- JOLLY L. (1971) Action d'implantation des glandes ventricales. 1. Activité génitale des imagos de *Locusta migratoria* L. C.R. Acad. Sci. Paris, 272, 2326-2327.
- JOLLY M.S., AHSAN M.M., AGARWAL S.C. (1973) Role of hormones in terminating pupal diapause *A. mylitta*. Proc. XII International Silk Congress, Barcelona.
- KIM M.N., BOGARET F.L.S., PARIS M. (1992) Flavonoids from *Carthamus tinctorius* flowers. Planta Medica, 58, 285-286.
- KOEPPE J.K., FUCHS M., CHEN T.T., HUNT L.H., KOVALICK G.E., BRIERS T. (1985) The role of juvenile hormones in reproduction. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert Ed., Pergamon Press, Oxford, New York and Toronto, 8, 165-204.
- MABRY T.J., MARKHAN K.R., THOMAS M.B. (1970) In The Systematic Identification of Flavonoids. Academic Press, New York, San Francisco, pp. 127-152.

- MANSINGH A., SMALLMAN B.N. (1971) The influence of temperature and the periodic regulation of diapause in Saturniidae. *J. Insect Physiol.*, 17, 1735-1736.
- NAKANISHI K., KOREDA M., CHANG M.L., HSU H.Y. (1968) Insect hormones. V. The structures of ponasterones B and C. *Tetrahedron*, 1105-1110.
- OHNISHI E. (1987) Growth and maturation of ovaries in isolated abdomens of *Bombyx mori*. Response to ecdysteroids and other steroids. *Zool. Sci.*, 4, 315-321.
- SAKURAI H., HASEGAWA K. (1969) Response of isolated pupal abdomen of silkworm, *Bombyx mori* L., to injected ponasterone A. *Appl. Ent. Zool.*, 4, 59-65.
- TANAKA Y. (1957) Effect of day length during the embryonic stages of a wild silkworm, *A. pernyi*, on pupal diapause. *Proc. Nat. Inst. Genet.*, 7, 24 pp.
- WONG S.M., WONG M.M., SELIGMAN O., WAGNER H. (1989) Anthraquinone glycosides from the seeds of *Cassia tora*. *Phytochem.*, 28(1), 211-214.

ETUDE SUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION D'OEUFs CHEZ LE VER A SOIE TASAR *ANTHRAEA MYLITTA* D. PAR ACTION DES STEROIDES ET DES POLYPHENOLS GLYCOSYLES

S.K. CHOWDHARY¹, A.B. CHOUDHARY², R.K. KHAJURIA¹ & S.M. JAIN¹

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

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

*Cette étude porte sur les composés qui améliorent la production d'oeufs et réduisent la durée de la diapause chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D., et en particulier sur les substances contenant du sitostérol-3-0-β-D-glucoside, du kaempférol-3-0-rutinoside et de la quercétine-7-0-rhamnoside. Ces substances ont été isolées à partir d'extraits butanoliques de parties aériennes de *Cassia tora* Linn.*

INTRODUCTION

La croissance et le développement des ovaires d'insectes sont gouvernés par les hormones. Chez la plupart des espèces, les ovaires sont immatures au moment de l'émergence de l'adulte et deviennent fonctionnels après un délai variant de quelques jours à quelques mois. Chez ces insectes, il semble que les hormones juvéniles jouent le rôle principal dans le développement des ovaires, comme l'ont montré Koeppe et coll. (1985). En revanche, chez les espèces appartenant aux familles des saturnidés et des bombycidés, les ovaires se développent au cours du stade pré-imaginal de l'adulte et les adultes peuvent s'accoupler et pondre des oeufs dès leur émergence. Chez les insectes de ces familles, il semble que les ecdystéroïdes jouent le rôle principal (Hagedron, 1985). Les ecdystéroïdes (ponastérone A) ont pour propriété d'accroître le poids des ovaires et le nombre d'oeufs chez *Bombyx mori* L., comme l'ont indiqué Sakurai et Hasegawa (1969). On a également observé une augmentation du nombre d'ovocytes après implantation de glandes ventrales chez *Locusta migratoria* (Jolly, 1971). Les hormones de mue des insectes sont largement répandues dans le règne végétal (Nakanishi et coll., 1966) puisque plus d'une centaine de phytoecdysones ont été isolées à partir de végétaux, les plus communes étant la 20-hydroxyecdysone, la ponastérone A et l'ecdysone outre l'inokostérone, la polypodine B et d'autres hormones présentes en quantités moins importantes. On a étudié l'activité stimulante de divers ecdystéroïdes, dont les groupes hydroxyls présentent des différences de nombre et de position, par rapport à celle de l'ecdysone ou de la 20-hydroxyecdysone. Il est apparu que le groupe hydroxyl a un effet stimulant en C2, C20 et C22 mais un effet inhibiteur en C24, C25 et C26 sur la croissance et le développement des ovaires chez *Bombyx mori* L. (Ohnishi, 1987).

Le ver à soie tasar *Antheraea* a un taux de fécondité beaucoup plus faible que *Bombyx mori* L. La ponte des oeufs se fait également sur une période plus longue, de 7 à 8 jours chez *Antheraea* contre un jour chez *B. mori* L. Il donne deux à trois générations par an puis entre en diapause nymphale pour une durée de 5 à 7 mois dans les zones trivoltines et bivoltines. L'émergence asynchrone des papillons et la perte de chrysalides due aux importantes fluctuations de température et d'humidité entraînent une diminution de la production de graines. Ceci affecte directement l'industrie tasar, la demande de graines augmentant d'année en année afin d'améliorer la production.

La diapause nymphale d'*Antheraea* peut être modifiée par la photopériode (Beck, 1980), les traitements hormonaux (Jolly et coll., 1973 ; Chowdhary et coll., 1992) et les variations de température et d'altitude (Choudhary, 1960). L'étude biologique des phénomènes liés à la diapause a permis de

démontrer que l'inactivation des glandes prothoraciques entraîne une carence en ecdystéroïdes, ce qui provoque une diapause nymphale. On a également étudié la levée de la diapause nymphale d'*A. mylitta* par application de phytoecdystéroïdes (Jolly et coll., 1973 ; Chowdhary et coll., 1992). L'émergence la plus rapide et la plus forte pour les papillons d'*A. proylei* J. a été obtenue chez les chrysalides diapauses après exposition à une photopériode de 16 heures pendant au moins 20 jours.

Des études sur l'effet des phytoecdystéroïdes sur la levée de la diapause chez *A. mylitta* ont permis de démontrer que certains phytoecdystéroïdes issus d'espèces de fougères (*Polystichum acleatum* et *Pteris cretica*) ont une efficacité de 44 à 50 % (Jolly et coll., 1973). L'injection de cyastérone dans les chrysalides en diapause donne un taux d'émergence de 80 % en 3 à 4 semaines (AR, CSB, 1972-1974). La conservation des cocons destinés au grainage du ver à soie tassar des zones tempérées (*A. proylei*) à faible température (15 °C, 10 °C, 5 °C et 2 °C) permet d'obtenir une amélioration du taux de survie (80 à 94 %) au cours des périodes défavorables (AR, CSB, 1980).

La diapause nymphale d'*A. mylitta* D. et d'*A. proylei* J. peut être influencée par les photopériodes (Tanaka, 1957), les basses températures (Mansingh et Smallman, 1971) et les phytoecdysones (Jolly et coll., 1973 ; Chowdhary et coll., 1992) ; cependant, la physiologie de la diapause, sa détermination, son induction et l'asynchronisme n'ont pas encore été étudiés.

MATERIELS ET METHODES

Isolement des composés destinés à la préparation du matériel d'amélioration de la fécondité :

Les points de fusion ont été déterminés avec un appareil de point de fusion SL 152 et ne sont pas corrigés. Les spectres UV ont été effectués avec un spectrophotomètre UV Hitachi 320. Les spectres $^1\text{H-NMR}$ et $^{13}\text{C-NMR}$ ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Jeol Fx-90Q avec TMS comme standard interne. Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre de masse JMS-D 300.

Les parties aériennes de *Cassia tora* (425 g) ont été pulvérisées et extraites avec une solution de méthanol aqueux à 50 % dans l'appareil de Soxhlet. Le solvant issu de l'extrait a été éliminé sous vide pour donner un résidu qui a été dilué dans l'eau et fractionné avec du chloroforme, de l'acétate d'éthyle puis du n-butanol. L'extrait n-butanolique a été concentré à faible pression afin d'obtenir le résidu (8 g). Le résidu d'extrait n-butanolique a été déposé sur une colonne de gel de silice (60 à 120 mesh). La colonne a été éluée dans de l'acétate d'éthyle et quatre principes actifs ont pu être isolés. Ces composés ont été dénommés D, E, F et G.

Composé D : Ce composé a été élué dans une fraction acétate d'éthyle:méthanol (90:10) et cristallisé dans du méthanol, point de fusion : 284 °, il s'agit de sitostérol- β -D-glucoside d'après les données obtenues pour le spectre $^1\text{H-NMR}$ et les spectres de masse.

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

Composé F : Ce composé a été élué dans une fraction acétate d'éthyle:méthanol (85:15) ; les fractions présentant le même profil sur chromatographie en couche mince ont été mélangées et le composé a été cristallisé dans du méthanol. Il s'agit de kaempférol-3-0-rutinoside (F) d'après les données spectrales $^1\text{H-NMR}$, les spectres de masse et les produits hydrolysés (Kim et coll., 1992).

Composé G : Ce composé a été élué dans de l'acétate d'éthyle:méthanol, point de fusion 222 °. Il s'agit de quercétine-7-0-rhamnoside (G) d'après les produits de l'hydrolyse et après comparaison du spectre $^1\text{H-NMR}$ avec les spectres de masse (Mabry et coll., 1970).

On a également isolé du chrysophanol-1-0- β -glucoside à partir de l'extrait butanolique de *Cassia tora* mais cette substance ne présente pas une activité statistiquement significative.

Animaux testés et méthode d'application :

Des chrysalides du ver à soie tassar *A. mylitta* ont été traitées avec du sitostérol-3-0- β -glucoside, du kaempférol-3-0-rutinoside et de la quercétine-7-0-rhamnoside. Elles ont reçu une dose de 30 μg

par chrysalide au 120e jour dans le premier traitement, une dose de 30 µg par chrysalide au 150e jour dans le deuxième traitement ; dans le troisième traitement, elles ont reçu respectivement deux doses de 10 µg et de 15 µg par chrysalide au 120e et au 150e jour. Dans une deuxième expérience, une dose répétée de 30 µg par chrysalide a été administrée le 6e jour (première semaine), le 11e jour (deuxième semaine) et le 18e jour (troisième semaine). On a choisi des chrysalides de taille et de poids identiques et les composés ont été administrés en trempant le tergum abdominal dans une solution acétone-composé pour l'application topique tandis que l'injection a été effectuée à l'aide d'une microseringue avec de l'alcool isopropylique comme solvant. Douze lots d'animaux ont été traités pour chaque composé, chaque lot comprenant trois répétitions de 30 larves. Le témoin a été traité à l'acétone.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'application des trois composés (sitostérol-3-0-β-D-glucoside, kaempférol-3-0-rutinoside et quercétine-7-0-rhamnoside) sont présentés dans les tableaux I, II, III et IV. La lecture des tableaux révèle que le moment de l'application est fortement significatif pour ce qui concerne l'amélioration de la fécondité, la diminution de la durée de la diapause et la synchronisation de l'émergence des mâles et des femelles.

Fécondité :

Les résultats des tableaux I, II, III et IV montrent clairement que l'application des trois composés entraîne une augmentation de la fécondité tant pour le nombre d'oeufs pondus que pour le nombre total d'oeufs. Le kaempférol-3-0-rutinoside appliqué 120 jours après la nymphose donne les résultats les plus significatifs. Le composé F appliqué en deux doses donne l'augmentation la plus forte du nombre d'oeufs avec 217 ± 11 oeufs par rapport au témoin (137 ± 15 oeufs) (Tableau III), devant 190 ± 17 oeufs contre 118 ± 13 oeufs (chez le témoin) (Tableau IV). Il est clair que le moment d'application le plus efficace est le 120e jour après la nymphose. Le traitement des chrysalides fraîches entre le 6e et le 18e jour n'est pas très significatif, bien qu'on observe une légère augmentation. Des résultats similaires ont été obtenus par Chowdhary et coll. (1992) avec des extraits alcooliques de plantes chez *A. proylei* et par Sakurai et Hasegawa (1969) après application de ponastérone A chez *Bombyx mori* L. On observe une réduction de la durée avant l'émergence après application des trois composés. La période avant émergence est de 43 jours chez le témoin contre 30 et 35 jours pour les femelles traitées au sitostérol-3-0-β-glucoside et au kaempférol-3-0-rutinoside 120 jours après la nymphose.

On obtient également une synchronisation de l'émergence des mâles et des femelles après application de β-sitostérol-3-0-glucoside chez les femelles et de kaempférol-3-0-rutinoside chez les mâles, comme le montre le tableau I. Jolly et coll. (1973) ont obtenu des résultats similaires après utilisation de phytoecdystéroïdes isolés à partir des fougères *Polystrichum acleatum* et *Pteris cretica* chez *A. mylitta* et Chowdhary et coll. (1992) chez *A. proylei*. Le chrysophanol glycosylé a également été étudié mais n'a pas donné de résultats significatifs et n'a donc pas été inclus dans les tableaux.

Dans cette étude, l'amélioration de la fécondité et la réduction de la durée de la diapause ont été obtenues avec des formulations de composés qui sont de nature stéroïde et polyphénolique mais ont une activité identique aux mimétiques d'ecdystéroïdes.

L'industrie tasar est confrontée à un grand nombre de problèmes en raison de la fécondité très faible du ver à soie tasar *A. mylitta* D. L'application de glucosides de polyphénols et de stéroïdes permet de multiplier pratiquement par deux la production et, ainsi, de résoudre le problème du manque d'oeufs.

ASSOCIATION OF MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERS OF *MACHILUS BOMBYCINA* WITH THE FEEDING BEHAVIOUR OF *ANTHERAEA ASSAMA*

R.L. HAZARIKA¹, L.K. HAZARIKA², A. KATAKY², J.C.S. KATAKY³,
A.K. HAZARIKA³ & P.C. DEKA^{1*}

1. Agricultural Biotechnology Programme, 2. Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat - 785013, Assam, India. 3. Regional Research Laboratory, Jorhat 785006, Assam, India.

Morphological and biochemical analysis of the leaves of the most preferred and least preferred (by the muga silkworm, Antheraea assama) idiotypes of Machilus bombycina revealed that the former type of leaves is less pubescent, small-sized, contains a greater number of veins and a shorter petiole compared to its counterpart. Concentrations of major essential oils like dodecanal, decanal, caryophyllene and borneol were found to be much higher in the most preferred idio type than in the least preferred. Among the 6 phenolic compounds, 7,2',4'-trimethoxy 3,5 dihydroxyflavone and myrcetin were found to be in much higher concentrations in the most preferred type while 3',4'-dimethylquercetin, quercetin, 2',4'-dimethylmorin and morin were in much higher concentrations in the least preferred idio type.

INTRODUCTION

Antheraea assama Westwood is a multivoltine commercial silkworm, native to Assam, India, and feeds on evergreen woody laurels, primarily on *Machilus bombycina* King (Lauraceae) (Bardoloi and Hazarika, 1992). *M. bombycina* is cross-pollinated and generally propagated through seeds, resulting in a large genotypic variation among the seedlings. It is endemic to north-east India (Choudhury, 1981) and has several idiotypes. Based on certain morphological traits, these were grouped into five categories (Katakya and Hazarika, 1993). *A. assama* larvae prefer to feed on the leaves of specific idiotypes. We have identified the most preferred and least preferred idiotypes of *M. bombycina* by continuous feeding tests with *A. assama* over a period of three years (Katakya and Hazarika, 1993). Analysis of physical and biochemical properties of these idiotypes may help us to understand the mechanism of host selection by *A. assama* larvae. Out of hosts of secondary plant metabolites, phenolics and essential oils were suggested to play major roles in host preference by saturniids (Janzen and Waterman, 1984) and *Bombyx mori* L. (Hammamura, 1970), respectively. Similar reports on *A. assama* are not available. This report aims at analysing certain morphological characters as well as phenolic and essential oil contents in the leaves of the most preferred and least preferred idiotypes of *M. bombycina*.

MATERIALS AND METHODS

Several idiotypes (collected from different locations of Assam) of *M. bombycina* (5-6 years old) growing in the orchard of the Horticulture Department, Assam Agricultural University, Jorhat, were utilised.

* To whom correspondence should be addressed.

Leaf morphological characters like leaf size, hairs/mm² of leaf, veins/leaf, length of leaf petiole and leaf thickness were recorded for the available idiotypes. Based on these data as well as on the rate of feeding by the larvae (in which they showed a graded preference), they were grouped into 5 categories (Kataky and Hazarika, 1993). Subsequently, based on the leaf consumption per day by the fourth as well as fifth instar and effective rate of rearing of *A. assama*, the most preferred and the least preferred idiotypes were identified from these 5 different categories for estimation of phenolics and essential oils.

The average leaf area was determined from 10 mature leaves of equal age from each idiotype with the help of a leaf area meter (Systronics, Bombay). The average number of hairs/mm² was counted from 10 cut pieces of leaves under a compound microscope using a micrometer. The leaf thickness was measured under a microscope from microtomy cross sections of the leaves. The average number of veins/leaf was visually counted. The length of the leaf petiole was also measured. These data were statistically analysed using Student's t test.

Extraction and analysis of essential oils:

During June-July 1993, fresh mature leaves (3 kg) were hydro-distilled in a Clevenger apparatus for 4 h to extract essential oils; physical properties were also determined by following standard procedures. Analysis of essential oil components was done with the help of a Gas Liquid Chromatograph (model Varian 3700) equipped with a Flame Ionisation Detector. A mixed phase of 10% SP-1000 + 1% H₃PO₄ coated on HMDS-treated chromosorb W, 80/100 mesh column was used for the separation of all the components present in the oil. The peaks in the chromatogram were identified by matching their retention time on this column with those of authentic compounds scanned under identical conditions. The area percentage of individual components was calculated from the peaks by the area normalisation method. The compounds thus identified were further confirmed by GC-MS (model Finnigan Mat INCOS-50).

Extraction and analysis of phenolics:

Two hundred g of fresh leaves were crushed in a mechanical homogeniser (Bajaj, India) and extracted with cold methanol. The extract after concentration was treated with 2% aqueous NaOH solution, which was then extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was subjected to preparative TLC for separation of individual phenolic compounds. Relative concentrations of individual phenolic compounds were estimated by weighing the TLC purified fractions. Individual components were identified by analysing through Mass (model Finnigan Mat INCOS-50) and NMR (model Varian EM 390) (90 MHz) spectroscopy.

Analysis of the essential oils and phenolics was repeated three times and the average values are shown in the tables.

RESULTS

Table I shows comparison of 5 morphological characters of leaves between the most preferred and the least preferred idiotypes. In the most preferred type, the leaf size, length of leaf petiole and hairs/mm² were smaller or lower whereas veins/leaf were higher than in the other type. The rate of leaf consumption by the fourth instar larvae was more than double in the most preferred idiotypes compared to the least preferred ones, which was highly significant. Similarly, the rate of leaf consumption by fifth instar larvae was more than three times in the most preferred idiotypes compared to the least preferred ones. This was also found to be highly significant (Table II).

For every 300 g of leaves distilled, 0.1 ml of essential oil was obtained (yield 0.03 % on a fresh weight basis). Camphene, nonanal, decanal, caryophyllene, borneol, dodecanal and tetradecanal were identified from the leaves of *M. bombycina* (Fig. 1). Although there was no qualitative variation of these essential oils between the two idiotypes, the quantitative variation was very prominent (Table III). The most dominant essential oils in the most preferred idiotype were in the order of dodecanal > caryophyllene > decanal > borneol which constituted more than 46% of the total whereas,

Table I. Certain leaf morphological characters of the most preferred and least preferred idiotypes of *M. bombycina*.*Tableau I. Certains caractères morphologiques des feuilles de l'idiotype le plus apprécié et de l'idiotype le moins apprécié de M. bombycina.*

Morphological characters	Most preferred	Least preferred	t value
Caractères morphologiques	Idiotype le plus apprécié	Idiotype le moins apprécié	Valeur t
Leaf size (cm ²)	9.67 ± 0.91	13.57 ± 0.81	5.68*
Taille de la feuille (cm ²)	(10)	(10)	
Length of petiole (mm)	8.5 ± 0.37	12.3 ± 0.48	4.39*
Longueur du pétiole (mm)	(10)	(10)	
Leaf thickness (mm)	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.08	NS
Épaisseur de la feuille (mm)	(10)	(10)	
Veins/leaf	16.8 ± 0.48	14.8 ± 0.42	4.28*
Nervures/feuille	(10)	(10)	
Hairs/mm ² of a leaf (mm)	179.66 ± 1.47	314 ± 0.83	9.2*
Poils/mm ² de feuille (mm)	(3)	(3)	

* Significant at $p = 0.01$ / Significatif à $p = 0.01$.

NS: Non significant / Non significatif.

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

Table II. Rate of feeding by fourth instar and fifth instar *A. assama* on two idiotypes of *M. bombycina*.*Tableau II. Taux d'alimentation des larves d'A. assama au quatrième et au cinquième âge sur les deux idiotypes de M. bombycina.*

Idiotype	Mean ± standard error feeding area (cm ²) per day Surface (cm ²) d'alimentation moyenne par jour ± écart type	
	4th instar / 4e âge	5th instar / 5e âge
Least preferred	37.73 ± 1.59	139.63 ± 3.62
Le moins apprécié	(3)	(3)
Most preferred	75.40 ± 7.56	458.63 ± 6.73
Le plus apprécié	(3)	(3)
t value / Valeur t	8.69	6.16

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

in the other type, they were dodecanal > decanal > borneol > caryophyllene, constituting more than 14% of the total. Excepting camphene, the percentage of the rest of the oils was comparatively higher in the most preferred idio type than in the least preferred. The difference was, however, very prominent in the case of caryophyllene and dodecanal. Among the unidentified fractions, some components were in much higher quantities in the least preferred than in the most preferred type.

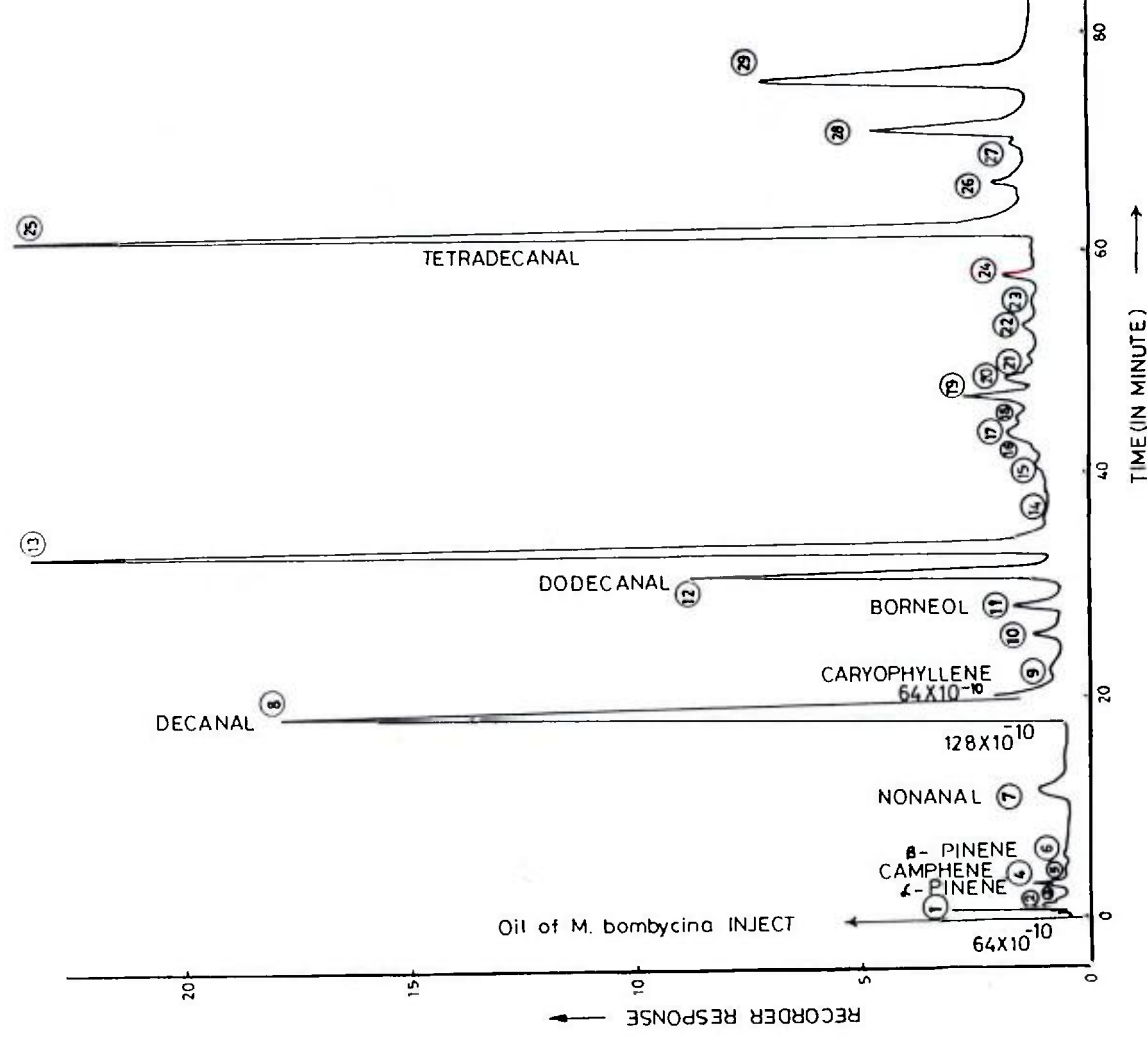


Fig. 1: Gas chromatogram of essential oils derived from the leaves of *Machilus bombycina*.

Fig. 1 : Chromatographie en phase gazeuse d'huiles essentielles issues de feuilles de *Machilus bombycina*.

The physical properties of the oils present in the two idiotypes varied. The refractive index, specific gravity and optical rotation were found to be 1.4565, 0.88530 and (-)1.04, respectively, in the most preferred type and 1.4575, 0.89520 and (-)1.63, respectively, in the least preferred type.

Table III. Quantitative variation of essential oil components in two *Machilus* idiotypes.

Tableau III. Variations quantitatives de composants d'huiles essentielles chez deux idiotypes de Machilus.

Component <i>Composants</i>	Quantity (%) / <i>Quantité (%)</i>	
	Most preferred <i>Le plus apprécié</i>	Least preferred <i>Le moins apprécié</i>
Camphene / <i>Camphène</i>	0.480	0.973
Nonanal	0.152	0.078
Decanal / <i>Décanal</i>	5.833	4.205
Caryophyllene / <i>Caryophyllène</i>	10.982	1.226
Borneol / <i>Bornéol</i>	4.989	2.151
Dodecanal / <i>Dodécanal</i>	25.095	6.584
Tetradecanal / <i>Tétradécanal</i>	1.952	0.640
Unidentified / <i>Non identifié</i>	50.517	84.144

Six phenolic compounds were isolated and identified from the leaves of *M. bombycina*. These were characterised as 3',4'-dimethylquercetin, 7,2',4'-trimethoxy-3,5-dihydroxyflavone, quercetin, 2',4'-dimethylmorin, morin and myrcetin on the basis of physical and spectral evidence (Table IV). The quantity of individual phenolic compounds, however, varied between the idiotypes. Among the six compounds, the quantities of 7,2',4'-trimethoxy-3,5-dihydroxyflavone (0.07%) and myrcetin (0.07%) were much higher in the most preferred than in the least preferred type in which they were 0.2% and 0.03%, respectively. On the other hand, all other four phenolic compounds were in much higher quantities in the least preferred idio type than in the most preferred (Table V). 7,2',4'-trimethoxy-3,5-dihydroxyflavone and myrcetin together constituted 0.14% in the most preferred against 0.05% in the least preferred idio type. On the other hand, the group of the other four compounds constituted 0.16% in the most preferred against 0.28% in the least preferred idio type.

DISCUSSION

Thinly pubescent leaf types were preferred by the larvae of *A. assama* over densely pubescent ones. The leaf consumption and larval growth of *Melanoplus sanguinipes* (F.) was reported to be minimum on densely pubescent *Artemesia* leaves (Smith and Grodwitz, 1983). A hairy cotton variety was reported to be the most resistant to spider mites and leaf-hoppers (Kamel and Elkassaby, 1965). Choudury (1981) reported that *M. bombycina* idiotypes having large-sized leaves were not preferred. Our observations support this view. Veins form the skeleton of a leaf to act as channels for transporting materials from or to the leaf. These are made up of cellulose and silica which act as swallowing factors for *Bombyx mori* (L.) larvae (Hamamamura *et al.*, 1962). This may be true for *A. assama* too, as indicated by the presence of a large number of veins/leaf in the most preferred idio type. It was apparent that leaves with a short leaf petiole are preferred. We observed that larvae rejected the leaves of the

non preferred type by gnawing off the leaves at the long petiole. Such a habit exists in *Choristoneura pinus* and *Papilio glaucus* (L.) which also gnaw leaves off (Mattson and Scriber, 1987).

Table IV. Characterisation of flavonoids from the leaves of *Machilus bombycina*.

Tableau IV. Caractérisation des flavonoïdes des feuilles de *Machilus bombycina*.

Sl no. N° d'ordre	Melting point Point de fusion	Spectral data Données spectrales	Identified as Identification
1	285-286 °C	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ ; M+330; UV (MeOH): 252, 360 nm, (MeOH/AlCl ₃): 260, 276, 387 nm; PMR (TMS-ether): δ 3.8 (s, 2-OCH ₃) 6.2 (d, J = 2Hz, 1H), 7.6-7.8 (m, 3H)	3',4'-dimethyl quercetin* 3',4'-diméthyl quercétine*
2	296-297 °C	C ₁₈ H ₁₆ O ₇ ; M+344; UV (MeOH): 240, 269, 340 nm, (MeOH/AlCl ₃): 262, 275, 390 nm; PMR (TMS-ether): 6.2 (d, J = 2Hz, 1H), 6.4 (d, J = 2Hz, 1H), 3.8 and / et 3.9 (2s, 3-OCH ₃), 7.6-7.9 (m, 3H)	7,2',4'-trimethoxy 3,5-dihydroxyflavone* 7,2',4' triméthoxy 3,5-dihydroxyflavone*
3	309-310 °C	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ; M+302; UV (MeOH): 255, 369 nm; (MeOH/AlCl ₃): 270, 460 nm; PMR (TMS-ether): 6.2 (d, J = 2Hz, 1H), 6.5 (d, J = 2Hz, 1H), 7.7-7.9 (m, 3H)	Quercetin Quercétine
4	280-281 °C	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ ; M+330; UV (MeOH): 242, 269 340 nm, (MeOH/AlCl ₃): 260, 276, 387 nm; PMR (TMS-ether): 6.1 (d, J = 2Hz, 1H), 6.4 (d, J = 2Hz, 1H), 3.8 and / et 3.9 (2s, 2-OCH ₃), 7.5-7.8 (m, 3H)	2',4'-dimethylmorin 2',4'-diméthylmorine
5	301-303 °C	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ ; M+318; UV (MeOH): 254, 264, 370 nm; (MeOH/AlCl ₃): 268, 352, 421 nm; PMR (TMS-ether): 6.2 (d, J = 2Hz, 1H), 6.4 (d, J = 2Hz, 1H), 7.6-7.8 (m, 3H)	Morin Morine
6	343-344 °C	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ ; M+318; UV (MeOH): 255, 372 nm; (MeOH/AlCl ₃): 269, 450 nm; PMR (TMS-ether): 6.2 (d, J = 2Hz, 1H), 6.4 (d, J = 2Hz, 1H), 7.4 (s, 2H)	Myrcetin Myrcétine

* New compound / Nouveau composant.

While analysing essential oils in the leaves of two different idiotypes, some major components like caryophyllene and dodecanal were found to act as attractants, while some others (unidentified compounds) acted as repellents to *A. assama* larvae. The higher quantity of attractants along with the lower quantity of repellents in the most preferred leaves might stimulate the feeding of muga silkworms. Hammamura *et al.* (1962) showed that the feeding behaviour of *B. mori* larvae was dependent sequentially on three factors: attractants (citral, linalylacetate, linalool and terpenyl

acetate), biting (sugar, sitosterol, isoquercitrin and morin) and swallowing (cellulose, silica and phosphate). A number of essential oils from umbelliferous plants serve as token stimuli for attracting and stimulating larval feeding (Dethier, 1941).

Table V. Comparative abundance of different phenolic compounds in two *Machilus* idiotypes.

Tableau V. Abondance comparée de différents composés phénoliques chez deux idiotypes de Machilus.

Sl no. N° d'ordre	Compound Composé	Quantity (%) / Quantité (%)	
		Most preferred <i>Le plus apprécié</i>	Least preferred <i>Le moins apprécié</i>
1	3',4'-dimethylquercetin / 3',4'-diméthylquercétine	0.05	0.08
2	7,2',4'-trimethoxy 3,5-dihydroxyflavone <i>7,2',4' triméthoxy 3,5-dihydroxyflavone</i>	0.07	0.02
3	Quercetin / <i>Quercétine</i>	0.02	0.05
4	2',4'-dimethylmorin / <i>2',4'-diméthylmorin</i>	0.03	0.06
5	Morin / <i>Morine</i>	0.06	0.09
6	Myrcetin / <i>Myrcétine</i>	0.07	0.03

Based on the quantitative variation of certain phenolics between two idiotypes, 7,2',4'-trimethoxy 3,5 dihydroxyflavone and myrcetin may be suggested as biting stimulants (as they were relatively higher in the most preferred type, Table V) and the other four as biting deterrents to *A. assama* larvae. However, the quantity of each component would determine the condition of the leaves that results in their acceptance or rejection by the larva (Hanson, 1970). Janzen and Waterman (1984) showed that saturniid hosts are rich in phenolics. Although flavonoids and related phenolic compounds act as strong feeding deterrents to many insects, they may sometimes be stimulatory to others (McFarlane and Distler, 1982; Nelson *et al.*, 1979).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Assam Science, Technology and Environment Council, Guwahati, and CSIR, New Delhi.

REFERENCES

- BARDOLOI S., HAZARIKA L.K. (1992) Seasonal variation of body weight, blood volumes and hemocyte population of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae). Environ. Entomol., 21(6), 1398-1403.
- CHOUDHURY S.N. (1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam.
- DETHIER V.G. (1941) Chemical factors determining the choice of food plants by *Papilio* larvae. Amer. Nat., 75, 61-73.

- HAMMAMURA Y., HAYASHIYA K., NAITO K., MATSUURA K., NISHIDA J. (1962) Food selection by silkworm larvae. *Nature*, 194, 754-755.
- HAMMAMURA Y. (1970) The substances that control the feeding and growth of the silkworm, *Bombyx mori* L. In *Control of Insect Behaviour by Natural Products*. Eds. D.L. Wood, R.M. Silverstein & M. Nakajima, Academic Press, New York, pp. 55-80.
- HANSON F.E. (1970) Sensory responses of phytophagous lepidoptera to chemical and tactile stimuli. In *Control of Insect Behaviour by Natural Products*. Eds. D.L. Wood, R.M. Silverstein & M. Nakajima, Academic Press, New York, pp. 55-80.
- JANZEN D.H., WATERMAN P.L. (1984) A seasonal census of phenolics, fibres and alkaloids in foliage of forest trees in Costa Rica: Some factors influencing their distribution and relation to host selection by Sphingidae and Saturniidae. *Biol. J. Linn. Soc.*, 21, 439-454.
- KAMEL S.A., ELKASSABY F.Y. (1965) Relative resistance of cotton varieties in Egypt to spider mites, leaf hoppers and aphids. *J. Econ. Entomol.*, 58(2), 209-212.
- KATAKY A., HAZARIKA L.K. (1993) Performance of *Antheraea assama* on various idiotypes of *Machilus bombycina*. A paper presented in the Annual Technical Session, Assam Sci. Soc., Dec. 28, Dibrugarh Univ., Assam.
- MATTSON W.J., SCRIBER J.M. (1987) Nutritional ecology of insect folivores of woody plants: nitrogen, water, fibre and mineral consideration. In *Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders and Related Invertebrates*. Eds. F. Slansky Jr. and J.W. Rodriguez, John Wiley and Sons, New York, pp. 105-146.
- McFARLANE J.E., DISTLER M.H.W. (1982) The effect of rutin on growth, fecundity and food utilization in *Achilus domesticus* L. *J. Insect Physiol.*, 28, 85-88.
- NEILSON J.K., LARSON L.M., SORENSEN H. (1979) Host plant selection of horse radish flea beetle, *Phyllotreta arvensis* (Coleoptera: Chrysomellidae): Identification of two flavonol glycosides stimulating feeding in combination with glucosinolates. *Entomol. Exp. Appl.*, 26, 40-48.
- SMITH S.G.F., GRODWITZ G.U. (1983) Effect of non glandular trichomes of *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae) on ingestion, assimilation and growth of the grasshoppers *Hypochlora alba* (Dodge) and *Melanoplus sanguinipes* (F.) (Orthoptera: Acrididae). *Environ. Entomol.*, 12, 1766-1772.

RELATION ENTRE LES CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE *MACHILUS BOMBYCINA* ET LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE D'*ANTHERAEA ASSAMA*

R.L. HAZARIKA¹, L.K. HAZARIKA², A. KATAKY², J.C.S. KATAKY³,
A.K. HAZARIKA³ & P.C. DEKA^{1*}

1. Agricultural Biotechnology Programme. 2. Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat - 785013, Assam, Inde. 3. Regional Research Laboratory, Jorhat 785006, Assam, Inde.

*L'analyse morphologique et biochimique des feuilles de l'idiotype le plus apprécié et de l'idiotype le moins apprécié par le ver à soie muga (*Antheraea assama*) de *Machilus bombycina* révèle que les feuilles du premier type sont moins pubescentes, de plus petite taille et ont davantage de nervures, un pétiole plus court que les feuilles du deuxième type. Les huiles essentielles principales comme le dodécane, le décane, le caryophyllène, le bornéol sont présentes en quantités nettement plus élevées dans l'idiotype le plus apprécié. Parmi les six composés phénoliques, la 7,2',4'-triméthoxy flavone et la myrcétine sont présentes en quantités nettement plus élevées dans l'idiotype le plus apprécié, tandis que la 3',4'-diméthyl quercétine, la quercétine, le 2',4'diméthylmorin et le morin sont présents en quantités nettement plus élevées chez l'idiotype le moins apprécié.*

INTRODUCTION

Antheraea assama Westwood est un séricigène polyvoltin d'intérêt commercial, originaire de l'Assam (Inde). Cet insecte se nourrit de lauriers arborescents à feuilles persistantes, principalement *Machilus bombycina* King (Lauraceae) (Bardoloi et Hazarika, 1992). *M. bombycina* se reproduit par pollinisation indirecte et se propage généralement par les graines, ce qui entraîne une forte variation génotypique entre les plantules. C'est une espèce endémique du nord-est de l'Inde (Choudhury, 1981) qui possède plusieurs idiotypes. Sur la base de certains caractères morphologiques, ces idiotypes ont été répartis en cinq catégories (Katakya et Hazarika, 1983). Les larves d'*A. assama* préfèrent les feuilles de certains idiotypes. Nous avons identifié les idiotypes de *M. bombycina* les plus appréciés et les moins appréciés par *A. assama* après des tests de nourrissage en continu sur une période de trois ans (Katakya et Hazarika, 1993). L'analyse des propriétés physiques et biochimiques de ces idiotypes peut permettre de comprendre le mécanisme de la sélection de l'hôte par les larves d'*A. assama*. Parmi les métabolites des plantes hôtes secondaires, les phénols et les huiles essentielles semblent jouer un rôle majeur dans la préférence de l'hôte respectivement chez les saturniidés (Janzen et Waterman, 1984) et chez *Bombyx mori* L. (Hammamura, 1970). Ce type d'information n'existe pas pour *A. assama*. Cette étude vise à analyser certains paramètres morphologiques ainsi que la teneur en phénols et en huiles essentielles des feuilles de l'idiotype le plus apprécié et de l'idiotype le moins apprécié de *M. bombycina*.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

On a utilisé plusieurs idiotypes de *M. bombycina* (prélevés sur différents sites d'Assam) âgés de 5 à 6 ans et cultivés dans le verger du département d'horticulture de l'*Assam Agricultural University* (Jorhat).

Les caractères morphologiques de la feuille comme la taille, le nombre de poils/mm², le nombre de nervures, la longueur du pétiole et l'épaisseur de la feuille ont été relevés pour tous les idiotypes sélectionnés. Sur la base de ces données et du taux d'alimentation des larves (qui donne leur degré de préférence), les idiotypes ont été répartis en cinq catégories (Kataky et Hazarika, 1993). Dans une deuxième étape, en fonction de la consommation de feuilles par jour au quatrième et au cinquième âge et du taux effectif d'élevage d'*A. assama*, on a identifié, dans ces cinq catégories, l'idiotype le plus apprécié et l'idiotype le moins apprécié afin d'estimer leur contenu en phénols et en huiles essentielles.

La surface foliaire moyenne a été déterminée à partir de 10 feuilles matures d'un même âge pour chacun des idiotypes à l'aide d'un planimètre (Systronics, Bombay). Le nombre moyen de poils/mm² a été déterminé à la loupe binoculaire à partir de 10 fragments foliaires. L'épaisseur de la feuille a été mesurée au microscope en utilisant des coupes transversales foliaires effectuées au microtome. La longueur du pétiole a également été mesurée. Les données obtenues ont été soumises à une analyse statistique selon le test t de Student.

Extraction et analyse des huiles essentielles :

En juin-juillet 1993, des feuilles fraîches matures (3 kg) ont été hydrodistillées dans un appareil de Clavenger pendant 4 heures afin d'extraire les huiles essentielles. L'analyse des composants des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (modèle Varian 3700) équipée d'un détecteur d'ionisation de combustion. Une phase mixte de 10 % SP 1000 + 1 % H₃PO₄ coulée sur une colonne chromosorbe W de 80/100 meshes, traitée au HDMS, a été utilisée pour séparer les composants présents dans l'huile. Les pics du chromatogramme ont été identifiés en comparant leur temps de rétention sur cette colonne avec celui des composés de référence observés dans des conditions identiques. Le pourcentage de la surface des composants individuels a été calculé à partir des pics selon la méthode de normalisation des surfaces. Les composés identifiés ont été confirmés par GC-MS (modèle Finnigan Mat INCOS 50).

Extraction et analyse des phénols :

Deux cent grammes de feuilles fraîches ont été broyées dans un homogénéisateur mécanique (Bajaj, Inde) et extraits avec du méthanol froid. Après concentration, l'extrait a été traité dans une solution de NaOH aqueuse à 2 % et a ensuite été extrait avec du CH₂Cl₂. La phase organique a été soumise à une TLC préparatoire pour séparer les composés phénoliques individuels. La concentration relative de chacun des composés phénoliques a été estimée en pesant les fractions purifiées par TLC. Les composés individuels ont été identifiés par spectroscopie de masse (modèle Finnigan Mat INCOS 50) et NMR (modèle Varian EM 390) (90 MHz).

L'analyse des huiles essentielles et des phénols a été répétée trois fois ; les valeurs moyennes sont présentées dans les tableaux.

RESULTATS

Le tableau I présente la comparaison de cinq caractères morphologiques foliaires entre l'idiotype le plus apprécié et l'idiotype le moins apprécié. Chez l'idiotype le plus apprécié, la taille de la feuille, la longueur du pétiole et le nombre de poils/mm² sont inférieurs et le nombre de nervure par feuille est supérieur aux valeurs obtenues pour l'idiotype le moins apprécié. Le taux de consommation des feuilles par les larves du quatrième âge est deux fois plus élevé pour l'idiotype le plus apprécié ; ceci est fortement significatif. De même, le taux de consommation des feuilles par les larves du cinquième âge est trois fois plus élevé avec l'idiotype le plus apprécié ; ce résultat est également fortement significatif (Tableau II).

Pour 300 g de feuilles distillées, on obtient 0,1 ml d'huile essentielle (rendement de 0,03 % en poids frais). On a identifié le camphène, le nonane, le décane, le caryophyllène, le bornéol, le dodécane et le tétradécane dans les feuilles de *M. bombycina* (Fig. 1). Bien qu'il n'y ait aucune variation significative de la qualité de ces huiles essentielles entre les deux idiotypes, la variation quantitative est très importante (Tableau III). Les huiles essentielles dominantes chez l'idiotype préféré sont présentes dans l'ordre suivant : dodécane > caryophyllène > caryophyllène > décane > bornéol, qui représentent plus de 46 % du total ; chez l'autre type, l'ordre de présence des huiles essentielles est dodécane > décane > bornéol > caryophyllène, représentant 14 % du total. A l'exception du camphène, la teneur en huiles essentielles est comparativement plus élevée dans l'idiotype le plus apprécié. La différence est tout à fait marquée pour le caryophyllène et le dodécane. Pour ce qui concerne les fractions non identifiées, certains composants sont présents en quantités beaucoup plus importantes dans l'idiotype le moins apprécié.

Les propriétés physiques des huiles présentes dans les deux idiotypes sont variables. L'indice de réfraction, la densité et la rotation optique sont respectivement de 1,4565, 0,88530 et -1,04 chez l'idiotype le plus apprécié et de 1,4575, 0,89520 et -1,63 chez l'idiotype le moins apprécié.

Six composés phénoliques ont été isolés et identifiés dans les feuilles de *M. bombycina*. D'après les données spectrales et physiques, ces composés sont la 3',4'-diméthyl quercétine, la 7,2',4-triméthoxy-3,5-dihydroxyflavone, la quercétine, la 2',4'-diméthylmorine, la morine et la myrcétine (Tableau IV). La teneur individuelle en phénols varie entre les idiotypes. Parmi les six composés, les teneurs en 7,2',4-triméthoxy-3,5-dihydroxyflavone (0,07 %) et en myrcétine (0,07 %) sont nettement plus élevées chez l'idiotype le plus apprécié que chez l'idiotype le moins apprécié, chez lequel elles sont respectivement de 0,02 % et 0,03 %. En outre, les quatre autres composés phénoliques sont présents en quantités beaucoup plus importantes chez l'idiotype le moins apprécié (Tableau V). La 7,2',4-triméthoxy-3,5-dihydroxyflavone et la myrcétine représentent 0,14 % chez l'idiotype le plus apprécié contre 0,05 % chez l'idiotype le moins apprécié. Les quatre autres composés représentent 0,16 % chez l'idiotype le plus apprécié contre 0,28 % chez l'idiotype le moins apprécié.

DISCUSSION

Les larves d'*A. assama* préfèrent les feuilles de type peu pubescent aux feuilles fortement pubescentes. La consommation de feuilles et la croissance des larves de *Melanophus sanguinipes* (F.) sont minimales lorsque les larves sont nourries avec des feuilles d'*Artemesia* fortement pubescentes (Smith et Grodwitz, 1983). Il a été observé qu'une variété de coton velu avait une résistance maximale au tétranyque et à la cicadelle (Kamel et Elkassaby, 1965). Choudhury (1981) a observé que les idiotypes de *M. bombycina* à grandes feuilles n'étaient pas appréciées. Nos résultats corroborent ces observations. Les nervures forment le squelette de la feuille et servent de canaux de circulation des substances dans la feuille. Elles sont composées de cellulose et de silice qui sont des facteurs de déglutition chez les larves de *B. mori* (L.) (Hammamura et coll., 1962). Ceci pourrait également s'appliquer à *A. assama*, comme le montre la présence d'un grand nombre de nervures par feuille chez l'idiotype le plus apprécié. Il est clair que les larves préfèrent les feuilles à pétiole court. Nous avons observé que les larves rejettent les feuilles de l'idiotype le moins apprécié en arrachant avec leurs mandibules les feuilles à pétiole long. Ce type de comportement existe également chez *Choristoneura pinus* et *Papilio glaucus* (L.) qui arrachent également les feuilles avec leurs mandibules (Mattson et Scriber, 1987).

L'analyse des huiles essentielles des feuilles des deux idiotypes montre que certains composants majeurs comme le caryophyllène et le dodécane sont des facteurs d'attraction tandis que certains autres (composés non identifiés) sont anti-appétants pour les larves d'*A. assama*. Il se peut que la teneur plus élevée en substances appétantes et plus faible en substances anti-appétantes dans les feuilles les plus appréciées stimule la prise de nourriture chez le ver à soie muga. Hammamura et coll. (1962) ont montré que le comportement alimentaire des larves de *B. mori* était fonction de trois facteurs qui sont, par ordre d'importance : les substances appétantes (citral, linalylacétate, linalol, acétate de terpényle), le mordant (sucre, sitostérol, isoquercitrine, morine) et la déglutition (cellulose, silice et phosphate). Un certain nombre d'huiles essentielles issues de plantes ombellifères ont une fonction d'attraction et de stimulation dans l'alimentation des larves (Dethier, 1941).

Sur la base des variations quantitatives de certains phénols entre les deux idiotypes, on suggère que la 7,2',4-triméthoxy-3,5-dihydroxyflavone et la myrcétine stimulent le mordant (car elles sont présentes en relativement plus grande quantité chez l'idiotype le plus apprécié, tableau V) tandis que les quatre autres composés sont des facteurs d'inhibition du mordant pour les larves d'*A. assama*. La quantité de chacun des composants détermine la condition de la feuille et son acceptation ou son rejet par la larve (Hanson, 1970). Janzen et Waterman (1984) ont démontré que les hôtes de saturniidés sont riches en phénols. Bien que les flavonoides et les composés phénoliques apparentés soient fortement inhibiteurs pour de nombreux insectes, ils peuvent parfois avoir une action stimulante pour certains autres (McFarlane et Distler, 1982 ; Neilson et coll., 1979).

INCREASE OF SILK PRODUCTION AND QUANTITATIVE CHANGES OF CARBOHYDRATE AND PROTEIN IN THE FAT BODY AND HAEMOLYMPH AFTER FEEDING POTASSIUM SULPHATE TO BIVOLTINE *BOMBYX MORI* L.

R.B. NIRWANI & B.B. KALIWAL

Department of Zoology, Karnatak University, Dharwad - 580 003, India.

Potassium sulphate (K_2SO_4) in different doses (500 μ g, 1000 μ g, 2000 μ g) was fed to bivoltine (NB4D2) silkworms, *Bombyx mori* (L.), in the fourth and fifth instars to study the larval and post-larval parameters. Treatment of all different doses led to a significant increase in economic parameters like female cocoon and shell weights and male cocoon and shell weights and also to a significant increase in the oviposition. However, the larval duration was significantly decreased when compared with that of the control. The fat body glycogen content increased significantly at lower doses, whereas the haemolymph trehalose content increased in all the concentrations of the K_2SO_4 treatment. However, there was no significant change in the protein content of the fat body and haemolymph. The above results indicate that potassium sulphate may stimulate the metabolic activity, thereby increasing the economic parameters in *Bombyx mori* (L.).

Keywords: Potassium sulphate, cocoon, fat body, haemolymph, glycogen, trehalose, protein, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The feeding of various chemicals along with artificial diet is reported to affect the growth and development of insects. The requirement of different minerals in various insects has been investigated (House, 1974). It has been reported that in some adult insects the requirement of salts may be related to the reproductive function of the female (Bracken, 1965; Singh and Brown, 1957).

Feeding the silkworm race Nistari with cobalt chloride-treated leaves increases the larval weight, cocoon shell weight and fecundity (Chakraborty and Medda, 1978a) as well as enhances the silk gland weight and decreases its glycogen content (Bhattacharyya and Medda, 1981a). It also increases the metabolic activities and the alkaline acid phosphatase activity of the silk gland (Bhattacharyya and Medda, 1981b, 1983). Feeding of mulberry leaves soaked in potassium iodide increases the economic parameters but reduces the larval duration in the silkworm, *Bombyx mori* (Chakraborty and Medda, 1978b). However, a high concentration of potassium iodide decreases the fecundity. Dietary supplementation of copper sulphate, nickel chloride and potassium iodide in different doses increases the economic parameters of the silkworm. However, there is a significant decrease in the larval duration (Magadum, 1987). Trace amounts of minerals, i.e., calcium, magnesium and iron, and their salts present in the rain water presumably stimulate the metabolic activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* (L.), resulting in a shorter larval duration and increase in the effective rearing rate, oviposition and silk content of cocoons (Thangavelu and Bania, 1990). Eri silkworm larvae fed with leaves treated with four mineral salts, cupric chloride, zinc chloride, manganese sulphate and copper sulphate, show an increase in the body weight, affecting the glycogen, protein and trehalose levels in the fat body and haemolymph (Padaki, 1991).

However, there are no reports on the effect of potassium sulphate (K_2SO_4) on the economic parameters and biochemical constituents of a bivoltine breed of the silkworm, *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

The eggs of bivoltine silkworm were obtained from the Sericulture Training Centre, Rayapur, Dharwad, and reared in the laboratory by the improved method of rearing techniques (Krishnaswami, 1978b, 1978c). The silkworms were maintained on fresh mulberry leaves. The fourth instar larvae were divided into three experimental groups, each group was further divided into three sub-groups, each consisting of five replications of 20 larvae.

The chemical potassium sulphate (K_2SO_4) obtained from Pragati Chemicals Industries, Ltd., Hyderabad, was individually dissolved in distilled water and diluted to three different concentrations, i.e., 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g/ml}$. Fresh mulberry leaves were soaked for 30 minutes in each concentration and then were dried and fed to silkworms alternately with untreated mulberry leaves out of four feedings per day (two feedings with treated leaves + two feedings with untreated leaves). The controls were fed with leaves soaked in distilled water and normal leaves.

After the treatment, the pre- and post-cocooning parameters and also cocooning parameters were observed. The larval duration and larval weight were taken at the end of the fifth instar and the silk gland weight was taken before commencement of the spinning activity at the end of the fifth instar. The mean values of the results are shown in Tables I and II and each mean value is the observation of 10 larvae. The experiments were conducted twice to conclude the results. The data collected were subjected to the analysis of variance test to find out the significance between the parameters of the untreated and treated groups (Snedecor and Cochran, 1967). The per cent values for cocooning, female and male cocoon shell ratio and hatching percentage were transformed into sine angular values for statistical analysis.

Preparation of tissues:

Fifth instar larvae were used for the estimation on the sixth day. The larvae were dissected in *Bombyx* saline at pH 6.5. The fat body was immediately collected and used for the glycogen and protein estimation. The haemolymph collected in a free chilled centrifuge tube was used for estimation of protein and trehalose.

The anthrone method (Sciefter *et al.*, 1950) was followed for determination of the glycogen content. Protein estimation was done according to Lowry *et al.* (1951). Trehalose was estimated according to the method of Roe *et al.* (1955). Anthrone-positive carbohydrate in the haemolymph is considered as trehalose.

The results were analysed statistically by using Student's 't' test as per the method formulated by Snedecor (1948).

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the effect of potassium sulphate on the larval duration, larval weight, male and female cocoon weights, shell weights, shell ratio, cocooning percentage, fecundity and hatching percentage are summarised in Tables I and II.

Larval duration:

The present results indicate a significant decrease in the larval duration in all groups by the treatment of K_2SO_4 when compared with that of the control. Similar results were obtained (Chakraborty and Medda, 1978b; Majumdar, 1982) in *Bombyx mori* fed on potassium iodide at 20, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$. However, it is not known why the larval duration decreased.

Larval weight:

A significant increase in the larval weight was seen in almost all K_2SO_4 -treated groups. However, the maximum increase (43%) was observed at doses of 1000 μg and 2000 μg (Table I). These results are much higher than those obtained by treatment of 20 μg and 25 μg of potassium iodide in Nistari race of *Bombyx mori* (Chakraborty and Medda, 1978a; Majumdar, 1982). The treatment of 50 μg and 100 μg of potassium iodide decreased the larval weight in Nistari race of *Bombyx mori* (Majumdar, 1982).

Table I. Effect of potassium sulphate on pre- and post-cocooning parameters of the silkworm, *Bombyx mori*.**Tableau I. Effet du sulfate de potassium sur les paramètres pré- et post-filage du ver à soie *Bombyx mori*.**

Groups	Treatment doses (µg/ml)	Larval duration (hr)	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Cocooning (%)	Fecundity (no.)	Hatching (%)
Groupes	Traitements et doses (µg/ml)	Durée larvaire (h)	Poids larvaire (g)	Poids de la glande séricigène (g)	Filage (%)	Fécondité (nombre)	Éclosion (%)
I	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 500	790* (97)	3.394* (132)	1.204* (120)	94.24* 76.23** (103)	706* (120)	93.92 76.73** (99)
II	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 1000	789* (97)	3.686* (143)	1.344* (134)	96.03* 78.71** (105)	655* (111)	86.82 68.64** (91)
III	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 2000	786* (97)	3.681* (143)	1.280* (127)	94.04 75.86** (103)	688* (117)	91.09 72.64** (96)
IV	Carrier control <i>Témoin</i>	808 (99)	2.696 (105)	0.931 (93)	86.60 70.29** (94)	589 (100)	92.87 74.50** (98)
V	Untreated control <i>Témoin non traité</i>	810 (100)	2.567 (100)	1.001 (100)	91.26 72.98** (100)	585 (100)	94.52 76.48** (100)
	Standard ± error	0.847	0.071	0.031	0.925	15.980	1.672
	<i>Ecart type ±</i>						
	Critical difference at 5%	2.609	0.207	0.090	2.850	47.902	-
	<i>Seuil à 5%</i>						

* Significant at 5% / *Significatif au seuil de 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*Per cent increase/decrease over untreated controls in parentheses / *Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage d'augmentation/diminution par rapport aux témoins.*NS: Not significant / *Non significatif.*

There was an increase in the larval weight, which might be due to the stimulatory effect of K_2SO_4 on the body weight, since potassium iodide is suggested to stimulate the body growth in Nistari race of *Bombyx mori* (Majumdar, 1982) or might possibly be due to the increase in the midgut enzyme activity since copper sulphate increases the midgut activity in *L. decemlineata* (Izhevskiy, 1976). The higher concentration of minerals like phosphorus and potassium in castor leaves than in tapioca is attributed to stimulate the intake of food and, correspondingly, increases the larval body weight in the eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt (Joshi, 1981).

Silk gland weight:

The present results show a significant increase in the silk gland weight in all three treatments when compared with the controls. The maximum increase (34%) was observed at the dose of 1000 μg of K_2SO_4 (Table I). The increase in the silk gland weight might be due to the increased metabolic activity by the treatment of K_2SO_4 . Similar results were obtained in *Bombyx mori* treated with cobalt chloride, cobalt sulphate and potassium iodide (Bhattacharyya and Medda, 1981b).

Female and male cocoon weights, cocoon shell weight and cocoon shell ratio:

The cocoon weight in males and females increased significantly, following the treatment of 500 μg and 2000 μg of K_2SO_4 with per cent increase of 34 and 36, respectively. The shell weight of both males and females increased significantly with per cent increases of 32 and 31, respectively, in all three different doses of K_2SO_4 treatment when compared with the control. The increase in the cocoon weight has been reported with feeding of 25 μg of potassium iodide in *Bombyx mori* (Majumdar, 1982). The increase in the cocoon and shell weights might be due to the stimulatory effect of K_2SO_4 on the silk gland protein synthesis. Similar results were obtained (Chakraborti and Medda, 1978a) in Nistari race treated with potassium iodide. However, there was no significant change in the cocoon shell ratio in both sexes of silkworms compared to the control.

Cocooning percentage:

There was a significant increase in the cocooning percentage at the concentrations of 500 and 1000 μg ; however, the group treated at the concentration of 2000 μg of K_2SO_4 , did not show any significant change when compared with the control (Table I).

Fecundity:

The fecundity increased significantly in all three concentrations of potassium sulphate-treated groups, maximum increase (20%) was obtained in the 500 μg treated groups, as compared with that of the control (Table I). Feeding of potassium iodide and copper sulphate increases the fecundity in the Pure Mysore race of *Bombyx mori* (Magadam, 1987). The increase in the fecundity might be due to the stimulatory effect of K_2SO_4 on the oviposition or on the reproductive function, as reported in some adult insects that the requirement of salt may be related to the reproductive function of the female (Bracken, 1965; Singh and Brown, 1957).

Hatching percentage:

There was no significant change in the percentage of egg hatching in all the treated groups when compared with that of the control.

Hence, it is opined that minerals and their salts accelerate the growth of silkworms through orientation of the physiological activity, thereby reducing the larval duration and increasing the oviposition rate in the adult and silk content in the cocoon (Magadam, 1987; Thangavelu and Bania, 1990).

Biochemical parameters:

Carbohydrate and proteins are among the biochemical constituents of the insect fat body and haemolymph. The present study indicates the dietary effects of K_2SO_4 on carbohydrate and proteins of the fat body and haemolymph in the silkworm.

Table II. Effect of potassium sulphate on cocooning parameters of the silkworm, *Bombyx mori*.**Tableau II. Effet du sulfate de potassium sur les paramètres du filage du ver à soie *Bombyx mori*.**

Groups	Treatment doses (µg/m)	Female cocoon weight (g)	Female cocoon shell weight (g)	Female cocoon shell ratio (%)	Male cocoon weight (g)	Male cocoon shell weight (g)	Male cocoon shell ratio (%)
Groupes	Traitements et doses (µg/ml)	Poids du cocon femelle (g)	Poids de la coque femelle (g)	Richesse soyeuse femelle (%)	Poids du cocon mâle (g)	Poids de la coque mâle (g)	Richesse soyeuse mâle (%)
I	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 500	1.894* (128)	0.320* (124)	16.95 24.26** (96)	1.603* (134)	0.325* (132)	20.30 26.74** (98)
II	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 1000	2.010* (136)	0.337* (131)	16.86 24.19** (96)	1.584* (133)	0.325* (132)	20.51 26.91** (99)
III	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 2000	1.942* (131)	0.324* (126)	16.72 24.10** (95)	1.478* (124)	0.306* (124)	20.77 27.22** (100)
IV	Carrier control <i>Témoin</i>	1.411 (95)	0.265 (103)	18.93* 25.73** (108)	1.250 (105)	0.255 (105)	20.51 26.98** (99)
V	Untreated control <i>Témoin non traité</i>	1.473 (100)	0.257 (100)	17.51 24.59** (100)	1.189 (100)	0.246 (100)	20.70 27.02** (100) NS
	Standard ± error <i>Ecart type ±</i>	0.048	0.005	0.441	0.030	0.004	0.32
	Critical difference at 5% <i>Seuil à 5%</i>	0.137	0.015	1.264	0.086	0.011	

* Significant at 5% / *Significatif au seuil de 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*Per cent increase/decrease over untreated controls in parentheses / *Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage d'augmentation/diminution par rapport aux témoins.*NS: Not significant / *Non significatif.*

Table III. Effect of potassium sulphate on carbohydrate and protein in the fat body and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.Tableau II. Effet du sulfate de potassium sur les hydrates de carbone et les protéines du corps adipeux et de l'hémolymph du ver à soie *Bombyx mori*.

Groups	Treatment doses (µg/m)	Fat body	Haemolymph	Fat body	Haemolymph
		Glycogen	Trehalose	Protein	Protein
Groupes	Traitements et doses (µg/m)	Corps adipeux	Hémolymph	Corps adipeux	Hémolymph
		Glycogène	Tréhalose	Protéines	Protéines
A	Untreated control <i>Témoin non traité</i>	12.000 ± 0.767	445.500 ± 17.443	67.200 ± 3.079	2916 ± 112.008
B	Carrier control <i>Témoin porteur</i>	14.666 ± 1.130	403.500 ± 8.784	76.866 ± 4.625	3070 ± 126.783
C	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 500	20.600 ^b ± 1.192	527.160 ^b ± 31.603	63.999 ^a ± 2.573	2310 ^b ± 106.066
D	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 1000	19.666 ^a ± 1.238	480.900 ^a ± 25.590	77.333 ± 3.011	2220 ^b ± 92.951
E	Potassium sulphate <i>Sulfate de potassium</i> 2000	17.733 ± 1.007	615.300 ^c ± 14.700	89.866 ± 3.708	2952 117.957

Glycogen and protein from the fat body are expressed in terms of µg/mg wet weight of tissue.

Trehalose and protein from the haemolymph are expressed in terms of µg/ml.

M ± SE: Mean of 5 observations ± standard error / *Moyenne de cinq observation ± écart type.*

Le glycogène et les protéines du corps adipeux sont exprimés en µg/mg de poids frais de tissu.

Le tréhalose et les protéines de l'hémolymph sont exprimés en µg/ml.

Significance / *Signification* :

a = P < 0.05; b = P < 0.01; c = P < 0.001.

There was a significant increase in the fat body glycogen and haemolymph trehalose contents in all K₂SO₄-treated groups. However, the glycogen content in the groups treated with 2000 µg did not show any significant change when compared with that of the control (Table III). The accumulation of glycogen during feeding of *Philosamia ricini* is attributed to the increased amylase activity and glycogenesis (Pant and Morris, 1969). The mineral salts cupric chloride, zinc chloride, manganese sulphate and copper sulphate fed to eri silkworm larvae showed an accumulation of lipids, glycogen, trehalose and depletion of proteins in the fat body and haemolymph of fifth instar larvae (Padaki, 1991). Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis occurs in the fat body in the middle of the

last instar (Inagaki and Yamashita, 1986). The absolute amount of trehalose present in the fat body is directly related to the glycogen content of the tissue (Downer, 1979) and the results showed that trehalose production in insect fat body is influenced by a number of endogenous organic and inorganic factors. The level of total sugar is changed by hydrolytic enzymes in the gut and haemolymph and is due to various intermediary metabolic pathways in phosphorylation (Ito and Tanaka, 1959). On this evidence, the present results show that the increase in the glycogen and trehalose contents in the fat body and haemolymph could be due to the stimulatory effect of K_2SO_4 on the metabolism and also it could be one of the inorganic factors.

The fat body has been shown to be the main site of protein synthesis as well as intermediary metabolism of amino acids. The present study shows that dietary supplementation of K_2SO_4 to the silkworm, *Bombyx mori*, resulted in a significant decrease in fat body protein in the 500 μg - and haemolymph protein in the 500 μg -treated groups. However, fat body protein of 1000 and 2000 μg and haemolymph protein of 2000 μg of K_2SO_4 -treated groups did not show any significant change when compared with the control (Table III). Dasmahapatra *et al.* (1989) showed that feeding of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate to *B. mori*, race Nistari, increases silk gland protein, RNA and DNA contents. Probably, the process involved in the synthesis of protein and nucleic acids in the silk gland were activated by these metallic salts. Padaki (1991) showed that in the eri silkworm, *Philosamia ricini*, the feeding of cobalt sulphate increases the rate of protein synthesis in early stages while in the fifth instar it shows depletion. Ilan and Ilan (1973) showed that growth and development of insects are controlled by neuroendocrinal secretions. It could then be anticipated that the protein metabolism of an insect is controlled by these secretions of neuroendocrine organs. Kim (1983) showed a decrease in the concentration of haemolymph protein after the larvae of *Bombyx mori* start secreting silk.

On these bases, the present results indicated that the significant decrease in the protein level of the fat body and haemolymph might be due to the effect of K_2SO_4 on the metabolic activity. However, further investigation is necessary to study the effect of K_2SO_4 on metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their sincere thanks to Karnatak University, Dharwad, for providing financial assistance and Prof. M.A. Hooli, Chairman, P.G. Dept. of Zoology, and Prof. C.J. Savanurmath, i/c, Dept. of Sericulture, Karnatak University, Dharwad, for providing necessary facilities. Thanks are also due to Sri S.N. Mageri, Assistant Professor in Statistics, Agricultural University, Dharwad, for statistical analysis.

REFERENCES

- BHATTACHARYYA A., MEDDA A.K. (1981a) Effect of cyanocobalamin and cobalt chloride on lipid content of silkgland of *Bombyx mori* L., race Nistari. Sci. and Cult., 47, 140-141.
 BHATTACHARYYA A., MEDDA A.K. (1981b) Effect of cyanocobalamin and cobalt chloride on glycogen content of silkgland of *Bombyx mori* L., race Nistari. Sci. and Cult., 47, 268-270.
 BHATTACHARYYA A., MEDDA A.K. (1983) Histochemical studies of the effects of cyanocobalamin and cobalt chloride on the alkaline and acid phosphatase activity in silkgland of silkworm, *Bombyx mori*, race Nistari. Zahr. Canat. Ontog. Tiere, 110, 403-410.
 BRACKEN G.K. (1965) Effects of dietary components on fecundity of the parasitoid, *Exeristes comstockii* (Cress) (Hymenoptera: Ichneumonidae). Can. Entomol., 97, 1037-1041.
 CHAKRABORTHY M.K., MEDDA A.K. (1978a) Effect of potassium iodide on silkworms (*Bombyx mori* L.), Nistari race. Sci. and Cult., 44, 231-233.
 CHAKRABORTHY M.K., MEDDA A.K. (1978b) Effect of cobalt chloride on silkworm (*Bombyx mori* L.), Nistari race. Sci. and Cult., 44, 406-408.
 DASMAHAPATRA A.K., CHAKRABORTHY M.K., MEDDA A.K. (1989) Effect of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate on protein, RNA and DNA content of silkgland of silkworm (*Bombyx mori* L.), Nistari race. Sericologia, 29(3), 355-359.

- DOWNER R.G.H. (1979) Trehalose production in isolated fat body of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Comp. Biochem. Physiol., 62C, 31-34.
- HOUSE H.L. (1974) The Physiology of Insecta. Rockstein ed., Academic Press, New York, 5, 37.
- ILAN Joseph, ILAN Judith (1973) Protein synthesis and insect metamorphosis. An. Rev. Ent., 18, 167-182.
- INAGAKI S., YAMASHITA O. (1986) Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 16(2), 327-331.
- ITO T., TANAKA M. (1959) Administration of the nutrients to the silkworm larvae. 1. Effect of the administration of glucose. Sanshi Shikenjo Hokoku, 15, 353-364.
- IZHEVSKIY S.S. (1976) The physiological effects of mineral salts on *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). Ecologiya, 4, 90-92.
- JOSHI K.L. (1981) Nutritional physiology of Lepidoptera: Evaluation of four dietary regimen for eri silk moth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep., Saturniidae). Ph.D. thesis, Jodhpur Univ., India, 140.
- KIM H.P., YOE S.M., YOON W.S. (1983) The development and distribution of haemolymph proteins during the fifth instar larval and pupal stages of *Bombyx mori*. Korean J. Entom., 13(1), 71-78.
- KRISHNASWAMI S. (1978a) Improved method of rearing young age (chawki) silkworm. CSRTI, Mysore, Bull. No. 3, 1-27.
- KRISHNASWAMI S. (1978b) New technology of silkworm rearing. CSRTI, Mysore, Bulletin No. 1, 1-19.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.I., FORR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAJUMDAR A.C. (1982) Note on the physiological effects on the growth and reproduction of silkworm fed on mulberry leaves soaked in potassium iodide. Indian J. Agri. Sci., 52, 250-252.
- MAGADUM S.B. (1987) Studies on the effect of some chemicals and hormones on the gonads and the life cycle of silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. thesis, Karnatak University, Dharwad, 1-330.
- PADAKI P.R. (1991) Some aspects of physiology of the eri silkworm, *Philosamia ricini*. Ph.D. thesis, Karnatak University, Dharwad, 1-247.
- PANT R., MORRIS I.D. (1969) Changes in the activity of phosphorylase activity and glycogen content during larval and pupal development of *Philosamia ricini*. J. Biochem. (Tokyo), 66, 23-31.
- ROE J.H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. Arch. Biochem., 25, 424-428.
- SCIEFTER S., DAYTON S., NOVIC B., MYNTIYLER E. (1950) The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch. Biochem., 25, 191.
- SINGH K.R.P., BROWN A.W.A. (1957) Nutritional requirement of *Aedes aegypti* L. J. Insect Physiol., 1, 199-200.
- SNEDECOR G.W. (1948) Statistical Methods. Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G. (1967) Statistical Methods. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
- THANGAVELU K., BANIA H.R. (1990) Preliminary investigation on the effects of minerals in the rain water on the growth and reproduction of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29(1), 37-43.

AUGMENTATION DE LA PRODUCTION DE SOIE ET MODIFICATIONS DE LA QUANTITE D'HYDRATES DE CARBONE ET DE PROTEINES DANS LE CORPS ADIPEUX ET L'HEMOLYMPHE APRES ALIMENTATION DE VERS A SOIE *BOMBYX MORI* BIVOLTINS AVEC DU SULFATE DE POTASSIUM

R.B. NIRWANI & B.B. KALIWAL

Department of Zoology, Karnatak University, Dharwad - 580 003, Inde.

*Du sulfate de potassium (K_2SO_4) à différentes concentrations (500 µg, 1000 µg, 2000 µg) a été administré oralement à des vers à soie *Bombyx mori* L. bivoltins (NB₄D₂) au quatrième et au cinquième âge afin d'en étudier les effets sur les paramètres larvaires et post-larvaires. Le traitement à toutes les concentrations testées donne une augmentation significative des paramètres d'intérêt économiques comme le poids du cocon et de la coque de la femelle ainsi que le poids du cocon et de la coque du mâle ; on observe également une augmentation significative de l'oviposition. La durée larvaire diminue de manière significative par rapport à celle du témoin. La teneur en glycogène du corps adipeux augmente de manière significative chez les lots traités avec de faibles concentrations de K_2SO_4 , tandis que la teneur en tréhalose de l'hémolymphe augmente à toutes les concentrations. Cependant, il n'y a pas de modification significative de la teneur en protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe. Ces résultats indiquent que le sulfate de potassium pourrait stimuler l'activité métabolique, entraînant ainsi une amélioration des paramètres d'intérêt économique chez *Bombyx mori* L.*

INTRODUCTION

L'addition de diverses substances dans les aliments artificiels affecte la croissance et le développement des insectes. On a étudié les besoins nutritionnels de différents insectes pour ce qui concerne les minéraux (House, 1974). Chez certains insectes adultes, les besoins en sels pourraient être liés à la fonction de reproduction de la femelle (Bracken, 1965 ; Singh et Brown, 1957).

Les larves de la race de ver à soie Nistari nourries avec des feuilles traitées au chlorure de cobalt présentent une augmentation du poids larvaire, du poids de la coque et de la fécondité (Chakraborti et Medda, 1978a) ainsi que du poids de la glande séricigène et une diminution de leur teneur en glycogène (Bhattacharyya et Medda, 1981a). Ce traitement entraîne également une augmentation des activités métaboliques de la glande séricigène et de l'activité phosphatase acide et alcaline de la glande séricigène (Bhattacharyya et Medda, 19981b, 1983). Le nourrissage avec des feuilles de mûrier trempées dans de l'iodure de potassium donne une alimentation des paramètres économiques et une diminution de la durée larvaire chez le ver à soie *Bombyx mori* (Chakraborti et Medda, 1978b). Cependant, à forte concentration, l'iodure de potassium entraîne une réduction de la fécondité. L'addition, dans la nourriture, de sulfate de cuivre, de chlorure de nickel et d'iodure de potassium à différentes concentrations entraîne une amélioration des paramètres économiques du ver à soie ; on observe une diminution significative de la durée larvaire (Magadum, 1987). On suppose que des quantités infimes de minéraux comme le calcium, le magnésium et le fer ainsi que leurs sels présents dans l'eau de pluie stimulent l'activité métabolique chez le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L., entraînant une diminution de la durée larvaire et une augmentation du taux effectif d'élevage, de l'oviposition et du contenu en soie du cocon (Thangavelu et Bania, 1990). Les larves du ver à soie eri

nourries avec des feuilles traitées avec quatre sels minéraux différents (chlorure cuprique, chlorure de zinc, sulfate de manganèse et sulfate de cuivre) présentent une augmentation de poids, ce qui affecte les niveaux de glycogène, de protéines et de tréhalose dans le corps adipeux et l'hémolymphe (Padaki, 1991).

Cependant, il n'existe aucune étude sur l'effet du sulfate de potassium (K_2SO_4) sur les paramètres économiques et les composants biochimiques des races bivoltines du ver à soie *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Des oeufs de vers à soie bivoltins fournis par le *Sericulture Training Centre* de Rayapur (Dharwad) ont été élevés en laboratoire selon la méthode d'élevage améliorée (Krishnaswami, 1978b, 1978c). Les vers à soie ont été nourris avec des feuilles de mûrier fraîches. Les larves du quatrième âge ont été réparties en trois groupes expérimentaux, chaque groupe a ensuite été divisé en trois sous-groupes composés de trois répétitions de 20 larves.

Le sulfate de potassium (K_2SO_4) (Pragati Chemical Industries, Ltd., Hyderabad) a été dissous dans de l'eau distillée et dilué à trois concentrations : 500, 1000 et 2000 $\mu\text{g/ml}$. Des feuilles de mûrier fraîches ont été trempées pendant 30 minutes dans chacune des concentrations puis séchées et données en nourriture aux vers à soie en alternance avec des feuilles de mûrier non traitées, pour un total de quatre nourrissages par jour (deux nourrissages avec des feuilles traitées + deux nourrissages avec des feuilles non traitées). Les témoins ont été nourris avec des feuilles trempées dans de l'eau distillée et des feuilles normales.

Après le traitement, les paramètres pré- et post-filage ainsi que les paramètres du filage ont été relevés. La durée larvaire et le poids larvaire ont été notés à la fin du cinquième âge, le poids de la glande séricigène a été relevé à la fin du cinquième âge, avant le début du filage. Les valeurs moyennes des résultats obtenus sont présentées dans les tableaux I et II, chaque valeur correspondant à la moyenne de 10 larves. Les expériences ont été réalisées deux fois pour permettre la conclusion des résultats. Les données collectées ont été soumises à une analyse de variance pour déterminer la signification entre les paramètres des groupes traités et ceux des groupes non traités (Snedecor and Cochran, 1967). Le pourcentage de filage, la richesse soyeuse mâle et femelle et le pourcentage d'éclosion ont été transformés en valeurs angulaires pour l'analyse statistique.

Préparation des tissus :

On a utilisé, pour les estimations, des larves au sixième jour du cinquième âge. Elles ont été disséquées dans une solution saline, pH 6.5. Le corps adipeux a été prélevé immédiatement et utilisé pour l'estimation des teneurs en glycogène et en protéines. L'hémolymphe, prélevée dans une éprouvette et centrifugée à froid, a été utilisée pour l'estimation des teneurs en protéines et en tréhalose.

On a suivi la méthode de l'anthrone (Sciefter et coll., 1950) pour déterminer la teneur en glycogène. La teneur en protéines a été estimée selon la méthode de Lowry et coll. (1951). La teneur en tréhalose a été évaluée d'après la méthode de Roe et coll. (1955). Les hydrates de carbone anthrone-positifs de l'hémolymphe sont considérés comme étant du tréhalose.

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du test « t » de Student, selon la méthode formulée par Snedecor (1948).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant l'effet du sulfate de potassium sur la durée larvaire, le poids larvaire, le poids du cocon et de la coque des mâles, le poids du cocon et de la coque des femelles, la richesse soyeuse, la fécondité et le pourcentage d'éclosion sont présentées dans les tableaux I et II.

Durée larvaire :

Les résultats obtenus indiquent une diminution significative de la durée larvaire chez tous les groupes traités avec du K_2SO_4 par rapport au groupe témoin. Des résultats similaires (Chakraborti

et Medda, 1978b, Majumdar, 1982) ont été observés chez des larves de *Bombyx mori* nourries avec de l'iodure de potassium à 20, 25 et 50 µg/ml. Cependant, on ignore la cause de cette diminution.

Poids larvaire :

On observe une augmentation significative du poids larvaire chez presque tous les groupes traités au K_2SO_4 . L'augmentation est maximale (43%) chez les lots traités à 1000 µg et 2000 µg (Tableau I). Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus après traitement à 20 µg et 25 µg d'iodure de potassium chez la race Nistari de *Bombyx mori* (Chakraborti et Medda, 1978a ; Majumdar, 1982). Les traitements à 50 µg et 100 µg d'iodure de potassium donnent une diminution du poids larvaire chez la race Nistari (Majumdar, 1982).

L'augmentation du poids larvaire pourrait être due soit à l'effet stimulant du K_2SO_4 sur la croissance car on suppose que l'iodure de potassium a un effet stimulant sur la croissance chez la race Nistari de *Bombyx mori* (Majumdar, 1982), soit à une augmentation de l'activité enzymatique de l'intestin moyen car le sulfate de cuivre augmente l'activité enzymatique de l'intestin moyen chez *L. decemlineata* (Izhevskiy, 1976). On pense que la présence de minéraux comme le phosphore et le potassium en concentrations plus élevées dans les feuilles de ricin que dans les feuilles de tapioca stimule la prise de nourriture et, de ce fait, entraîne une augmentation du poids larvaire chez le ver à soie eri *Philosamia ricini* Hutt (Joshi, 1981).

Poids de la glande séricigène :

Les résultats obtenus font apparaître une augmentation significative du poids de la glande séricigène chez les trois groupes expérimentaux par rapport au témoin. L'augmentation est maximale (34 %) chez les lots traités à 1000 µg de K_2SO_4 (Tableau I). La hausse du poids de la glande séricigène pourrait être due à une accélération de l'activité métabolique provoquée par le traitement au K_2SO_4 . Des résultats similaires ont été obtenus chez des larves de *Bombyx mori* traitées avec du chlorure de cobalt, du sulfate de cobalt et de l'iodure de potassium (Bhattacharyya et Medda, 1981b).

Poids du cocon, poids de la coque, richesse soyeuse (femelles et mâles) :

Le poids du cocon augmente de manière significative chez les mâles et les femelles traités avec 500 µg et 2000 µg de K_2SO_4 avec des valeurs de 34 et 36 % respectivement. Le poids de la coque augmente également de manière significative chez les mâles et les femelles, avec des valeurs de 32 et 31 % respectivement par rapport au témoin pour les trois doses testées de K_2SO_4 . On a observé une augmentation du poids du cocon après nourrissage avec 25 µg de iodure de potassium chez *Bombyx mori* (Majumdar, 1982). L'augmentation du poids du cocon et du poids de la coque pourrait être due à l'effet stimulant du K_2SO_4 sur la synthèse des protéines de la glande séricigène ; des résultats similaires ont été obtenus chez la race Nistari traitée avec de l'iodure de potassium (Chakraborti et Medda, 1978a). Cependant, on n'a pas observé de variation significative de la richesse soyeuse chez les lots traités par rapport au témoin.

Pourcentage de filage :

On constate une augmentation significative du pourcentage de filage aux concentrations de 500 et 1000 µg ; cependant, le lot traité à la concentration de 2000 µg ne présente pas de variation significative par rapport au témoin (Tableau I).

Fécondité :

La fécondité augmente de manière significative par rapport au témoin pour les trois concentrations testées, on obtient l'augmentation maximale (20 %) chez les lots traités avec 500 µg de sulfate de potassium (Tableau I). Le nourrissage avec de l'iodure de potassium et du sulfate de cuivre entraîne une augmentation de la fécondité chez la race Pure Mysore de *Bombyx mori* (Magadam, 1987). L'augmentation de la fécondité pourrait être due à l'effet stimulant du K_2SO_4 sur l'oviposition ou sur la fonction de reproduction, car il a été observé que, chez certains insectes adultes, les besoins en sels pourraient être liés à la fonction de reproduction de la femelle (Braeken, 1965 ; Singh et Brown, 1957).

Pourcentage d'éclosion :

Il n'y a pas de variation significative du pourcentage d'éclosion chez les groupes traités par rapport au témoin.

Nous pensons donc que les minéraux et leurs sels accélèrent la croissance du ver à soie en orientant l'activité physiologique, ce qui se traduit par une réduction de la durée larvaire et une augmentation du taux d'oviposition chez l'adulte et de la richesse soyeuse du cocon (Magadum, 1987; Thangavelu et Bania, 1990).

Paramètres biochimiques :

Les hydrates de carbone et les protéines font partie des composants biochimiques du corps adipeux et de l'hémolymphe des insectes. Cette étude révèle que l'apport de K_2SO_4 dans la nourriture affecte la teneur en hydrates de carbone et en protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe du ver à soie.

On observe une augmentation significative des teneurs en glycogène dans le corps adipeux et en tréhalose dans l'hémolymphe chez tous les lots traités au K_2SO_4 . Cependant, la teneur en glycogène chez les lots traités avec 20 μg de K_2SO_4 ne varie pas de manière significative par rapport au témoin (Tableau III). L'accumulation de glycogène au cours du nourrissage chez *Philosamia ricini* a été attribuée à l'augmentation de l'activité amylase et à la glycogénèse (Pant et Morris, 1969). Les larves du ver à soie eri traitées oralement avec des sels minéraux comme le chlorure cuprique, le chlorure de zinc, le sulfate de manganèse et le sulfate de cuivre présentent une accumulation de lipides, de glycogène, de tréhalose et une diminution des protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe au cinquième âge (Padaki, 1991). La mutation métabolique de la lipogénèse en glycogénèse se produit dans le corps adipeux au milieu du dernier âge larvaire (Inagaki et Yamashita, 1986). La quantité absolue de tréhalose présente dans le corps adipeux est directement liée à la teneur en glycogène dans ce tissu (Downer, 1979) ; les résultats montrent que la production de tréhalose dans le corps adipeux des insectes est influencée par un certain nombre de facteurs organiques et inorganiques. Le niveau de sucres totaux est modifié par les enzymes liées à l'hydrolyse dans l'intestin moyen et dans l'hémolymphe sous l'effet de divers parcours métaboliques intermédiaires au cours de la phosphorylation (Ito et Tanaka, 1959). Au vu de ces observations, les résultats présentés ici montrent que l'augmentation de la teneur en glycogène et en tréhalose dans le corps adipeux et l'hémolymphe pourrait être due à l'effet stimulant du K_2SO_4 sur le métabolisme et qu'il pourrait s'agir d'un facteur inorganique.

Le corps adipeux est le site principal de synthèse des protéines et de métabolisme intermédiaire des acides aminés. Cette étude montre que l'addition de K_2SO_4 dans la nourriture donne une diminution significative de la teneur en protéines du corps adipeux chez les groupes traités à 500 μg et de la teneur en protéines de l'hémolymphe chez les groupes traités à 500 et à 1000 μg chez le ver à soie *B. mori*. Cependant, la teneur en protéines dans le corps adipeux des lots traités à 1000 et 2000 μg de K_2SO_4 et dans l'hémolymphe chez les lots traités à 2000 μg de K_2SO_4 ne présente pas de variation significative par rapport à celle du témoin (Tableau III). Dasmahapatra et coll. (1989) ont démontré que l'administration orale d'iodure de potassium, de chlorure de cobalt, de chlorure de calcium et de nitrate de potassium chez la race Nistari de *Bombyx mori* entraînait une augmentation des teneurs en protéines, en ARN et en ADN dans la glande séricigène. Il est possible que les processus impliqués dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques dans la glande séricigène soient activés par ces sels métalliques. Padaki (1991) a démontré que, chez le ver à soie eri *Philosamia ricini*, l'administration orale de sulfate de cobalt entraînait une augmentation du taux de synthèse des protéines aux premiers stades et une diminution de ce taux au cinquième âge. Ilan et Ilan (1973) ont démontré que la croissance et le développement des insectes étaient gouvernés par des sécrétions neuroendocriniennes. On peut donc supposer que le métabolisme protéique des insectes est gouverné par les sécrétions des organes endocriniens. Kim (1983) a observé une diminution de la concentration en protéines dans l'hémolymphe lorsque les larves de *B. mori* commencent à sécréter leur soie.

Sur la base de ces observations, nos résultats indiquent que la diminution significative des teneurs en protéines dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe pourrait être due à l'effet du K_2SO_4 sur l'activité métabolique. Cependant, des recherches complémentaires sont nécessaires afin d'étudier l'effet du K_2SO_4 sur le métabolisme du ver à soie *Bombyx mori*.

EFFECTS OF HARVEST TIME ON THE NUTRITIONAL QUALITY OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) LEAVES AND COCOON PRODUCTION OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

A.A. SARKER¹, M.A. RAB¹, M.R. HAQUE¹ & N. ABSAR²

1. Serichemistry Laboratory, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi 6100, Bangladesh.
2. Department of Biochemistry, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

The nutritional quality of mulberry leaves harvested at different times of the day (7 a.m., 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m., 3 p.m. and 5 p.m.) was analysed and its influence on cocoon production of the silkworm, *Bombyx mori*, was studied. The nutritional components of mulberry leaves were significantly affected by the time of harvest. The highest water, crude protein, crude fat and total mineral contents were observed in mulberry leaves harvested at 7 a.m. On the other hand, mulberry leaves harvested at 5 p.m. contained the highest amount of total sugar, starch and crude fibre contents. The highest single cocoon weight, single shell weight, cocoon yield/100 larvae of BSRI-85/3 (1.25 g, 0.20 g and 83.13 g, respectively) and BV(J) (1.37 g, 0.28 g and 93.08 g, respectively) races were found on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m., whereas the filament lengths (700.42 m for BSRI-85/3 and 922.58 m for BV(J) race) were found to be highest on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m. and 5 p.m. respectively. The harvest time, silkworm race, rearing season and most of their interactions had a highly significant influence on all cocoon characters of the silkworm except for a few cases.

Keywords: Harvest time, mulberry leaf, nutritional quality, silkworm rearing, cocoon characters.

INTRODUCTION

The nutritional quality of mulberry leaves plays a vital role in rearing and cocoon production of the silkworm, *Bombyx mori* L. The quality of mulberry leaves is not dependent only on cultivation conditions and storage but also on the time of harvest. The leaves harvested in the hot sunshine during daytime wither and lose moisture rapidly. The quality of mulberry leaves is affected to some extent by the quickness of withering. Therefore, the harvesting time in a day influences the length of time for which leaves can remain quality feed (Rangaswami *et al.*, 1976).

Fresh mulberry leaves are more palatable and nutritious to silkworms for better feeding and successful cocoon crop. Therefore, every effort should be made to harvest quality leaves. Due to active photosynthesis and transpiration during daytime the leaves harvested late in the afternoon contain comparatively less water and more carbohydrates and such leaves wither more rapidly than the leaves harvested in the early morning (Ullal and Narasimhanna, 1987).

Mulberry leaves are economically very important for feeding the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Generally, mulberry leaves are fed to silkworm larvae four times a day in the tropical regions. To economise the cost of production the rearers harvest mulberry leaves once or twice during the 24 hours of the day. The present study has been undertaken to evaluate the nutritional quality of mulberry leaves at different harvest times of the day and thereby to select the suitable time for quality leaf harvest. The quality of the cocoons produced on feeding mulberry leaves harvested at different times of the day has also been studied.

MATERIALS AND METHODS

Five-year-old, low-cut mulberry plants (variety BM-3) were selected for the study. The chemical fertilisers (300 kg N, 150 kg P₂O₅ and 100 kg K₂O/ha/yr) in four split doses were applied to the mulberry field. Organic manure was also used (20 mt/ha) once in a year. Normal cultural operations were carried out as and when needed. All the plots were irrigated twice a month, depending on the rainfall condition.

Mulberry leaf samples were collected at six different harvesting times (7 a.m., 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m., 3 p.m. and 5 p.m.) during four silkworm rearing seasons (in 1993) such as S₁ (February-March), S₂ (May-June), S₃ (August-September) and S₄ (November-December) in three replications. Mulberry leaves starting from the top glossy leaf down to the bottom level, excluding over mature leaves of a stem (20-25 leaves) were considered for each sample (weighing 60-80 g). The collected leaf samples were dried in an oven at 70 °C until constant weight was obtained. Water, total sugar, starch, crude fat, total mineral and crude fibre contents of mulberry leaves were determined by the standard chemical analytical methods of AOAC (1984). Nitrogen was determined by the Microkjeldhal method (Jackson, 1973) and crude protein content of mulberry leaves was estimated using the conversion factor 6.25.

Rearing was conducted using the leaves harvested at six different times of the day during four seasons, as mentioned above. Mulberry leaves were preserved in a wooden frame box covered with a wet gunny cloth and fed during four consecutive feedings, covering a period of 24 hours. BSRI-85/3 (improved multivoltine) and BV(J) (evolved bivoltine) races of silkworms were used for the study. The rearing was conducted in three replications. The improved silkworm rearing techniques of Krishnaswami (1978) were followed. Three disease-free layings (DFLs) were brushed for each treatment. After the second moult, 200 larvae were selected for each replication. In all seasons, wet foam pads were placed around the rearing beds and covered with polyethylene sheets to maintain ideal temperature and humidity, except in the S₃ season due to high humidity. Feeds were provided to silkworms of different ages according to leaf maturity. The total period of rearing was recorded for each season. The cocoon yield and cocoon characters were estimated using the standard techniques as applied for assessment of silk cocoons. Temperature and relative humidity of the rearing house during S₁, S₂, S₃ and S₄ seasons were recorded to be 25.50 ± 3.06 °C and 67.00 ± 6.10%, 30.00 ± 3.05 °C and 76.40 ± 4.5%, 28.70 ± 0.76 °C and 84.00 ± 5.30%, and 23.30 ± 2.00 °C and 68.90 ± 4.40%, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean nutrient contents of mulberry leaves harvested at different times of the day (7 a.m., 9 a.m., 11 a.m., 1 p.m., 3 p.m. and 5 p.m.) over four seasons are presented in Table I. It was found that nutritional components such as water, crude protein, total sugar, starch, crude fat, crude fibre and total mineral contents of mulberry leaves were affected significantly by the change of harvest time. The highest water (74.83%), crude protein (22.78%), crude fat (5.44%) and total mineral (8.94%) contents were observed in mulberry leaves harvested at 7 a.m. On the other hand, mulberry leaves harvested at 5 p.m. contained the highest amounts of total sugar (8.49%), starch (12.99%) and crude fibre (9.48%).

The analysis of variance for seven nutritional components of mulberry leaves showed a highly significant effect due to the harvest time and season. The harvest time × season interaction was found to be highly significant only for water and total sugar contents of mulberry leaves (Table II).

The highest single cocoon weight, single shell weight and cocoon yield/100 larvae were observed on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m. for BSRI-85/3 (1.25 g, 0.20 g and 83.13 g, respectively) and BV(J) races (1.37 g, 0.28 g and 93.08 g, respectively) followed by the harvest at 5 p.m. (Table III). The filament lengths of BSRI-85/3 (700.42 m) and BV(J) (927.67 m) races were found to be highest on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m. and 5 p.m., respectively. However, the least values for all cocoon characters were observed on feeding mulberry leaves harvested at 1 p.m. It may also be seen from Table III that the values of the cocoon characters for both silkworm races were found to be more or less similar on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m. and 5 p.m.

Table I. Mean nutrient contents of mulberry leaves harvested at different times of the day over four seasons (oven dry basis).*Tableau I. Teneur moyenne en éléments nutritifs des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée sur quatre saisons (base : séchage au four).*

Time of harvest	Nutrients / Eléments nutritifs						
	Water (g/100 g fresh leaves)	Crude protein (g/100 g)	Total sugar (g/100 g)	Starch (g/100 g)	Crude fat (g/100 g)	Total mineral (g/100 g)	Crude fibre (g/100 g)
<i>Heure de récolte</i>	<i>Humidité (g/100 g feuilles fraîches)</i>	<i>Protéines brutes (g/100 g)</i>	<i>Sucres totaux (g/100 g)</i>	<i>Amidon (g/100 g)</i>	<i>Matières grasses brutes (g/100 g)</i>	<i>Minéraux totaux (g/100 g)</i>	<i>Fibres brutes (g/100 g)</i>
7 a.m. / 7h00	74.83 ^a	22.78 ^a	7.40 ^{bc}	11.47 ^d	5.44 ^a	8.94 ^a	7.49 ^c
9 a.m. / 9h00	74.24 ^{ab}	22.58 ^{ab}	7.58 ^{bc}	11.85 ^{bc}	5.15 ^{ab}	8.70 ^{ab}	7.87 ^{de}
11 a.m. / 11h00	73.48 ^b	22.49 ^{ab}	7.65 ^{bc}	11.95 ^{bc}	4.53 ^{abc}	8.50 ^{ab}	8.36 ^{cd}
1 p.m. / 13h00	72.74 ^c	22.42 ^{ab}	7.89 ^b	12.22 ^b	4.99 ^{abc}	8.43 ^{ab}	8.64 ^{abc}
3 p.m. / 15h00	72.06 ^d	22.32 ^{ab}	8.24 ^{ab}	12.77 ^{ab}	4.62 ^{bc}	8.28 ^{ab}	9.08 ^{ab}
5 p.m. / 17h00	71.37 ^c	22.14 ^b	8.49 ^a	12.99 ^a	4.11 ^{cd}	8.13 ^b	9.48 ^a

Figure(s) followed by the same letter(s) are not significantly different at the 1% level as per Duncan's new multiple range test.
 Les chiffres suivis d'une même lettre ne diffèrent pas de manière significative au seuil de 1 % d'après le test de Duncan.

Table II. Analysis of variance for the nutritional composition of mulberry leaves harvested at different times of the day.*Tableau II. Analyse de variance pour la composition nutritionnelle des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée.*

Source of variation	Degree of freedom	Nutrients / Eléments nutritifs						
		Water	Crude protein	Total sugar	Starch	Crude fat	Total mineral	Crude fibre
<i>Source de variation</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Humidité</i>	<i>Protéines brutes</i>	<i>Sucres totaux</i>	<i>Amidon</i>	<i>Matières grasses</i>	<i>Minéraux totaux</i>	<i>Fibres brutes</i>
Harvest time (T) <i>Heure de récolte (T)</i>	5	22.4455 ^{**}	2.8313 ^{**}	2.8261 ^{**}	4.0341 ^{**}	2.7686 ^{**}	2.3686 ^{**}	2.0006 ^{**}
Season (S) / Saison (S)	3	51.4597 ^{**}	0.9860 ^{**}	7.2295 ^{**}	6.4239 ^{**}	2.2183 ^{**}	6.4580 ^{**}	5.0512 ^{**}
T × S	23	0.5243 ^{**}	0.1217	0.1236 ^{**}	0.0356	0.1330	0.0669	0.0605
Replication / Répétition	2	0.2393	0.0208	0.0257	0.0179	0.0135	0.0179	0.0004
Error / Ecart	38	0.0811	0.0767	0.0502	0.1119	0.0726	0.0843	0.1454

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

Table III. Mean cocoon characters of two silkworm races fed on mulberry leaves harvested at different times of the day over four seasons.

Tableau III. Moyennes des caractères du cocon de deux races de ver à soie nourries avec des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée pendant quatre saisons.

Time of harvest	Cocoon characters / Caractères du cocon			
	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Cocoon yield/ 100 larvae (g)	Filament length (m/cocoon)
	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Rendement en cocons/ 100 larves (g)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>
Silkworm race: BSRI-85/3 / Race BSRI-85/3				
7 a.m. / 7h00	1.25 ^a	0.20 ^a	83.13 ^a	700.42 ^a
9 a.m. / 9h00	1.20 ^b	0.17 ^b	75.01 ^b	654.08 ^{abc}
11 a.m. / 11h00	1.17 ^{bc}	0.16 ^b	64.31 ^c	600.92 ^{bc}
1 p.m. / 13h00	1.15 ^c	0.15 ^b	54.32 ^d	498.58 ^d
3 p.m. / 15h00	1.19 ^{bc}	0.16 ^b	69.29 ^{bc}	576.75 ^{bc}
5 p.m. / 17h00	1.24 ^a	0.20 ^a	81.75 ^{ab}	696.71 ^{ab}
Silkworm race: BV(J) / Race BV(J)				
7 a.m. / 7h00	1.37 ^a	0.28 ^a	93.08 ^a	922.58 ^{ab}
9 a.m. / 9h00	1.32 ^{abc}	0.22 ^c	84.35 ^{abc}	860.50 ^{abc}
11 a.m. / 11h00	1.27 ^{bcd}	0.20 ^{cd}	77.33 ^{cd}	767.92 ^{bcd}
1 p.m. / 13h00	1.21 ^c	0.18 ^d	62.72 ^d	676.00 ^d
3 p.m. / 15h00	1.30 ^{bc}	0.20 ^{cd}	72.48 ^d	797.50 ^{bc}
5 p.m. / 17h00	1.36 ^{ab}	0.26 ^{ab}	92.30 ^{ab}	927.67 ^a

Figure(s) followed by the same letter(s) are not significantly different at the 1% level as per Duncan's new multiple range test. Les chiffres suivis d'une même lettre ne diffèrent pas de manière significative au seuil de 1% d'après le test de Duncan.

Table IV shows the analysis of variance for the cocoon characters of both silkworm races. The leaf harvest time (T), rearing season (S), silkworm race (R) and most of their interactions had highly significant effects on all cocoon characters except for a few cases.

The highest amount of water, crude protein, crude fat, total mineral and the lowest amount of total sugar, starch and crude fibre contents in mulberry leaves harvested at 7 a.m. (Table I) might be due to the cool and fresh environment in the morning and less breakdown of the nutrients at night except for the carbohydrate content of mulberry leaves which decomposed into simple sugars and fats during respiration at night.

The lowest amount of water and highest amount of carbohydrates in mulberry leaves harvested at 5 p.m. might be due to the active photosynthesis and transpiration during the daytime. A similar trend of nutrient contents in mulberry leaves at different harvest times of the day was also reported by Sarker (1994).

Table IV. Analysis of variance for the cocoon characters of the silkworm, *Bombyx mori*, fed on mulberry leaves harvested at different times of the day.

Tableau IV. Analyse de variance des caractères du cocon du ver à soie Bombyx mori nourri avec des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée.

Source of Variation	Degree of freedom	Cocoon characters / Caractères du cocon			
		Single cocoon weight ($\times 10^{-4}$)	Single shell weight ($\times 10^{-4}$)	Cocoon yield/ 100 larvae	Filament length
Source de variation	Degrés de liberté	Poids du cocon ($\times 10^{-4}$)	Poids de la coque ($\times 10^{-4}$)	Rendement en cocons/ 100 larves	Longueur de la bave
Harvest time (T) <i>Heure de récolte (T)</i>	5	225.490**	52.844**	578.606**	51798.112**
Season (S) / Saison (S)	3	1363.803**	372.351**	10471.036**	174952.17**
Silkworm race (R) <i>Race de ver à soie (R)</i>	1	3690.562**	1111.111**	43.055**	1813735.60**
T $\times$ S	23	8.861**	61.502**	22.239**	622.856
T $\times$ R	11	2.824	125.732**	5.298	804.594
S $\times$ R	7	40.034**	369.555**	193.928**	417.668
T $\times$ S $\times$ R	47	0.722	0.194	1.340	167.261
Replication / Répétition	2	5.632	2.028	1.252	3539.520
Error / Ecart	45	2.501	1.680	4.139	1683.24

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

The larval periods were recorded to be 22-23 days in S₁ and S₄ seasons and 21-22 days in S₂ and S₃ seasons for BSRI-85/3 race; whereas it took 24-25 days in S₁ and S₄ seasons and 23-24 days in S₂ and S₃ seasons for BV(J) race. The longer larval durations in S₁ and S₄ seasons and shorter larval durations in S₂ and S₃ seasons for both races might be due to the relatively higher and lower temperatures prevailing in those seasons, respectively.

It has been observed that feeding of mulberry leaves harvested at different times of the day could have a significant effect on the cocoon characters of BSRI-85/3 and BV(J) silkworm races. The highest single cocoon weight, single shell weight, cocoon yield/100 larvae of both silkworm races and highest filament length of BSRI-85/3 (Table III) were observed on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m.; this might be due to the presence of higher amount of water, crude protein and total sugar contents in mulberry leaves (Table I) harvested at that time (Sarker, 1994).

However, the differences of the values of the cocoon characters of both races fed on mulberry leaves harvested at 7 a.m. and 5 p.m. were not statistically significant. Sengupta *et al.* (1971) also reported similar results for the cocoon characters of silkworms fed on mulberry leaves harvested at different times of the day.

CONCLUSION

Due to untimely leaf harvest and improper maintenance the nutritional quality of mulberry leaves deteriorates and silkworms fed on those leaves produce a low yield of inferior quality cocoons. The finding of the present investigation might be very useful for the rearers. Mulberry leaves could be harvested early in the morning at 7 a.m. due to their higher nutritive value at this time. However, the values of the cocoon characters were found to be more or less similar on feeding mulberry leaves harvested at 7 a.m. and 5 p.m. Therefore, it may be suggested to harvest mulberry leaves early in the morning at 7 a.m. or late in the evening at 5 p.m. for successful cocoon crop harvest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Director, BSRTI, Rajshahi, for providing necessary facilities for the project work. We also thank Mr Mokhlesur Rahman and S.M. Nazim of the Sericchemistry Laboratory of the same institute for collection of leaf samples and record of rearing results.

REFERENCES

- AOAC (1984) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Inc., USA, pp. 152-160.
- DE S.K. (1962) Methods of Soil Analysis. Narayan Publishing House, Allahabad, India, pp. 111-114.
- JACKSON M.L. (1973) Soil Chemical Analysis. Prentice Hall Inc., New York, p. 183.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New Technology of Silkworm Rearing. Bull. No. 2, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R. (1976) Sericulture Manual. 1: Mulberry Cultivation. FAO Agricultural Services Bull., 15/1, FAO, Rome, pp. 1-67.
- SARKER A.A. (1994) Studies on the nutritional quality of mulberry (*Morus* sp.) leaves and its influence on cocoon production of silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. thesis, Rajshahi University, Bangladesh, pp. 151-154.
- SENGUPTA K., SING B.D., MUSTAFI J.C. (1971) A study on the effect of time of harvest of mulberry leaf on silkworm (*Bombyx mori* L.) cocoon crop and cocoon quality. Indian J. Seric., 10(1), 1-5.
- ULLAL S.R., NARASIMHANNA M.N. (1987) Handbook of Practical Sericulture. Central Silk Board, pp. 34-37, 122-132.

EFFETS DE L'HEURE DE RECOLTE SUR LA QUALITE NUTRITIONNELLE DES FEUILLES DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) ET SUR LA PRODUCTION DE COCONS CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

A.A. SARKER¹, M.A. RAB¹, M.R. HAQUE¹ & N. ABSAR²

1. Serichemistry Laboratory, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi 6100, Bangladesh.

2. Department of Biochemistry, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

*On a analysé la qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée (7h00, 9h00, 11h00, 13h00, 15h00 et 17h00) ainsi que l'influence de l'heure de récolte sur la production de cocons chez le ver à soie *Bombyx mori*. Les composants nutritionnels des feuilles de mûrier sont fortement affectés par l'heure de récolte. Les teneurs en humidité, en protéines brutes, en matières grasses brutes et en minéraux totaux sont maximales chez les feuilles de mûrier récoltées à 7h00. Par ailleurs, les feuilles de mûrier récoltées à 17h00 présentent les teneurs les plus élevées en sucres totaux, amidon et fibres brutes. Le poids du cocon, le poids de la coque, le rendement en cocons pour 100 larves chez BSRI-85/3 (respectivement 1,25 g, 0,20 g et 83,13 g) et chez BV(J) (respectivement 1,37 g, 0,28 g et 93,08 g) sont maximaux chez les larves nourries avec des feuilles récoltées à 7h00, tandis que la longueur de la bave [700,42 m pour BSRI-85/3 et 922,58 m pour BV(J)] est maximale chez les larves nourries avec des feuilles de mûrier récoltées respectivement à 7h00 et à 17h00. L'heure de récolte, la race de ver à soie, la saison d'élevage et la plupart de leurs interactions ont une influence fortement significative sur tous les caractères du cocon, à l'exception de quelques cas.*

INTRODUCTION

La qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier joue un rôle capital dans l'élevage et la production de cocons du ver à soie *Bombyx mori* L. La qualité des feuilles de mûrier ne dépend pas seulement des conditions de culture et de stockage mais également de l'heure de récolte. Les feuilles récoltées aux heures chaudes de la journée se flétrissent et perdent rapidement leur humidité. La rapidité du dessèchement affecte, dans une certaine mesure, la qualité des feuilles de mûrier. L'heure de récolte influence donc la durée de la période pendant laquelle les feuilles conservent leur qualité (Rangaswami et coll., 1976).

Les feuilles de mûrier fraîches sont plus sapides et nutritives pour les vers à soie ; elles permettent une meilleure alimentation, assurant le succès de la récolte de cocons. Il est donc nécessaire de s'attacher à l'obtention d'une récolte de feuilles de qualité. En raison d'une photosynthèse et d'une transpiration active pendant la journée, les feuilles récoltées en fin d'après-midi contiennent comparativement moins d'eau et davantage d'hydrates de carbone ; ces feuilles se flétrissent plus rapidement que les feuilles récoltées en début de matinée (Ullal et Narasimhanna, 1987).

D'un point de vue économique, les feuilles de mûrier sont très importantes pour le nourrissage des larves du ver à soie *Bombyx mori*. En général, les feuilles de mûrier sont données aux larves de vers à soie quatre fois par jour dans les régions tropicales. Afin de réduire le coût de production, les éleveurs récoltent les feuilles une ou deux fois en 24 heures. Cette étude a été entreprise afin d'évaluer la qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier en fonction de l'heure de récolte et ainsi sélectionner l'heure la plus appropriée pour une récolte de feuilles de qualité. On a également étudié la qualité des cocons produits en fonction de l'heure de récolte des feuilles données comme nourriture.

MATERIELS ET METHODES

On a sélectionné pour cette étude des plants de mûrier (variété BM-3) âgés de cinq ans et cultivés en taille basse. Des engrais chimiques (300 kg N, 150 kg P_2O_5 et 100 kg K_2O /ha/an) ont été appliqués en quatre doses sur la plantation de mûriers. Du fumier organique (20 tonnes/ha) a également été appliqué une fois par an. Les opérations culturales habituelles ont été réalisées suivant les besoins. Toutes les parcelles ont été irriguées deux fois par mois, suivant les conditions pluviométriques.

Des échantillons des feuilles de mûrier ont été prélevés à six différentes heures de récolte (7h00, 9h00, 11h00, 13h00, 15h00 et 17h00) au cours de quatre saisons d'élevage (1993) : S₁ (février-mars), S₂ (mai-juin), S₃ (août-septembre) et S₄ (novembre-décembre). Trois répétitions ont été maintenues. Chaque échantillon, d'un poids de 60 à 90 g, est composé d'une tige (20 à 25 feuilles) de feuilles de mûrier, en partant de la feuille supérieure vernissée jusqu'au niveau inférieur, les feuilles sénescentes n'ont pas été prélevées. Les échantillons de feuilles ont été séchés au four à 70 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. La teneur en humidité, en sucres totaux, en matières grasses brutes, en minéraux totaux et en fibres brutes des feuilles de mûrier a été déterminée selon les méthodes d'analyse chimique standard de l'AOAC (1984). La teneur en azote a été déterminée selon la méthode de Microkjeldhal (Jackson, 1973) et la teneur en protéines brutes a été évaluée en utilisant le facteur de conversion 6,25.

L'élevage a été réalisé avec des feuilles récoltées à six différentes heures de la journée sur quatre saisons, comme indiqué plus haut. Les feuilles de mûrier ont été conservées dans une claie en bois recouverte d'une toile de jute humide : les larves ont été nourries avec ces feuilles pendant trois nourrissages consécutifs sur une période de 24 heures. Les races BSRI-85/3 (polyvoltine améliorée) et BV(J) (bivoltine) ont été utilisées pour cette étude. L'élevage a été réalisé en trois répétitions. On a suivi les techniques améliorées d'élevage du ver à soie de Krishnaswami (1978). Trois pontes saines ont été levées pour chaque traitement. Après la deuxième mue, 200 larves ont été sélectionnées pour chaque répétition. Des tampons en mousse ont été placés autour des claies d'élevage, elles-mêmes recouvertes de toiles en polyéthylène pour maintenir une température et une humidité optimale à toutes les saisons, hormis la saison S₃ en raison de l'humidité élevée à cette saison. Les larves des différents âges ont été nourries en fonction de la maturité des feuilles. La période totale d'élevage a été relevée pour chaque saison. Le rendement en cocons et les caractères du cocon ont été évalués selon les techniques standard appliquées pour l'évaluation des cocons de soie. La température et l'humidité relative de la pièce d'élevage sont respectivement de $25,50 \pm 3,06$ °C et $67,00 \pm 6,10$ % à la saison S₁, de $30,00 \pm 3,05$ °C et $76,40 \pm 4,5$ % à la saison S₂, de $28,70 \pm 0,76$ °C et $84,00 \pm 5,30$ % à la saison S₃ et de $23,30 \pm 2,00$ °C et $68,90 \pm 4,40$ % à la saison S₄.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les teneurs moyennes en éléments nutritifs des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée (7h00, 9h00, 11h00, 13h00, 15h00 et 17h00) sur les quatre saisons considérées sont présentées dans le tableau I. Les teneurs en composants nutritifs tels que l'eau, les protéines brutes, les sucres totaux, l'amidon, les matières grasses brutes, les fibres brutes et les minéraux totaux des feuilles de mûrier sont fortement affectées par le changement d'heure de récolte. Les teneurs en eau (74,83 %), en protéines brutes (22,78 %), en matières grasses brutes (5,44 %) et en minéraux totaux (8,94 %) sont maximales chez les feuilles récoltées à 7h00. Néanmoins, les feuilles de mûrier récoltées à 17h00 présentent les teneurs les plus élevées en sucres totaux (8,49 %), en amidon (12,99 %) et en fibres brutes (9,48 %).

L'analyse de variance pour les sept composants nutritifs des feuilles de mûrier fait apparaître un effet fortement significatif de l'heure de récolte et de la saison. L'interaction heure de récolte $\times$ saison est fortement significative pour les teneurs en eau et en sucres totaux des feuilles de mûrier (Tableau II).

Le poids du cocon, le poids de la coque et le rendement en cocons pour 100 larves sont les plus élevés chez les larves nourries avec des feuilles récoltées à 7h00 pour BSRI-85/3 (respectivement 1,25 g, 0,20 g et 83,13 g) et BV(J) (respectivement 1,37 g, 0,28 g et 93,08 g), devant celles nourries avec des feuilles récoltées à 17h00 (Tableau III). La longueur de la bave chez les races BSRI-85/3 (700,42 m) et BV(J) (927,67 m) est maximale après nourrissage avec des feuilles récoltées

respectivement à 7h00 et à 17h00. On obtient les valeurs les plus faibles pour l'ensemble des caractères du cocon après nourrissage avec des feuilles de mûrier récoltées à 13h00. La lecture du tableau III montre également que les valeurs des caractères du cocon pour les deux races de vers à soie sont sensiblement identiques après nourrissage avec des feuilles de mûrier récoltées à 7h00 et à 17h00.

Le tableau IV présente l'analyse de variance pour les caractères du cocon chez les deux races de vers à soie. L'heure de récolte (T), la saison d'élevage (S), la race de ver à soie (R) et la plupart de leurs interactions ont des effets fortement significatifs sur tous les caractères du cocon, à l'exception de quelques cas.

Le fait que les teneurs en eau, en protéines brutes, en matières grasses brutes et en minéraux totaux sont maximales et les teneurs en sucres totaux, en amidon et en fibres brutes sont minimales chez les feuilles récoltées à 7h00 (Tableau I) pourrait être dû à la fraîcheur de l'environnement le matin et à la diminution de la dissociation des éléments nutritifs pendant la nuit, à l'exception des hydrates de carbone des feuilles de mûrier qui se décomposent en sucres et en matières grasses simples au cours de la respiration nocturne.

Le faible taux en eau et le taux élevé d'hydrates de carbone chez les feuilles de mûrier récoltées à 17h00 pourraient être dus à la photosynthèse et à la transpiration active pendant la journée. Sarker (1994) a observé une tendance similaire pour les teneurs en éléments nutritifs des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée.

Cependant, les différences de valeurs des caractères du cocon chez les deux races nourries avec des feuilles récoltées à 7h00 et à 17h00 ne sont pas statistiquement significatives. Sengupta et coll. (1971) ont obtenu des résultats similaires pour les caractères du cocon chez les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier récoltées à différentes heures de la journée.

CONCLUSION

Si les feuilles sont récoltées à une heure inappropriée et conservées dans de mauvaises conditions, leur qualité nutritive se détériore et les vers à soie nourris avec ces feuilles donnent un rendement en cocons faible et de qualité médiocre. Les résultats obtenus dans cette étude pourraient être très utiles pour les éleveurs. Les feuilles de mûrier peuvent être récoltées en début de matinée à 7h00 car elles ont une forte valeur nutritive à ce moment. Cependant, le nourrissage avec des feuilles récoltées à 7h00 et à 17h00 donne des valeurs sensiblement comparables pour les caractères du cocon. On suggère donc de récolter les feuilles en début de matinée à 7h00 ou en fin d'après-midi à 17h00 pour assurer une récolte de cocons de qualité.

PROPAGATION OF MULBERRY THROUGH *IN VITRO* SHOOT PROLIFERATION: EFFECTS OF DIFFERENT SEASONS

A. ZAMAN¹, R. ISLAM², A.C. BARMAN¹ & O.I. JOARDER²

1. Mulberry Breeding and Biotechnology Division, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

2. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

Nodal segments and shoot apices of mulberry (Morus alba L. cv S1) were collected right from January to December 1993 and cultured in the same month of collection on MS + BA 2 mg/l + 30 g/l sucrose. Effects of different seasons and sources of collection on in vitro shoot proliferation were evaluated. Spring was found to be best for maximum bud sprouting. The maximum frequency of shoot proliferation and highest number of shoots per explant were obtained in late winter to spring (February to April). In winter, when the ambient temperature was below 10 °C, shoot proliferation efficiency was disturbed. Shoot length was higher in summer and rainy and lower in winter and post-winter. In all cases, nodal explants yielded a higher number of shoots than shoot apices.

Keywords: Mulberry, cloning, seasonal effect.

INTRODUCTION

Mulberry is a multipurpose social tree both in terms of sericulture and forestry. The plant is highly heterozygous due to its cross-pollination habit. Cutting is the most popular and widely used method of vegetative propagation to get true-to-type mulberry plants but this method is restricted to a single season and usually done just prior to winter (September to October) in Bangladesh. In the other seasons, if the cutting is planted it does not sprout and if it does, growth of the sapling is retarded in *in vivo* conditions. This is probably due to seasonal influence. Considerable work has been conducted in the last decade on the micropropagation of mulberry trees in Japan (Oka and Ohyama, 1986), India (Yadav *et al.*, 1990) and in Bangladesh (Islam *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1993) by using tissue culture techniques. Even in controlled environmental conditions, organogenesis can be influenced by the seasons (Bogdanovic, 1968; Gogala, 1988). Since there is no report on seasonal influence on *in vitro* shoot proliferation of mulberry, the present investigation was undertaken to observe the effects of different seasons on *in vitro* shoot proliferation of mulberry (*Morus alba* L. cv S1) simultaneously to search the most suitable season for culture establishment.

MATERIALS AND METHODS

The twigs (about 5-6 cm) of shoots of a 10-year-old mulberry tree belonging to *Morus alba* cv S1 from the germplasm bank of the Bangladesh Sericulture Research and Training Institute were collected throughout the year (January-December) and used for the investigation. The data (Table I) for *in vitro* shoot proliferation were recorded 8 weeks after culture initiation. The process of sterilisation of explants and inoculation for the month of January is described below and was followed for the other months.

In the first week of January 1993, the explants were collected and brought to the laboratory in polybags. The experiments were carried out with the same source of materials for the next eleven

successive months. The twigs with nodal explants and shoot apices were washed thoroughly in running tap water to remove the superficial dust particles as well as fungal and bacterial spores. After treating with Tween 80 (BDH) for 20 minutes, the explants were washed with distilled water. The explants were passed through an ultraviolet sterile laminar airflow for sterilisation and were treated by successive immersion in 70% ethanol for 30 seconds and 0.1% HgCl₂ for 10 minutes. Nodal segments (with a single axillary bud) and shoot apices (about 1.0-1.5 cm) were prepared aseptically from these shoot pieces and were implanted on the medium surface vertically. MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 2 mg/l BA was used for shoot proliferation. This formulation was found superior for multiple shoot proliferation in mulberry (Islam *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1993). The pH of all media was adjusted to 5.5 with KOH or HCl, prior to the addition of 0.7-0.8% Difco Bacto-agar. Twenty ml of media was dispensed into test tubes and autoclaved at 121 °C with 15 lb. pressure/cm² for 15 minutes. All cultures were maintained at a constant temperature of 27 ± 1 °C and 16 h photoperiod (2000 lux).

RESULTS AND DISCUSSION

Shoot proliferation:

Shoot apices and nodal segments were collected and cultured every month of the year and the data were recorded 8 weeks after culture initiation. The effects of different seasons on *in vitro* shoot proliferation are summarised in Table I. The opening and growth of buds were greatly affected by the seasons and the associated physiological conditions of the maternal twig from which the explants were collected. The explants started to proliferate within 3-4 weeks of culture. After proliferation the explants with proliferating shoot masses were transferred to 250 ml Erlenmeyer conical flasks with more medium to meet the increasing requirement of nutrients and space. The maximum percentage of shoot proliferation and highest number of shoots per explant were recorded during late winter to spring (Fig. 1) (February-April) followed by summer (May-June). However, with the advent of winter (November to January), both performances declined considerably. Shoot proliferation efficiency of nodal segments was superior to that of shoot apices except in the month of October when shoot apices showed a slightly higher percentage of shoot proliferation. Amin and Jaiswal (1987) found the best shoot proliferation rate when the explants of guava were cultured during April to June. Peach buds enter the dormant state from the second half of July and do not sprout until November (Nekrasova, 1964). He also observed that lemon buds sprout and elongate best in July, which is similar to our findings. In the rainy (July-August) season and in autumn (September-October) the rate of shoot



Fig. 1: Multiple shoot formation on a nodal segment collected in spring after 8 weeks of culture in MS + 2 mg/l BA.

Fig. 1 : Formation de pousses multiples sur un segment nodal prélevé au printemps après huit semaines de culture dans un milieu MS + 2 mg/l BA.

Table I. Effects of time of collection (months) of explants on *in vitro* cloning of *M. alba* cv S₁.

Tableau I. Effets de l'époque de prélèvement (mois) des explants sur le clonage *in vitro* de *Morus alba* cultivar S₁.

Months ⁽¹⁾	Explants	Percentage of shoot proliferation	Number of shoots/culture	Length of shoots (cm)
Mois ⁽¹⁾	Explants	Pourcentage de prolifération des pousses	Nombre de pousses par culture	Longueur des pousses (cm)
January	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	61 ± 4.2	4.44 ± 1.3	5.00 ± 0.8
Janvier	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	65 ± 3.9	7.93 ± 1.2	3.01 ± 0.3
February	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	72 ± 5.0	4.89 ± 0.4	5.19 ± 0.2
Février	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	90 ± 4.8	9.00 ± 2.0	3.21 ± 0.3
March	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	76 ± 6.0	5.13 ± 1.5	6.09 ± 0.2
Mars	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	93 ± 4.3	9.39 ± 2.1	4.32 ± 0.4
April	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	73 ± 3.9	5.07 ± 0.8	6.24 ± 1.0
Avril	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	89 ± 3.4	9.11 ± 1.4	5.00 ± 0.7
May	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	65 ± 4.3	4.16 ± 1.3	7.11 ± 0.6
Mai	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	73 ± 5.1	6.22 ± 2.1	5.23 ± 1.0
June	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	70 ± 3.7	4.20 ± 0.8	7.06 ± 1.1
Juin	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	72 ± 3.1	6.12 ± 1.6	5.14 ± 1.2
July	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	73 ± 5.1	5.22 ± 1.2	5.66 ± 0.8
Juillet	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	70 ± 4.8	6.00 ± 0.4	6.00 ± 1.0
August	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	69 ± 4.3	5.17 ± 0.5	5.23 ± 0.6
Août	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	76 ± 4.1	5.03 ± 0.3	5.61 ± 0.7
September	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	65 ± 3.7	5.10 ± 0.2	4.12 ± 1.1
Septembre	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	66 ± 3.3	4.93 ± 0.4	4.03 ± 1.0
October	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	52 ± 4.4	4.71 ± 0.9	3.91 ± 0.3
October	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	50 ± 4.7	4.86 ± 1.1	4.11 ± 0.2
November	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	56 ± 3.2	3.61 ± 1.2	4.66 ± 0.9
Novembre	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	64 ± 4.5	4.59 ± 1.3	3.52 ± 0.4
December	Shoot apex / <i>Apex de la tige</i>	54 ± 3.8	3.09 ± 0.2	4.18 ± 0.3
Décembre	Nodal segment / <i>Segment nodal</i>	65 ± 3.9	4.13 ± 0.8	3.41 ± 0.2

Data recorded after 8 weeks of culture initiation. Each treatment contained 18-20 replicates and the experiment was repeated twice (mean ± standard error).

(1) Nov.: early winter; Dec.-Jan.: winter; Feb.: late winter; Mar.-Apr.: spring; May-June: summer; Jul.-Aug.: rainy; Sept.-Oct.: autumn.

Les données ont été enregistrées huit semaines après la mise en culture. Chaque traitement comprend 18 à 20 répétitions et l'expérience a été répétée trois fois (moyenne ± écart type).

(1) Nov. : début de l'hiver ; déc.-jan. : hiver ; fév. : fin de l'hiver ; mars-avr. : printemps ; mai-juin : été ; juil.-août : saison pluvieuse ; sept.-oct. : automne.

proliferation and elongation was better than in winter (November-January). Further multiplication of axillary shoots could also be achieved on the same medium through culture of the nodal segments and shoot apices. The greater responsiveness of nodal explants over the shoot apices can be attributed to the absence of apical dominance and presence of axillary buds at a more advanced stage of development. For apple (Hutchinson, 1981) and thornless blackberry (Zimmerman and Broome, 1980) also nodal explants prove to be good explants for micropropagation. Length of the microshoot was also influenced by the collection period, which was experienced visually while repeating the experiments on the responsiveness of the nodal segments and shoot apices collected in every month. In this case, the findings were somewhat different and did not correlate with the rate and number of shoot proliferation. In most instances, nodal segments were dominated by shoot apices in terms of shoot length.



Fig. 2: Adventitious root induction on half strength MS + 0.1 mg/l IBA after 5 weeks of culture.

Fig. 2 : Induction de racines adventives sur un $\frac{1}{2}$ milieu MS + 0.1 mg/l AIB après cinq semaines de culture.



Fig. 3: Thirty-day-old plant in a polybag.

Fig. 3 : Plant âgé de trente jours dans un sac de polyéthylène.

Rooting of microcuttings:

Microcuttings (longer than 2 cm) taken from *in vitro*-proliferated shoots were implanted on MS medium having $\frac{1}{2}$ strength inorganic salts and sucrose 20 g/l with 0.1 mg/l indolebutyric acid (IBA) as this formulation produced the best root initiation in earlier experiments (Zaman *et al.*, 1993) (Fig. 2). However, the number of roots per microcutting and the average length of roots were not affected by the different seasons.

Transfer of plantlets and their *in vivo* establishment:

The *in vitro*-derived plantlets were taken from the culture tubes and washed gently to remove the nutrient media and transplanted to small polybags with 1:1 non-sterile garden soil and compost (Fig. 3). For the first fifteen days these polybags were kept in the culture room to save from the sudden shock of the sunlight. After fifteen days of interval these plants were easily transferred to field where they adapted without any sunburn injury, and ninety per cent of the plantlets survived and resumed growth (Fig. 4). When these explants attained about 2 m in height, they were pruned and cuttings were made and planted in the soil. Cuttings sprouted well and grew as well as cuttings derived from field-grown plants. Since preliminary observations on various morphological characters such as leaf shape, petiole length, area of leaf lamina and internodal distance did not show any significant variation as compared to the conventionally grown plants (from cuttings of field-grown plants), it indicates the varietal multiplication was true to type.



Fig. 4 : Established plants in the field, 6 months after transfer.

Fig. 4 : Plants établis en mûraie, six mois après le transfert.

CONCLUSION

From the foregoing research evaluation it is experienced that the nodal explants were the best source for rapid micropropagation of mulberry through *in vitro* cloning. Explants should be collected from field-grown mature trees during late winter to spring for speeding up the frequency of multiple shoot proliferation. On the other hand, early winter and winter period should be avoided for explant collection as this period affected *in vitro* propagation of mulberry microshoots. Through this method true-to-type mulberry plants can be raised all round the year in large numbers in comparison to any conventional method (cutting).

REFERENCES

AMIN M.N., JAISWAL V.S. (1987) Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 9, 235-244.

- BOGDANOVIC M. (1968) The influence of different factors on stem tissue cultures of *Pinus sylvestris* L. Zemljiste i biljka., 17(1), 135-145.
- GOGALA N.Z.J., CAMLOH M. (1988) Micropropagation of *Pinus sylvestris*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 14, 169-175.
- HUTCHINSON J.M. (1981) Tissue culture: propagation of fruit trees. In Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants. An Rao (ed.). Singapore, pp. 119-120.
- ISLAM R., JOARDER O.I., HOSSAIN M., ZAMAN A., BARMAN A.C. (1994) Clonal propagation of *Morus alba* L. cv S₁ from nodal explants of mature trees: maintenance of proliferating cultures. Sericologia, 34(2), 343-347.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol. Plant, 15, 475-497.
- NEKRASOVA T.V. (1964) The culture of isolated buds of fruit trees. Fiziologiya Rastenii, 11(1), 127-134.
- OKA S., OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.). In Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 1, Trees I, pp. 384-392.
- YADAV U., MADAN L., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* from shoot tip and nodal explants of mature trees. Scientia Hort., 44, 61-67.
- ZAMAN A., ISLAM R., HOSSAIN M., BARI M.A., JOARDER O.I. (1993) Plant regeneration and seedless fruit formation in nodal explant cultures of *Morus alba* L. cv. S₁. Sericologia, 33(2), 313-318.
- ZIMMERMAN R.H., BROOME O.C. (1980) Blueberry micropropagation. In Proc. Conf. Nursing Production of Fruit Plants through Tissue Culture – Application and Feasibility, US Dept. Agric. Sci. Educ. Adm., ARR-NE-11, pp. 44-47.

PROPAGATION DU MURIER A PARTIR DE LA MULTIPLICATION *IN VITRO* DES POUSSES : EFFETS DES SAISONS

A. ZAMAN¹, R. ISLAM², A.C. BARMAN¹ & O.I. JOARDER²

1. Mulberry Breeding and Biotechnology Division, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

2. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

Des segments nodaux et des apex de tiges de mûrier (Morus alba L. cv S1) ont été prélevés tous les mois, de janvier à décembre 1993, et cultivés dans le mois de prélèvement sur un milieu MS + BA 2 mg/l + 30 g/l saccharose. On a évalué les effets des différences saisonnières et des sources de prélèvement sur la multiplication in vitro. La fréquence de reproduction des pousses et le nombre de pousses par explant sont maximaux pour les lots prélevés de la fin de l'hiver au printemps (février à avril). La longueur de la pousse est élevée en été et à la saison pluvieuse et faible en hiver et au sortir de l'hiver. Dans tous les cas, les explants nodaux donnent davantage de pousses que les apex de tiges.

INTRODUCTION

Le mûrier est un arbre d'intérêt social et polyvalent tant au niveau de la sériciculture qu'au niveau de l'industrie forestière. C'est une plante fortement hétérozygote en raison de son mode de reproduction par pollinisation croisée. Le bouturage est la méthode de reproduction végétative la plus répandue car elle permet d'obtenir des plants conformes au type ancestral ; cependant, on ne peut l'utiliser que sur une seule saison, habituellement juste avant l'hiver (de septembre à octobre) au Bangladesh. Les boutures plantées à toute autre saison ne bourgeonnent pas et, si elles bourgeonnent, la croissance des plantules est retardée. Ceci est probablement dû à des influences saisonnières. De nombreux travaux utilisant les techniques de culture des tissus ont été réalisés au cours de la dernière décennie sur la micropropagation des mûriers au Japon (Oka et Ohyama, 1986), en Inde (Yadav et coll., 1990) et au Bangladesh (Islam et coll., 1994 ; Zaman et coll., 1993). Même en milieu contrôlé, l'organogenèse peut être influencée par les saisons (Bogdanovic, 1968 ; Gogala, 1988). On ne dispose cependant d'aucune information sur l'influence des saisons sur la multiplication *in vitro* des pousses de mûrier, cette étude a donc été entreprise afin d'observer les effets des différences saisonnières sur la prolifération *in vitro* des pousses de mûrier (*Morus alba* L. cv S1) afin de déterminer la saison la plus appropriée pour l'établissement des cultures.

MATERIELS ET METHODES

Des fragments de pousses (d'environ 5 à 6 cm) d'un mûrier âgé de 10 ans du genre *Morus alba* cv S1 de la collection variétale du *Bangladesh Sericulture Research and Training Institute* ont été prélevés tous les mois pendant un an (janvier à décembre) et utilisés pour cette étude. Les données (Tableau I) portant sur la multiplication *in vitro* des pousses ont été relevées 8 semaines après la mise en culture. Le processus de stérilisation et d'inoculation des explants pour le mois de janvier est décrit ci-dessous ; il a été suivi pour tous les autres mois.

Dans la première semaine de janvier 1993, les explants ont été prélevés dans des sacs en polyéthylène et transférés en laboratoire. Les expériences ont été réalisées avec la même source de

matériel pour les onze mois suivants. Les fragments comportant les explants nodaux et les apex de tiges ont été lavés soigneusement à l'eau du robinet pour éliminer les particules de poussière superficielles et les spores bactériennes et fongiques. Après traitement avec du Tween 80 (BDH) pendant 20 minutes, les explants ont été lavés dans de l'eau distillée. Ils ont ensuite été stérilisés par écoulement laminaire stérile à ultraviolet et traités par immersion successivement dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes et du HgCl_2 à 0,1 % pendant 10 minutes. Les segments nodaux (comportant un seul bourgeon axillaire) et les apex de tiges (environ 1,0 à 1,5 cm) ont été préparés en conditions aseptiques à partir de ces fragments de tiges et posés verticalement sur la surface du milieu. On a utilisé un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 2 mg/l de BA pour la multiplication des pousses. Il a été démontré que cette formulation est meilleure pour la multiplication des pousses chez le mûrier (Islam et coll., 1994 ; Zaman et coll., 1993). Le pH des milieux a été ajusté à 5,5 avec de la potasse ou de l'acide chlorydrique avant addition de Bacto-agar Difco à 0,7-0,8 %. Vingt ml de milieu ont été déposés dans des éprouvettes et stérilisés à l'autoclave à 121 °C avec une pression de 15 livres (6,8 kg)/cm² pendant 15 minutes. Toutes les cultures ont été maintenues à une température constante de 27 ± 1 °C et une photopériode de 16 h (2 000 lux).

RESULTATS ET DISCUSSION

Prolifération des pousses :

Les apex de tiges et les segments nodaux ont été prélevés et cultivés séparément pour chaque mois de l'année et les données ont été relevées 8 semaines après la mise en culture. Les effets des différentes saisons sur la multiplication des pousses *in vitro* sont résumés dans le tableau I. L'ouverture et la croissance des bourgeons sont fortement affectées par les saisons et par les conditions physiologiques associées de la branche mère d'où proviennent les explants. Les explants commencent à se multiplier après trois à quatre semaines de culture. Après multiplication, les explants comportant des masses de pousses en voie de multiplication ont été transférés dans des flacons coniques d'Erlenmeyer de 250 ml contenant davantage de milieu afin de répondre à leurs besoins croissants en éléments nutritifs et en espace. Le pourcentage maximal de multiplication des pousses et le nombre le plus élevé de pousses par explants ont été obtenus pour les explants prélevés durant la période allant de la fin de l'hiver au printemps (Fig. 1) (février à avril), devant l'été (mai à juin). Cependant, à mesure que l'hiver avance (novembre à janvier) ces paramètres diminuent fortement. La multiplication des pousses est plus élevée pour les segments nodaux que pour les apex de tiges, sauf au mois d'octobre, mois au cours duquel les apex de tiges donnent le pourcentage maximal de multiplication des pousses. Amin et Jaiswal (1987) ont observé, chez le goyavier, que la vitesse de multiplication des pousses est maximale lorsque les explants sont cultivés entre avril et juin. Les bourgeons de pêcher entrent en dormance à partir de la deuxième quinzaine de juillet et ne bourgeonnent pas avant novembre (Nekrasova, 1964). Nekrasova (1964) a également observé que les bourgeons de citronnier se développent et grandissent mieux en juillet, ce qui corrobore nos résultats. A la saison pluvieuse (juillet-août) et en automne (septembre-octobre), le taux de multiplication et d'allongement est meilleur qu'en hiver (novembre à janvier). On a également obtenu une multiplication des pousses axillaires sur le même milieu par culture des segments nodaux et des apex de tige. Le fait que les explants nodaux répondent mieux que les apex de tiges peut être attribué à l'absence d'une dominance de l'extrémité et à la présence de bourgeons axillaires à un stade avancé de développement. Chez le pommier (Hutchinson, 1981) et la mûre sans épines (Zimmerman et Broome, 1980), les explants nodaux sont également supérieurs pour la micropropagation. La longueur de la micropousse est influencée par la période de prélèvement, ce qui a été observé visuellement par répétition des expériences sur la réponse des segments nodaux et des apex de tiges prélevés tous les mois. Dans ce cas, les résultats diffèrent légèrement et ne sont pas corrélés avec le taux et le nombre de pousses multipliées. Dans la plupart des cas, les segments nodaux donnent de meilleurs résultats que les apex de tiges pour ce qui concerne la longueur de la pousse.

Racinement des microboutures :

Les microboutures (supérieures à 2 cm) issues des pousses multipliées *in vitro* ont été implantées sur un ½ milieu MS comportant 20 g/l de sels inorganiques et de saccharose et 0,1 mg/l d'acide

indol-butyrique (AIB), car il a été démontré que cette formulation donne la meilleure induction de racines (Zaman et coll., 1993) (Fig. 2). Le nombre de racines par microbouture et la longueur moyenne des racines ne sont pas affectés par les différences saisonnières.

Transfert et établissement *in vivo* des plantules :

Les plantules obtenues *in vitro* ont été prélevées dans les éprouvettes, lavées avec précaution pour éliminer les milieux nutritifs et transplantées dans de petits sacs en polyéthylène contenant du sol de jardin non stérile et du compost dans une proportion de 1:1 (Fig. 3). Pendant les quinze premiers jours, ces sacs ont été conservés dans la pièce de culture afin d'éviter un choc dû à l'exposition au soleil. Après quinze jours, les plants ont pu être facilement transférés en mûraie où ils se sont adaptés sans être brûlés par le soleil ; 90 % des plantules ont survécu et ont repris leur développement (Fig. 4). Lorsque ces explants ont atteint 2 m de haut, ils ont été taillés, des boutures ont été réalisées et plantées dans la terre. Les boutures ont bien bourgeonné et se sont développées aussi bien que des boutures issues de plants cultivés en mûraie. Les observations préliminaires sur divers caractères morphologiques tels que la forme de la feuille, la longueur du pétiole, la surface foliaire et la distance internodale ne présentant pas de variation significative par rapport aux plants cultivés suivant les méthodes conventionnelles (boutures de plants cultivés en mûraie), la multiplication variétale est donc conforme au type ancestral.

CONCLUSION

Les résultats de l'évaluation présentée ici montrent que les explants nodaux constituent la meilleure source de micropropagation rapide du mûrier par clonage *in vitro*. Les explants doivent être prélevés sur des arbres adultes cultivés en mûraie pendant la période allant de la fin de l'hiver au printemps pour accélérer la fréquence de multiplication des pousses. Par ailleurs, il faut éviter de prélever les explants au début de l'hiver car cette période affecte la multiplication *in vitro* des micropousses de mûrier. Cette méthode permet d'obtenir des plants de mûrier conformes au type ancestral qui peuvent être cultivés toute l'année, contrairement aux méthodes conventionnelles (bouturage).

PUPA-WASTE, AN ALTERNATIVE RESOURCE FOR ISOLATION OF LECITHIN

S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA, R. KAR & T. PAVAN KUMAR

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

With a view to selecting suitable indigenous sources for isolation of lecithin, silkworm pupa-waste was analysed for its content. The results confirmed by thin-layer chromatography (TLC) show large quantities of ester availability. This opens up a natural source hitherto unexploited.

Keywords: Pupa-waste, lecithin, thin-layer chromatography (TLC).

INTRODUCTION

Lecithin, a phospholipid, is distributed in animal and plant tissues and is a primary constituent of cells (Kunze, 1941). It is associated with a variety of vital metabolic functions and has, therefore, been studied extensively (Wittcoff, 1951). Lecithin is fatty acid ester of glycerophosphate with a choline base attached to terminal oxygen of phosphoric acid (Desneulle, 1952). It is widely used in various food and pharmaceutical products (Ghatak and Krishna Murty, 1955a). It is used as an antioxidant for vegetable oils and fish liver oils (Calkin, 1947). As an antioxidant, lecithin has certain advantages over other commonly used chemicals. The main features of lecithin are high solubility in fats and oils, edibility and absence of deleterious effects on products and, therefore, it is recommended in food industries. In pharmaceutical products, it is used in antimalarial therapy (Jerace, 1935). Products obtained by interaction of lecithin and a bismuth compound are used in the treatment of late forms of syphilis (Liebrecht, 1930). Intravenous injection of lecithin and olive oil showed success in the treatment of pyelitis (Narat, 1938). Emulsified extracts of egg yolk are commercialised as tonic (Rosanova, 1941). Besides, it has several medicinal applications.

It is reported that more than 200 tonnes of lecithin are imported annually (Parpia, personal communication). Egg yolk, soyabean, mustard seeds, pulses and mustard cakes have been used traditionally as raw materials for commercial production of lecithin (Ghatak and Krishna Murty, 1955b; Talwalkar *et al.*, 1965; Talwalkar *et al.*, 1966; Talwalkar *et al.*, 1969; Garg *et al.*, 1975). But the high cost and other prioritised utilities of these raw materials, alternate and natural sources that economise isolation of lecithin are always welcome. It is thus silkworm pupa-waste (currently used as poultry feed, fish meal, manure, etc.) was chosen as a source, since silkworm pupae have rich concentrations of oils (Shimizu, 1962) which might be due to compartmentalised metabolic profiles in *Bombyx mori*. Besides, as per a rough estimate 14,500 tonnes of pupae are generated from the reeling sector per annum.

MATERIALS AND METHODS

A quantity of 1.4 kg of *Bombyx mori* pupa-waste was collected from the Reeling Section at the Central Sericultural Research and Training Institute (CSR&TI), Berhampore, India, and dried at 70 °C in an oven until complete drying. The dried material was finely powered and stored in a desiccator. Two hundred and fifty g of pupa powder was taken in a thimble and oil was extracted by Soxhlet apparatus using hexane (b.p. 67-69 °C) as solvent. The oil obtained was 68.25 g.

Lecithin was precipitated by adding cold acetone. The precipitate was separated and dried *in vacuum* until free from acetone. The precipitate obtained was 1.5 g.

RESULTS AND DISCUSSION

Thin-layer chromatography (TLC) of the acetone precipitate was carried out on silica gel G using Stahl's method. For one dimensional run, the solvent system used was chloroform-methanol-acetic acid-water (65:15:10:4). Standard lecithin from egg source was simultaneously run and lecithin was detected by spraying Hanes reagent and heating at 110 °C (Stahl, 1969). From the chromatogram, it is clear that lecithin is present in large titres (Fig. 1). As explicitly reflective, late age onwards metabolic compartmentalisation for reproduction sequences up (Tazima, 1987), which might be the reason for the observed trend.

Fig. 1: Detection of lecithin in acetone precipitate of pupa-oils (*Bombyx mori* L.) by TLC using silica gel G (layer thickness 0.5 mm) and chloroform-methanol acetic acid-water (65:15:10:4) as developing solvent.

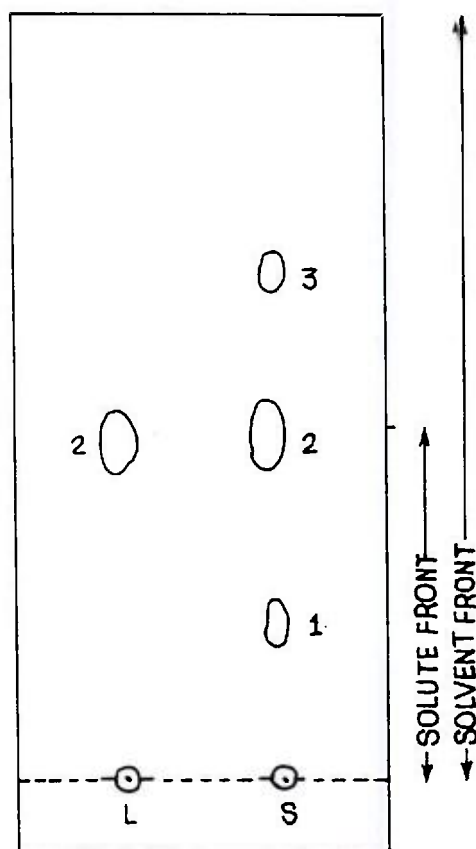
Sprayed with Hanes reagent.

L: Authentic lecithin. S: Acetone precipitate of pupa-oils. 1 and 3 spots: unidentified compounds. 2 spot: Lecithin.

Fig. 1 : Détection de la lécithine dans un précipiat à l'acétone d'huile de chrysalide (*Bombyx mori* L.) par chromatographie en couche mince sur gel G (épaisseur de la couche : 0,5 mm) et avec une combinaison de chloroforme, acide acétique, eau (65:15:10:4) comme solvant de développement.

Vaporisé avec le réactif de Hanes.

L : Lécithine authentique, S : Précipité à l'acétone d'huile de chrysalide. 1 et 3 : Composés non identifiés. 2 : Lécithine.



The crude lecithin is creamy white and turns brown on keeping for some time and forms emulsion with water.

From the above results, it is clear that pupa-waste, which is currently used for poultry feed, fish meal and manure, can be utilised as a raw material for isolation of lecithin. Trials are under way to improve the method.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Shri Jayanta Dhar Gupta for typing the manuscript in computer at CSR & TI, Berhampore.

REFERENCES

- CALKIN V.P. (1947) J. Amer. Chem. Soc., 169, 384. *In* Lecithin and its importance. J. Sci. Ind. Res., 1995, 14A, 290.
- DESNEULLE P. (1952) Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids. Pergamon Press Ltd., London, 1, 70.
- GARG N.K., BOSE S.K., GHATAK S. (1975) Lecithin from oil cakes. Res. & Ind., New Delhi, 20, 58-60.
- GHATAK S., KRISHNA MURTI C.R. (1955a) Lecithin and its importance. J. Scient. Ind. Res., 14A, 285-292.
- GHATAK S., KRISHNA MURTI C.R. (1955b) Preparation of phosphatides from Indian pulses. J. Scient. Ind. Res., 14C, 58.
- JERACE F. (1935) Rass Clin. Terap., 34, 88. *In* Lecithin and its importance. J. Sci. Ind. Res., 1995, 14A, 289.
- KUNZE R. (1941) Lecithin. Verlag Rosenmeir & Saenger K.G., Berlin.
- LIEBRECHT A. (1930) U.S.Pat. 1, 777, 173; Chem. Abstr., 25, 5554.
- NARAT J.K. (1938) J. Urol., 39, 75. *In* Lecithin and its importance. J. Sci. Ind. Res., 1995, 14A, 289.
- ROSANOVA G. (1941) Ann. Chim. Applicata, 31, 488. *In* Lecithin and its importance. J. Sci. Ind. Res., 1995, 14A, 289.
- SHIMIZU M. (1962) *In* Synthesised Science of Sericulture. Ed. T. Yokoyama, Central Silk Board, Bombay, p. 373.
- STAHL E. (1969) Thin-layer Chromatography, a Laboratory Handbook. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- TALWALKAR R.T., GARG N.K., KRISHNA MURTI C.R. (1965) Effect of fat-free diet on the *in vitro* formation of lipid peroxides in rat tissues and succinate dehydrogenase activity and lipid composition of liver mitochondria. J. Fd. Technol., 2, 117.
- TALWALKAR R.T., GARG N.K., KRISHNA MURTI C.R. (1966) Properties of phosphatides prepared from rice bran, *Cicer arietinum* and *Phaseolus aureus*. Ind. J. Biochem., 3, 124-127.
- TALWALKAR R.T., GARG N.K., KRISHNA MURTI C.R. (1969) Production of lecithin from Bengal gram and nutritional evaluation of the extracted flour. Res. & Ind., New Delhi, 14, 163.
- TAZIMA Y. (1987) The Silkworm: an Important Laboratory Tool. Kodansha Ltd., Tokyo.
- WITTCOFF H. (1951) The Phosphatides. Reinhold Publishing Corporation, New York.

LES DECHETS DE CHRYSALIDES : UNE NOUVELLE SOURCE DE LECITHINE

S.K. MAJUMDER, R.N. DUTTA, R. KAR & T. PAVAN KUMAR

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, West Bengal, Inde.

Afin de sélectionner des sources locales appropriées pour l'isolement de la lécithine, on a analysé le contenu des déchets de chrysalides de vers à soie. Les résultats, confirmés par chromatographie en couche mince, font apparaître des quantités importantes d'ester disponible. Ces résultats permettent de mettre en évidence une nouvelle source naturelle encore inexploitée.

INTRODUCTION

La lécithine, un phospholipide, se trouve dans les tissus animaux et végétaux et est un composant primaire des cellules (Kunze, 1941). Etant associée à un grand nombre de fonctions métaboliques vitales, elle a été étudiée de manière approfondie (Wittcoff, 1951). La lécithine est un ester d'acide gras de glycérophosphate avec une base de choline attachée à l'oxygène terminal de l'acide phosphorique (Desneulle, 1952). Elle est utilisée couramment dans divers produits alimentaires et pharmaceutiques (Ghatak et coll., 1955a). Elle sert d'antioxydant dans les huiles végétales et de foie de poisson (Calkin, 1947). Comme antioxydant, la lécithine présente certains avantages sur d'autres substances chimiques communes. Les principales caractéristiques de la lécithine sont une solubilité élevée dans les graisses et les acides, sa comestibilité et l'absence d'effets délétères sur les produits ; son utilisation est donc recommandée dans l'industrie alimentaire. Pour ce qui concerne les produits pharmaceutiques, elle est utilisée dans les traitements antimalariques (Jerace, 1935). Les produits obtenus par l'interaction de la lécithine et d'un composé de bismuth sont utilisés dans le traitement des formes terminales de la syphilis (Liebrecht, 1930). L'injection intraveineuse de lécithine et d'huile d'olive permet de traiter la pyélite (Narat, 1938). L'extrait émulsifié de jaune d'oeuf est commercialisé comme fortifiant (Rosanova, 1941). La lécithine peut également être utilisée dans des applications médicinales.

Plus de 200 tonnes de lécithine sont importées en Inde chaque année (Parpia, communication personnelle). Le jaune d'oeuf, le soja, la graine de moutarde, les légumineuses et le tourteau de moutarde constituent les matières premières traditionnelles pour la production de lécithine à l'échelle industrielle (Ghatak et coll., 1955b ; Talwalkar et coll., 1965, 1966, 1969 ; Garg et coll., 1975). Cependant, du fait du coût élevé de ces matières premières et de leur utilisation en priorité dans d'autres secteurs, d'autres sources naturelles d'isolement de la lécithine sont toujours les bienvenues. Nous avons donc choisi comme source les déchets de chrysalides de vers à soie (actuellement utilisés dans l'alimentation des volailles, comme farine de poisson, engrais, etc.) car les chrysalides sont riches en huiles (Shimizu, 1962), probablement en raison de la compartimentation des profils métaboliques chez *Bombyx mori*. En outre, le secteur du dévidage produit environ 14 500 tonnes de chrysalides par an.

MATERIELS ET METHODES

Un total de 1,4 kg de déchets de chrysalides de *Bombyx mori* a été fourni par la section de dévidage du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore (Inde). Les déchets ont été séchés au four à 70 °C jusqu'à séchage total. Le matériel séché a été pulvérisé et stocké dans un dessiccateur. Deux cent cinquante grammes de poudre de chrysalides ont été prélevés à l'aide d'un

dé à coudre et l'huile a été extraite dans un appareil de Soxhlet avec de l'hexane (point d'ébullition 67-69 °C) comme solvant. La quantité d'huile obtenue est de 68,25 g.

La lécithine a été précipitée par addition d'acétone froide. Le précipité a été séparé et séché sous vide jusqu'à ce qu'il soit libéré de l'acétone. La quantité de précipité obtenu est de 1,5 g.

RESULTATS ET DISCUSSION

La chromatographie en couche mince du précipité à l'acétone a été réalisée sur un gel G de silice, selon la méthode de Stahl. Pour l'écoulement unidimensionnel, on a utilisé un système solvant composé de chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65:15:16:4). De la lécithine standard issue d'oeuf a été coulée simultanément et la lécithine a été détectée en vaporisant du réactif de Hanes et par chauffage à 110 °C (Stahl, 1969). Le chromatogramme obtenu montre clairement que la lécithine est présente dans des quantités importantes (Fig. 1). Comme cela a été explicitement démontré, à partir du dernier âge, la compartimentation métabolique pour la reproduction s'ordonne (Tazima, 1987) : ce qui pourrait expliquer la tendance observée.

La lécithine brute est de couleur blanc crème et vire au marron lorsqu'elle est conservée pendant quelques temps et forme une émulsion dans l'eau.

Il ressort de ces résultats que les déchets de chrysalide, actuellement utilisés dans l'alimentation des volailles, comme farine de poisson ou comme fumier, peuvent servir comme source d'isolement de lécithine. Des tests sont en cours afin d'améliorer cette méthode.

CORRELATION BETWEEN FEMALE MOTH WEIGHT AND FECUNDITY IN THE OAK TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA PROYLEI* J.

M.K. GHOSH¹, C.M. BABU¹, K.M. PONNUVEL¹ & R.C. SRIVASTAVA²

1. Regional Tasar Research Station, Imphal - 795002, India.

2. Life Sciences Department, Tripura University, Agartala - 799004, India.

*The correlation of female moth weight with fecundity was studied in the oak tasar silkworm, **Antheraea proylei**. A positive and highly significant correlation existed between female moth weight and fecundity (by number and weight).*

Keywords: *Antheraea proylei*, female moth weight, fecundity, correlation.

INTRODUCTION

Oak tasar silk in India is produced from those cocoons which are spun by a wild species of the genus *Antheraea*, evolved by the relentless efforts by crossing between *A. pernyi* of China and *A. roylei* of India. The oak tasar silkworm, *A. proylei*, is a univoltine species. About 7-12% of the moths emerge from the cocoons from the spring harvest while the rest of the pupae undergo hibernation. Since summer/autumn crop is a failure in India, the univoltine lot has become the only safeguard against the threat of losing the stock of oak tasar silkworms. Such univoltine stock is utilised for raising spring-to-spring crops. Although an additional crop (summer/autumn) can be raised by terminating the diapause by subjecting the pupae to a 16-h photoperiod treatment for 25 days (Kumar and Sinha, 1974), even then the cocoon yield is not to the expectation. In breeding and rearing of saturniids, which have been exploited for silk production, the selection of female moths is very important to get a higher number of eggs. A positive correlation has been established between female pupal weight and fecundity by Shamachary and Krishnaswami (1980) and Gowda *et al.* (1988) in *Bombyx mori* and Nagalakshamma *et al.* (1988) in *Samia cynthia ricini*. Rothschild (1968) observed such a relationship in a lepidopterous insect, *Spodoptera mauritia*. A fairly good amount of works on this aspect have been done on lepidopterans by many workers, i.e., Crawford (1971), Jennings (1974), Miller *et al.* (1982), Nagalakshamma (1987) and Badhera (1992) but no work seems to have been done in this line on the present insect. An attempt has therefore been made in the present investigation to find out the relationship between female moth weight and fecundity for estimating egg production by number and weight.

MATERIALS AND METHODS

Four hundred and fifty female moths of the univoltine oak tasar silkworm, *Antheraea proylei*, were randomly selected just after emergence from the cocoons. The weight of 200 female moths was recorded individually on a digital electronic balance, the moths were marked and allowed to copulate with male moths for 6 h and then decoupled and kept for laying in cellules in a perforated plastic box. The moths were allowed to lay eggs till exhaustion. Temperature and relative humidity (RH) were maintained during oviposition as per the recommendation of Jolly *et al.* (1974) with a slight modification of temperature and RH at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$, respectively. Male moths were not weighed, as it has been studied by Gowda *et al.* (1988) and Nagalakshamma *et al.* (1988) that male

moth weight has no impact on fecundity. Examination of mother moths was also done to eliminate any disease effect of moths on fecundity. Fecundity was based on the number and weight of eggs laid. The resultant layings from 25 mother moths were successfully counted and weighed, and were subjected to statistical analysis as per Pearson's formula given by Elhance (1977) to study the correlation coefficients between female moth weight and egg number and also between female moth weight and egg weight.

RESULTS AND DISCUSSION

The female population of varying moth weight was observed to determine its relation with actual fecundity both by number and weight of eggs. There was a positive and significant correlation between female moth weight and fecundity by number ($r = 0.96$) and weight ($r = 0.95$) as the table value of the coefficient of correlation (r) at the 1% level of significance is 0.487 (Table I). Since the relationship of fecundity with the female moth weight was significant, the regression equations of egg number (y_1) and moth weight (x) and egg weight (y_2) on moth weight (x) were obtained. After plotting all the data on a graph, the linear regression line was drawn by using estimated values of y_1 and y_2 at different values of x (Fig. 1 and 2). These are in agreement with Rothschild (1968), Crawford (1971), Kumar and Sinha (1974), Jennings (1974), Blueswiss *et al.* (1978), Shamachary and Krishnaswami (1980), Miller *et al.* (1982), Nagalakshamma (1987), Singh and Prasad (1987), Gowda *et al.* (1988), Nagalakshamma *et al.* (1988), Kotikal *et al.* (1989), Kasule (1991) and Badhera (1992) who also reported similar findings in their experimental lepidopteran insects. Currently, a mean female moth weight of 2.79 g produced 0.979 g of eggs by weight and 121.83 eggs (by number) (Table I). It was also found that 35.08% of moth weight was transformed into egg weight. Moreover, from one gramme of moth weight 43.66 eggs could be obtained by number.

Table I. Female moth weight and its relation with the egg number and egg weight.

Tableau I. Poids du papillon femelle et relation entre ce poids et le nombre et le poids des oeufs.

Mean of 25 observations <i>Moyenne de 25 mesures</i>					Correlation coefficient between <i>Coefficient de corrélation entre</i>	
M _w (g)	E _n	E _w (g)	E _n /M _w	E _w /M _w	E _n M _w	E _w M _w
2.79	121.83	0.979	43.66	0.35	0.96	0.95

M_w: Moth weight / *Poids du papillon*. E_n: Egg number / *Nombre d'oeufs*. E_w: Egg weight / *Poids de l'oeuf*.

This study may help to some extent in estimating the production of exact quantity of eggs by weight and number right at the time of rearing on the basis of the actual demand to cater to the needs of rearing programmes. This study is more pertinent for temperate climatic conditions, such as prevailing in Imphal valley, parts of Himachal Pradesh and Uttar Pradesh where usually a single rearing schedule in the spring season is followed.

Fig. 1: Regression of y_1 (egg no.) on x (moth weight).

Fig. 1 : Régression de y_1 (nombre d'oeufs) sur x (poids du papillon).

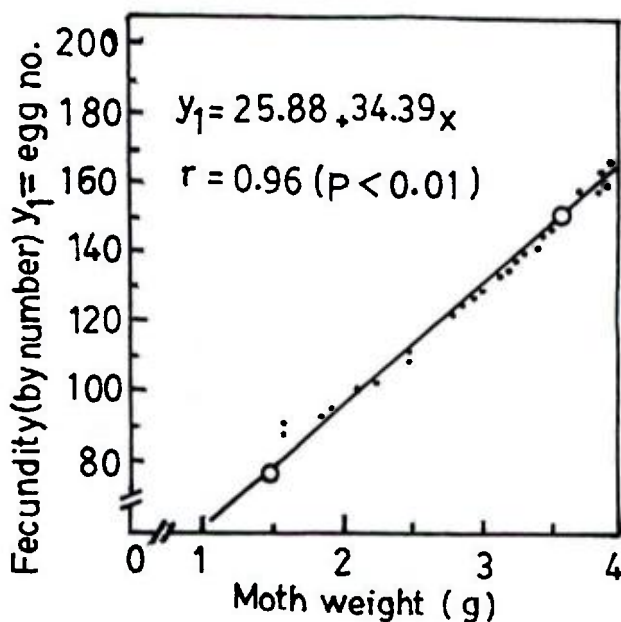
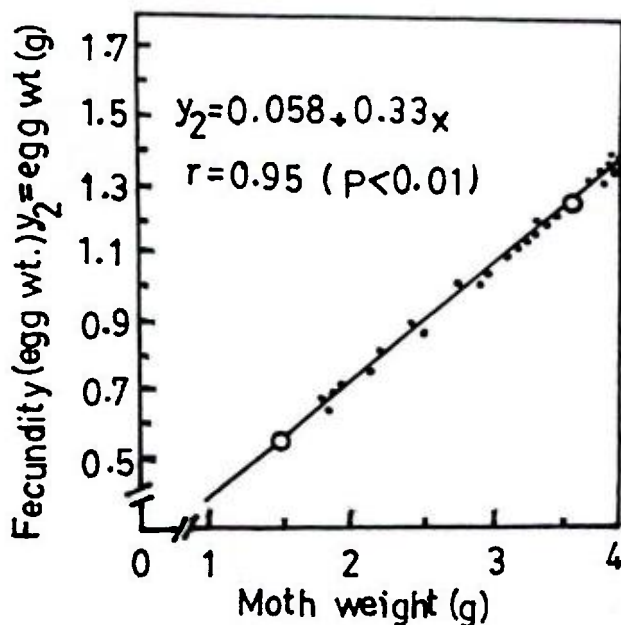


Fig. 2: Regression of y_2 (egg weight) on x (moth weight).

Fig. 2 : Régression de y_2 (poids de l'oeuf) sur x (poids du papillon).



REFERENCES

- BADHERA S. (1992) Relationship between pupal dimensions and fecundity in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). Uttar Pradesh J. Zool., 12(1), 37-39.

- BLUESWISS L., FOX H., KUDZMA V., NAKASHIMA A.D., PETER R., SAMA S. (1978) Relationship between body size and some life history parameters. *Oecologia*, 37, 252-272.
- CRAWFORD C.S. (1971) Comparative reproduction of *Crambus harpipterus* and *Agriphila plumbifunbriella* in Northern New Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 64, 52-69.
- ELHANCE D.N. (1977) Practical Problems in Statistics. Kitab Mahal, Allahabad, pp. 159-160.
- GOWDA B.L.V., SANNAVEERAPPANAVAR V.T., SHIVAYGESHWAR B. (1988) Impact of pupal weight on fecundity of *Bombyx mori*. International Congress on Tropical Sericultural Practices, Central Silk Board, Bangalore, Feb., p. 81.
- JENNINGS D.T. (1974) Potential fecundity of *Rhyacionia neomexicana* Dyar related to pupal size. *J. Lepid. Soc.*, 28, 131-136.
- JOLLY M.S., SEN S.K., AHSAN M.M. (1974) *Tasar Culture*. Ambika Publishers, Bombay, 110 pp.
- KASULE F.K. (1991) Association of fecundity with adult size in the cotton stainer bug, *Dysdercus fasciatus*. *Heredity*, 66, 281-286.
- KOTIKAL Y.K., REDDY D.N.R., PRABHU A.S., BHAT G.G., PUSHPALATHA S. (1989) Relationship between pupal size and egg production in eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Indian J. Seric.*, 28, 80-82.
- KUMAR P.A., SINHA S.S. (1974) Effect of photoperiod and temperature on pupal diapause in *Antheraea pernyi*. 1st Int. Sem. Non-mulberry silk, pp. 135-142.
- MILLER A.T., COOPER W.J., HIGHFILL J.W. (1982) Relationship between pupal size and egg production in reared female *Antheraea polyphemus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 75, 107-108.
- NAGALAKSHMAMMA K. (1987) Investigation on some aspects of seed technology in eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval. M.Sc. (Agri.) Thesis, Bangalore, India, 84 pp.
- NAGALAKSHMAMMA K., GOWDA B.L.V., DEVAIAH M.C. (1988) Relationship between pupal weight and fecundity in *Samia cynthia ricini*. International Congress on Tropical Sericultural Practices, Central Silk Board, Bangalore, Feb., 56 pp.
- ROTHSCHILD G.H.L. (1968) Observations on the army worm, *Spodoptera mauritia acronyctoides* (Lep.: Noc.) in Sarawak (Malaysian Borneo). *Bull. Ent. Res.*, 59, 143-160.
- SHAMACHARY S.M.V., KRISHNASWAMI S. (1980) Some useful correlation studies of silkworm and its products such as cocoon, pupa, shell and egg weight. *Indian J. Seric.*, 19, 4-8.
- SINGH Y.R., PRASAD B. (1987) Correlation among body weight, pupal weight and fecundity in eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt. (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 27, 49-60.

CORRELATION ENTRE LE POIDS DU PAPILLON FEMELLE ET LA FECONDITE CHEZ LE VER A SOIE TASAR DU CHENE, *ANTHERAEA PROYLEI* J.

M.K. GHOSH¹, C.M. BABU¹, K.M. PONNUVEL¹ & R.C. SRIVASTAVA²

1. Regional Tassar Research Station, Imphal - 795020, Inde.

2. Life Sciences Department, Tripura University, Agartala - 799004, Inde.

*On a étudié la corrélation entre le poids du papillon femelle et la fécondité chez le ver à soie tassar du chêne, *Antheraea proylei*. Il existe une corrélation positive et fortement significative entre le poids du papillon femelle et la fécondité (en nombre et en poids).*

INTRODUCTION

En Inde, la soie tassar du chêne est obtenue à partir des cocons filés par une espèce sauvage appartenant au genre *Antheraea* et isolée par croisement d'*A. pernyi* de Chine avec *A. roylei* d'Inde. Le ver à soie tassar du chêne *Antheraea proylei* est une espèce monovoltine. Environ 7 à 12 % des papillons émergent des cocons issus de la récolte de printemps tandis que le reste des chrysalides subissent une hibernation. Les récoltes d'été et d'automne étant médiocres en Inde, les lots monovoltins constituent le seul moyen d'écartier le risque de perdre les stocks de vers à soie tassar. Ces stocks monovoltins sont utilisés pour obtenir des récoltes de printemps. Bien qu'il soit possible d'obtenir une récolte supplémentaire en levant la diapause des chrysalides en les soumettant à une photopériode de 16 heures pendant 25 jours (Kumar et Sinha, 1974), le rendement en cocons reste faible. Lors de la sélection et de l'élevage des saturniidés, qui sont exploités pour leur soie, le choix des papillons femelles est très important si l'on veut obtenir une bonne production d'œufs. Une corrélation positive a été établie entre le poids de la chrysalide femelle et la fécondité chez *Bombyx mori* (Shamachary et Krishnaswami, 1987 ; Gowda et coll., 1988) et chez *Samia cynthia ricini* (Nagalakshamma et coll., 1988). Rothschild (1968) a observé une relation de même type chez un lépidoptère, *Spodoptera mauritia*. Un nombre assez important de travaux a été réalisé sur les lépidoptères (Crawford, 1971 ; Jennings, 1974 ; Miller et coll., 1982 ; Nagalakshamma, 1987 ; Badhera, 1992) mais il n'existe apparemment aucune étude sur ce sujet pour *Antheraea proylei*. Cette étude vise donc à établir une relation entre le poids du papillon femelle et la fécondité afin d'évaluer la production d'œufs en nombre et en poids.

MATERIELS ET METHODES

On a sélectionné de manière aléatoire 450 papillons femelles de l'espèce monovoltine tassar du chêne *Antheraea proylei* immédiatement après leur émergence des cocons. On a relevé le poids individuel de 200 papillons femelles sur une balance électronique digitale : les papillons ont été marqués et accouplés aux mâles pendant 6 h. Ils ont ensuite été découplés et déposés dans des cellules dans une boîte en plastique perforée pour la ponte. Les papillons ont pondu jusqu'à épuisement. La température et l'humidité relative maintenues pendant l'oviposition sont celles recommandées par Jolly et coll. (1974) et légèrement modifiées : température de 25 ± 1 °C et humidité relative de 75 ± 5 %. Les papillons mâles n'ont pas été pesés car il a été démontré que le poids des papillons mâles n'avait pas d'impact sur la fécondité (Gowda et coll., 1988 ; Nagalakshamma, 1988). On a également examiné les papillons femelles afin d'éliminer les effets des maladies sur la fécondité. La fécondité est basée sur le nombre et le poids d'œufs pondus. Les pontes issues de 25 papillons femelles

ont été comptées et pesées, elles ont ensuite été soumises à analyse statistique selon la formule de Karl Pearson donnée par Elhance (1977) afin de déterminer les coefficients de corrélation entre le poids du papillon femelle et le nombre d'oeufs, d'une part, et le poids du papillon femelle et le poids des oeufs, d'autre part.

RESULTATS ET DISCUSSION

La variation du poids des papillons femelles détermine sa relation avec la fécondité réelle aussi bien en nombre qu'en poids. Il y a une corrélation positive et fortement significative entre le poids du papillon femelle et la fécondité en nombre ($r = 0,96$) et en poids ($r = 0,95$), la valeur tabulaire du coefficient de variation (r) au seuil de 1 % étant de 0,487 (Tableau I). Etant donné que la relation entre la fécondité et le poids du papillon femelle est significative, on a calculé les équations de régression du nombre d'oeufs (y_1) sur le poids du papillon (x) et du poids des oeufs (y_2) sur le poids des papillons (x). Après avoir relevé l'ensemble des données sur un graphique, on a tracé une courbe de régression linéaire en utilisant les valeurs estimées de y_1 et de y_2 aux différentes valeurs de x (Fig. 1 et 2). Ces résultats sont en accord avec ceux de Rothschild (1968), Crawford (1971), Kumar et Sinha (1974), Jennings (1974), Blueswiss et coll. (1978), Shamachary et Krishnaswami (1980), Miller et coll. (1982), Nagalakshamma (1987), Singh et Prasad (1987), Gowda et coll. (1988), Nagalakshamma et coll. (1988), Kotikal et coll. (1989), Kasule (1991) et Badhera (1992). Tous ces chercheurs ont obtenu des résultats similaires avec des lépidoptères.

Dans cette étude, un poids moyen de 2,79 g chez le papillon femelle permet de produire 0,979 g d'oeufs (en poids) et 123,83 oeufs (en nombre) en moyenne (Tableau I). On observe également que 35,08 % du poids du papillon sont transformés en poids d'oeuf. De plus, un gramme de papillon donne 43,66 oeufs (en nombre).

Cette étude peut, dans une certaine mesure, aider à estimer la production exacte d'oeufs en nombre et en poids dès le moment de l'élevage sur la base de la demande réelle afin de répondre aux besoins des programmes d'élevage. Les résultats présentés ici sont applicables essentiellement dans des conditions climatiques tempérées comme celles que connaissent la vallée d'Imphal et certaines parties de l'Himachal Pradesh et de l'Uttar Pradesh où l'on pratique normalement un seul élevage par an au printemps.

ANTHRACNOSE OF MULBERRY — FIRST REPORT FROM INDIA

J. LATHA JANARDHAN, T. PHILIP, GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA

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

*The occurrence of the anthracnose disease of the mulberry leaf was observed for the first time in India from the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, and other places in South India. The disease symptoms appeared as brown to reddish brown round eyespots on the leaf blade which extend irregularly towards the margin. The causal organism was identified as *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.). The isolation and pathogenicity test proved that the fungus is pathogenic to mulberry. The growth (in vitro) of the pathogen was suppressed completely by the fungicide Blitox (0.2%).*

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, anthracnose, mulberry, fungicide screening.

INTRODUCTION

High-yielding and genetically diverse mulberry cultivars are grown under a wide range of agroclimates as sole food plant of the silkworm (*Bombyx mori* L.). This makes it prone to various season-bound and round-the-year prevalent mulberry diseases. The incidence of the anthracnose disease was recorded at the Central Sericultural Research and Training Institute (CSRTI), Mysore, and other parts of South India during a survey conducted in the year 1992. The present paper deals with the disease symptoms, isolation, identification and screening of fungicides against the pathogen *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

For isolation of the pathogen, diseased leaf samples were collected from CSRTI campus. Leaf bits of about 2-5 mm size were cut from the infected portion, surface sterilized, washed in sterile distilled water and transferred aseptically on potato dextrose agar media in plates. The plates were incubated at 26 ± 2 °C. The fungus progressively growing around the bits was examined from the third day onwards and the morphological and cultural characters were studied. The fungus was identified with the help of illustrated manuals (Ellis, 1971; Domosch *et al.*, 1980; Mordue, 1971) and confirmed by expert identification. Pathogenicity was tested on three-month-old saplings. The conidia were collected in sterilized distilled water from a 10-day-old culture and sprayed/inoculated to the healthy leaf. Control plants were sprayed with distilled water. Inoculated plants were covered with sterile polythene bags for 48 hours to provide humidity and to protect from natural infection.

For *in vitro* screening of fungicides, copper oxychloride 50% WDP, Carbendazim 50% WP, chlorothalonil 75% WP, Mancozeb 75% WP, Captafol 80% DS and Captan 50% WP were tested at 0.05, 0.1 and 0.2% concentration by the 'food poison technique' (Sharville, 1961). Three replications were maintained. The efficacy of the fungicides was assayed on the 7th day by measuring the radial growth of the test fungus on PDA amended with different concentrations of fungicides and compared with the growth in control plates containing PDA without fungicide. The percentage of mycelial inhibition was calculated using the formula of Vincent (1947).

RESULTS

The disease symptoms initially appear as brown to reddish brown, round or oval eyespots on the leaf blade which irregularly spread towards the margin. As the spots enlarged, their central portion turns brown and usually reached the diameter of 8-15 mm with an irregular shape (Fig. 1).

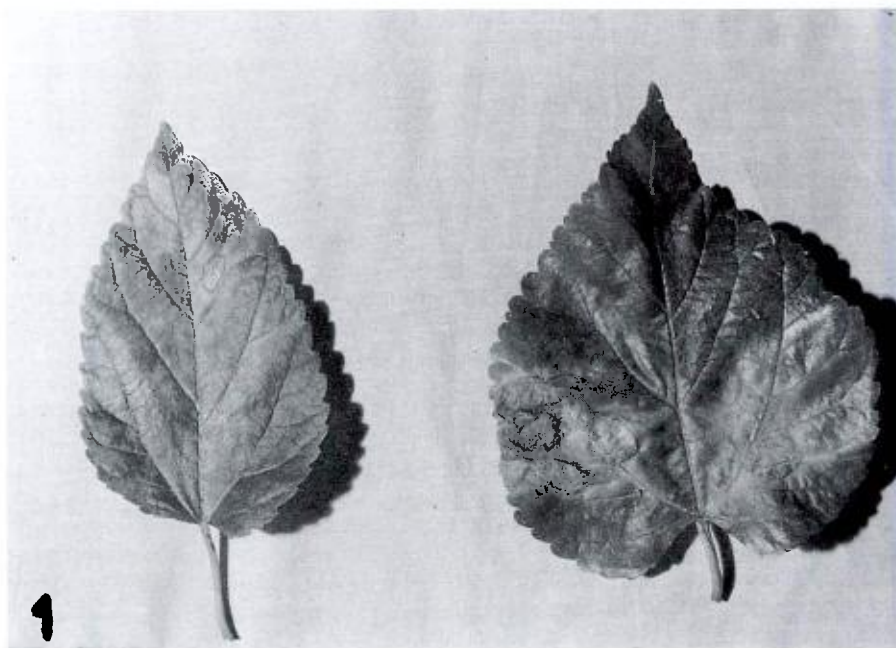


Fig. 1: Initial and final stages of disease symptoms.

Fig. 1 : Stades initial et final des symptômes de la maladie.

The fungus produced greyish white mycelia with a pink- or salmon-coloured conidial mass which appeared on the culture after 10 days of culturing. Growth and sporulation of the fungus was excellent on oat and corn meal agar media. The fungus produced conidia on short, erect conidiophores. The conidia were unicellular, ovoid, hyaline, cylindrical or dumbbell-shaped and $13-22\ \mu\text{m} \times 4-5\ \mu\text{m}$ in size (Fig. 2). The fungal growth is favoured by high temperature ($28-32\ ^\circ\text{C}$) and humid weather (75-90% RH). The conidia get released and spread when the acervuli are wet and disseminated by splashing rain drops. The fungus was identified as *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) and was found to be unreported previously on mulberry (Philip *et al.*, 1994).

On the artificially inoculated plants, symptoms as described earlier started appearing on the 5th day after spraying. The same fungus was reisolated from such infected leaves, thus proving its pathogenicity.

Under *in vitro* conditions, the fungicide copper oxychloride at 0.2% concentration completely suppressed the mycelial growth. This was followed by 0.2% Captan and Carbendazim, which were

effective in inhibiting the fungal growth up to 89.13 and 86.96%, respectively. Captafol at 0.2% was also effective as it controlled the fungus up to 78.26%. Among all the fungicides tested, there was no significant difference between 0.1 and 0.2% concentrations, except in the case of copper oxychloride and Captafol, in suppressing growth of the fungus. Table I shows the details of the *in vitro* study.



Fig. 2: Conidia of *Colletotrichum lindemuthianum* ($\times 600$).

Fig. 2 : Conidies de *Colletotrichum lindemuthianum* ($\times 600$).

DISCUSSION

Cocoon production and silk quality are determined mainly by the silkworm race, rearing climate and quality of the leaves fed. Diseases alter the physiological and biochemical processes in mulberry, resulting in great loss of leaf quality and yield. Identification of new diseases and their control, hence, assumes greater significance. *C. lindemuthianum*, a highly potential pathogen for other crops such as cassava, bean, cowpea, French bean, etc. (Nair *et al.*, 1979; Arya *et al.*, 1986; Adebitan *et al.*, 1992; Chhetry *et al.*, 1993), has been reported for the first time on mulberry. Although the incidence of the disease was only 2-3%, it has the potential to become epidemic if suitable control measures are not adopted. The mycelial growth of the pathogen *in vitro* was completely suppressed by 0.2% copper oxychloride. Further studies to find out/recommend suitable control measures against this disease are under progress.

Table 1. *In vitro* effect of fungicides on the growth of *C. lindemuthianum*.

Tableau 1. Effet *in vitro* de certains fongicides sur la croissance de *C. lindemuthianum*.

Fungicides	Concentration	Average radial growth (cm)*	Inhibition %
<i>Fongicides</i>	<i>Concentration</i>	<i>Croissance radiale moyenne (cm)*</i>	<i>Pourcentage d'inhibition</i>
1. Mancozeb 75% WP	0.05	1.06	53.91
	0.1	0.50	78.26
	0.2	0.48	79.13
2. Carbendazim 50% WP	0.05	0.43	81.30
	0.1	0.42	81.74
	0.2	0.30	86.96
3. Chlorothalonil 75% WP	0.05	1.30	43.47
	0.1	0.80	65.21
	0.2	0.70	69.56
4. Copper oxychloride 50% WDP	0.05	0.70	69.57
4. <i>Oxychlorure de cuivre 50% WDP</i>	0.1	0.67	70.87
	0.2	0.00	100.00
5. Captan 50% WP	0.05	0.51	77.83
	0.1	0.28	87.82
	0.2	0.25	89.13
6. Captafol 80% DS	0.05	1.27	44.78
	0.1	0.95	58.70
	0.2	0.50	78.26
Control / <i>Témoin</i>	Nil	2.30	-
CD at 5%		0.3537	
CD at 1%		0.4745	

* Mean of three replications / *Moyenne de trois répétitions.*

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr R. Jeyarajan, Professor and Head, Department of Plant Pathology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu, for confirming the identity of the fungus.

REFERENCES

- ADEBITAN S.A., KOTOU T., DASHIELL K.E., SINGH S.P. (1992) Use of three inoculation methods in screening cowpea genotypes for resistance of two *Colletotrichum* spp. Plant Disease, 76, 1025.
- ARYA C.M., DHINGRA O.D., KUSWALAPPA A.C. (1986) Incidence of anthracnose on bean, *Phaseolus vulgaris*, under different inoculum pressure. Fitopatol. Brasileira, 11, 795.
- CHHETRY G.K.N., MISHRA R.R., SHARMA G.D. (1993) Quantitative analysis of anthracnose disease of French bean. Acta Botanica India, 21, 225.
- DOMOSCH K.H., GAMA W., TRAUTE-HEID-ANDERSON (1980) Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London.
- ELLIS M.B. (1971) *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, UK.
- MORDUE M. (1971) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. CMI.
- NAIR M.C., MENON M.R., SUHARBAN M., VARNA A.S. (1979) Anthracnose of cassava — A new record from India. Curr. Sci., 48, 443.
- PHILIP T., GUPTA V.P., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K., DATTA R.K. (1994) Diseases of mulberry in India — Research priorities and management strategies. Indian J. Trop. Pl. Dis., 12(4).
- SHARVELLE B.C. (1961) The Nature and Use of Modern Fungicides. Burgess Publishing Co., Minnesota, USA, p. 308.
- VINCENT J.M. (1947) Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. Nature, 96, 596.

PREMIERE OBSERVATION DE L'ANTHRACNOSE DU MURIER EN INDE

J. LATHA JANARDHAN, T. PHILIP, GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA

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

*La présence de l'anthracnose a été observée pour la première fois sur des feuilles de mûrier au Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore et sur d'autres sites du sud de l'Inde. Les symptômes de cette maladie se manifestent sous la forme d'ocelles circulaires de couleur marron à marron rougeâtre sur la feuille, se développant de manière irrégulière vers la bordure foliaire. L'organisme responsable est *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) L'isolement et les tests de pathogénicité montrent que ce champignon est pathogène pour le mûrier. La croissance in vitro de l'agent pathogène est complètement inhibée par le fongicide Blitox (0,2 %).*

INTRODUCTION

Le mûrier est cultivé sous forme de cultivars performants et génétiquement divers dans des zones agroclimatiques très variées car c'est la seule plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.). De ce fait, il est sujet à un grand nombre de maladies présentes de manière saisonnière ou tout au long de l'année. L'incidence de l'anthracnose a été relevée au *Central Sericultural Research and Training Institute* (CSRTI) de Mysore et dans d'autres régions du sud de l'Inde au cours d'une étude réalisée en 1992. Cet article porte sur les symptômes de cette maladie ainsi que l'isolement et l'identification du champignon pathogène, sa pathogénicité et une sélection *in vitro* de fongicides contre cet agent pathogène.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'isolement de l'agent pathogène, des échantillons de feuilles malades ont été prélevés sur le campus du CSRTI. Des fragments foliaires mesurant environ 2 à 5 mm ont été découpés dans la partie infestée, stérilisés en surface, lavés dans de l'eau distillée stérile et transférés en conditions aseptiques dans des boîtes contenant un milieu agar de dextrose de pomme de terre (ADP). Les boîtes ont été incubées à 26 ± 2 °C. Le champignon formé progressivement autour des fragments a été examiné à partir du 3e jour et les caractères morphologiques et culturaux ont été étudiés. Le champignon a été identifié d'après des manuels illustrés (Ellis, 1971 ; Domsch et coll., 1980 ; Mordue, 1971) ; l'identification a été confirmée par expertise. La pathogénicité a été testée sur des plantules âgées de trois mois. Les conidies prélevées dans de l'eau distillée stérile sur une culture de 10 jours ont été inoculées par vaporisation sur des feuilles saines. Les plants témoins ont été vaporisés à l'eau distillée. Les plants inoculés ont été recouverts avec des sacs en polyéthylène pendant 48 heures pour maintenir l'humidité et les préserver des infestations naturelles.

Pour la sélection *in vitro* des fongicides, on a testé l'oxychlorure de cuivre à 50 % WDP, le Carabendazim à 50 % WP, le Chlorothalonil à 75 % WP, le Mancozeb à 75 % WP, le Captafol à 80 % DS et le Captan à 50 % WP aux concentrations de 0,05, 0,1 et 0,2 % selon la technique de « l'intoxication alimentaire » (Sharville, 1961). On a mis en place trois répétitions. L'efficacité des fongicides a été déterminée le 7e jour en mesurant la croissance radiale du champignon dans le milieu

ADP en fonction des différentes concentrations par rapport à la croissance des boîtes témoins contenant du milieu ADP sans fongicide. Le pourcentage d'inhibition du mycélium a été calculé d'après la formule de Vincent (1947).

RESULTATS

Les symptômes de la maladie se manifestent initialement sous la forme d'ocelles circulaires ou ovales marron rougeâtre sur la feuille, se propageant de manière irrégulière vers la bordure. A mesure que les taches s'élargissent, leur partie centrale vire au marron et atteint un diamètre de 8 à 15 mm de forme irrégulière (Fig. 1).

Le champignon produit des mycéliums blanc grisâtre avec une masse de conidies de couleur rose ou saumon apparaissant dans la culture après 10 jours. La croissance et la sporulation du champignon sont excellentes sur milieu agar de farine de maïs ou d'avoine. Le champignon développe des conidies sur des conidiophores courts et dressés. Les conidies sont unicellulaires, ovoïdes, transparentes, cylindriques ou en forme d'haltère et mesurent $13 \text{ à } 22 \mu\text{m} \times 4 \text{ à } 5 \mu\text{m}$ (Fig. 2). La croissance du champignon est favorisée par une température et une humidité élevées (28 à 32 °C et 75 à 90 %). Les conidies se détachent et se répandent lorsque les acervules sont humides et se disséminent par les gouttes de pluie. Le champignon a été identifié comme étant *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) et n'avait encore jamais été observé chez le mûrier (Philip et coll., 1994).

Sur les plants infestés artificiellement, les symptômes décrits ci-dessus apparaissent cinq jours après l'inoculation. Le champignon a été à nouveau isolé à partir des feuilles infestées ; ce qui prouve sa pathogénicité.

En conditions *in vitro*, l'oxychlorure de cuivre à 0,2 % inhibe totalement la croissance du mycélium. Le Captan et le Carbendazim à 0,2 % inhibent respectivement jusqu'à 89,13 et 86,96 % de la croissance fongique. Le Captafol à 0,2 % est également efficace et donne une inhibition de 78,26 %. Sur l'ensemble des fongicides testés, il n'y a pas de différence significative d'inhibition entre les concentrations de 0,1 et 0,2 %, sauf pour l'oxychlorure de cuivre et le Captafol. Le tableau I donne le détail de l'étude *in vitro*.

DISCUSSION

La production de cocons et la qualité de la soie sont déterminés principalement par la race de ver à soie, le climat et la qualité de la feuille. Les maladies altèrent les processus physiologiques et biochimiques chez le mûrier, provoquant des pertes importantes en termes de qualité et de rendement en feuilles. L'identification de nouvelles maladies et la mise au point de mesures de lutte sont donc très importantes. *C. lindemuthianum*, agent potentiellement pathogène pour d'autres cultures comme le manioc, le haricot, *Vigna sinensis*, le haricot vert, etc. (Nair et coll., 1979 ; Arya et coll., 1986 ; Adebitan et coll., 1992 ; Chhetry et coll., 1993) est observé pour la première fois chez le mûrier. Bien que l'incidence de cette maladie ne dépasse pas 2 à 3 %, elle peut devenir épidémique si l'on n'adopte pas des mesures de lutte appropriées. La croissance *in vitro* du mycélium de l'agent pathogène est totalement inhibée par l'oxychlorure de cuivre à 0,2 %. Des études complémentaires sont en cours afin de mettre au point et/ou recommander des mesures adaptées contre cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	577
General sericulture	
Mûrier	583
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	587
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	591
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	595
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	597
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	601
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	605
Silkworms: silk glands	
Soie	607
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

Advantage in resource and technique for sericultural by-product comprehensive utilization in Zhejiang Province.

Avantage des techniques d'utilisation complète des sous-produits séricoles dans la province de Zhejiang.

ANONYME

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 11-12. (C)

Evolution and development of fertilization technique for mulberry field in Zhejiang Province.

Evolution et développement des techniques de fertilisation pour les mûraies dans la province de Zhejiang.

CHEN Q.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 4-5. (C)

Theory and practice of the agro-ecosystem of mulberry field and fish pond.

Théorie et pratique de l'agro-écosystème des mûraies et des étangs à poissons.

CHEN Y. *et al.*

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 4-6. (C)

Problem meeting in the present sericultural production and its measures.

Problèmes rencontrés et mesures prises dans la production séricole actuelle.

DONG R.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 9-10. (C)

Investigation on the mulberry germplasm in Liangsan area.

Investigations sur les ressources génétiques du mûrier dans la région de Liangsan.

DU Z.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 23. (C)

Discussion on the three major factors about the development of sericultural production.

Discussion sur les trois facteurs principaux du développement de la production séricole.

GUO W. *et al.*

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 7-8. (C)

Sericulture in the Tropics.

Sériciculture sous les Tropiques.

HAZAMA K.

Association for International Cooperation of Agriculture and Forestry, 19, Ichibancho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.

1995 Association for International Cooperation of Agriculture & Forestry, 98 p. (E)

To revive the sericultural industry depending on the policy and technology.

La reprise de l'industrie séricicole dépend de la politique et de la technologie.

HE B.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 27-28. (C)

Sericulture festival in China.

Festival de sériciculture en Chine.

HIMANTHARAJ M.T., MIAO Y., XU J.

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

1996 Indian Silk, Vol. 35(2-3), 35-36. (E)

To get a good cocoon harvest by strengthening the management of cooperative rearing.

Obtention d'une bonne récolte de cocons par le renforcement de la gestion des élevages coopératifs.

HOU J.Z.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 33-34. (C)

Reasons analysis and measures to solve the problem 'lower cocoon yield' in Nihua County.

Analyse des causes et solutions au problème du "bas rendement en cocon" dans le comté de Nihua.

HUANG X.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 27-29. (C)

To prevent the decline of cocoon production by taking effective steps.

Prévention du déclin de la production de cocons par des mesures efficaces.

Ji X. et al.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 18-20. (C)

History of killing pupa and storing cocoon in ancient time in China.

Histoire de la manière de tuer les chrysalides et du stockage des cocons dans les temps anciens en Chine.

JIN L.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 14-15. (C)

Main silkworm diseases and damage degree in mid-autumn rearing crop in Liju County, Shandong Province.

Principales maladies du ver à soie et mesure des dommages causés dans les élevages de la mi-automne dans le comté de Liju, province de Shandong.

LI Y. et al.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 28-30. (C)

Large-scale extension of a package of new techniques for good-quality and high yield cocoon production in Huzhou area.

Vulgarisation à grande échelle d'un ensemble de nouvelles techniques pour une production de cocons à haut rendement et de bonne qualité dans la région de Huzhou.

MA X.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 7-10. (C)

Developmental orientation of sericultural science facing 21st century and its task.

Orientation et rôle du développement de la science séricicole à l'approche du 21^e siècle et sa tâche.

MENG Z.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 1-2. (C)

Eri silk : product development and marketing.

La soie eri : développement du produit et commercialisation.

RAJKHOWA R.

Assam Textile Institute, Guwahati, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(2-3), 37-38. (E)

Yield gap of cocoon crops in Karnataka.

Ecart de rendement dans les élevages de cocons au Karnataka.

RAMANUJA RAO G., SHIVAKUMAR G.R., ANANTHA RAMAN K.V., MAGADUM S.B., DATTA R.K.*

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

1996 Indian Silk, Vol. 35(2-3), 19-22. (E)

Discussion on the standard management of leaf quality for egg production.

Discussion sur la gestion standard de la qualité des feuilles pour la production des oeufs.

SHENG K.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 32. (C)

Louis Pasteur Award of India again.

Le Prix Louis Pasteur attribué une nouvelle fois à l'Inde.

SINHA R.K.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(2-3), 13-15. (E)

Current situation of sericulture production in Lin An County.

Situation actuelle de la production séricicole dans le comté de Lin An.

SUI Z.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 35-36. (C)

To curb the decline of cocoon quality by learning the experience of the past.

Freiner le déclin de la qualité des cocons en se servant de l'expérience du passé.

WANG Y.F.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 41-42. (C)

Study and extension of the plastic green house for silkworm rearing and vegetable culture in northern area.

Etude et extension des serres en plastique pour l'élevage de vers à soie et la culture des légumes dans la région du nord.

WU S.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 21. (C)

Retrospect and prospect of silkworm egg industry in Zhejiang province in the past and coming decade.

Rétrospective et prospective de l'industrie des oeufs de vers à soie dans la province de Zhejiang au cours des dix ans passés et à venir.

WU Y.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 3-6. (C)

Discussion on the techniques for good-quality, high yield silkworm egg production in Huzhou area.

Discussion sur les techniques de grainage pour une production d'oeufs de vers à soie de bonne qualité et à haut rendement dans la région de Huzhou.

WU Z. et al.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 5-7. (C)

Discussion on the application and extension of the silkworm variety 'Chunlei x Zhenzhu' in our area.

Discussion sur l'application et la vulgarisation de la variété de vers à soie "Chunlei x Zhenzhu" dans notre région.

XU J.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 24-26. (C)

To stabilize the cocoon production in Changshan County by all efforts.

Stabilisation de la production de cocons dans le comté de Changshan.

XU M.L.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 34-35. (C)

To promote the cocoon production by good service.

Promouvoir la production de cocons par la qualité du service.

YANG D.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 26-27. (C)

Opinion on the stabilization and development of cocoon production in Jiande County.

Opinion sur la stabilisation et le développement de la production de cocons dans le comté de Jiande.

YE L.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 32. (C)

Analysis of sericultural and cocoon management.

Analyse de la sériciculture et de la gestion des cocons.

YUAN S.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 40. (C)

Discussion on cold storage of silkworm bluish eggs.

Discussion sur la stokage au froid des oeufs bleuâtres de vers à soie.

YUAN S.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 29-30. (C)

A package of techniques for egg production of summer-autumn variety in spring and application in coming summer.

Un ensemble de techniques pour la production printannière des oeufs d'une variété été-automne et application pour l'été prochain.

ZHEN Y. et al.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 36. (C)

Discussion on the collecting of the unupated cocoons in early autumn crop in parent silkworm rearing area.

Discussion sur la récolte des cocons non nymphosés dans les élevages précoces d'automne dans la région d'élevage des races parentales de vers à soie.

ZHOU C.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 25. (C)

Discussion on the reform of management system of silkworm eggs.

Discussion sur la réforme du système de gestion des oeufs de vers à soie.

ZHOU H.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 1-4. (C)

To master the tactics to develop new sericultural area from the experience of rise and decline of sericultural production in old area.

La maîtrise des tactiques de développement de nouvelles régions séricicoles grâce à l'expérience de la croissance et du déclin de la production séricicole dans les zones anciennes.

ZHOU L.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 24-26. (C)

Current situation and prospects of sericultural by-product comprehensive utilization.

Situation actuelle et perspective de l'utilisation complète des produits dérivés de la sériciculture.

ZHU X.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 13-15. (C)

Mûrier

Mulberry

pH changes induced by root system of micropropagated *Prunus* sp. and *Morus alba* in relation to aluminium.

Variations du pH induites par le système racinaire de *Prunus* et de *Morus alba* microbouturés en relation avec l'aluminium.

BORKOWSKA B., LITWINCZUK W.

1995 *J. Fruit Ornamental Plant Res.*, Vol. 3(1), 1-12. (E)

Investigation on the voltinism of mulberry white caterpillar in Jiangxi Province.

Investigation sur le voltinisme de la chenille blanche du mûrier dans la province de Jiangxi.

CAN G. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 17. (C)

Damage of the branch-breaking disease in mulberry and its control.

Dégâts causés par la maladie des branches cassantes chez le mûrier et son contrôle.

CHAI X.L.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 9. (C)

The result of the pesticide 'Miduwei' in controlling the mulberry gall-midge.

Le résultat du pesticide "Miduwei" dans la lutte contre le puceron de la galle du mûrier.

CHENG A.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 40. (C)

Studies on the genetic identities and relationships of mulberry cultivated species (*Morus* L.) via a Random Amplified Polymorphic DNA assay.

Etudes sur les identités génétiques et les relations entre les espèces de mûriers cultivés (*Morus* L.) par dosage RAPD.

FENG L., YANG G., YU M., KE Y., JING C., XINAG Z.

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 135-140. (C,e)

Optimum ratio of N.P.K. in mulberry field for egg production.

Taux optimum de N.P.K. dans les mûraies pour la production des oeufs.

GOU W.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(4), 21-23. (C)

Discussion on the utilization of mulberry sapling leaf.

Discussion sur l'utilisation des feuilles de jeunes mûriers.

JIN Y.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 37. (C)

Red hairy caterpillar - a new pest of mulberry.

La chenille velue rouge : un nouveau parasite du mûrier.

KATIYAR R.L., MANJUNATH D., DATTA R.K.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3), 17-18. (E)

Studies on resistant varieties excavated from germplasm resources of Shandong Lu mulberry (*Morus multicaulis* Perr.).

Etudes sur les variétés résistantes de mûrier (*Morus multicaulis* Perr.) provenant de la banque génétique de Shandong Lu.

KUAI Y.*, LIU W., CUI Y.

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

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 141-144. (C,e)

Studies on the identification technique of mulberry varieties resistance to yellow dwarf disease.

Etude sur la technique d'identification de la résistance des variétés de mûriers à la maladie du nanisme jaune.

LI S. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 25-27. (C)

Techniques of RAPD and its application in mulberry.

Technique RAPD et son application chez le mûrier.

LOU C.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 9-10. (C)

Effect of combinational fertilization of K, B and Mg fertilizer on the leaf yield and quality.

Effet de la fertilisation combinée au K, B et Mg sur le rendement en feuilles et la qualité.

LU J.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(1), 13-15. (C)

To kill the mulberry snail with agent 'wu ke lin'.

L'agent "wu ke lin" tue l'escargot du mûrier.

LU Z.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 22-23. (C)

Research advancement and application of mulberry isoenzyme.

Progrès dans la recherche et utilisation d'isozymes du mûrier.

QI Y.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 5-8. (C)

Techniques for good quality and high-yield production in specific mulberry field for parents silkworm rearing.

Techniques de production à haut rendement et de bonne qualité dans des mûraies spécifiques pour l'élevage des races parentales de vers à soie.

SHEN G. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 11-13. (C)

Techniques for good-quality and high yield production in specific mulberry field for parents silkworm rearing.

Techniques de production à haut rendement et de bonne qualité dans des mûraies spécifiques pour l'élevage des souches parentales de vers à soie.

SHEN G.X.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 16-17. (E)

To propagate mulberry sapling by grafting with stock from cutting mulberry.

Propagation des pousses de mûriers par greffage avec des mûriers issus de bouturage.

TENG S. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 22. (C)

Optimum period to renovate the mulberry field.

Période optimum pour la remise en état des mûraies.

WANG H.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 43-44. (C)

Primary report on the mulberry blight disease in Quzhou area.

Rapport préliminaire sur la maladie de la flétrissure du mûrier dans la région de Quzhou.

WU J. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 21. (C)

Effect of 'photosynthesis micro-manure' applied in mulberry.

Effet du micro engrais à photosynthèse chez le mûrier.

WU K. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 24. (C)

Effect of pH on the chemical forms of heavy metals in polluted mulberry field soils.

Effet du pH sur les formes chimiques des métaux lourds dans les sols pollués des mûraies.

XIAN X.

International Foundation of Technology, Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 241-247. (J,e)

Separation of soluble heavy metals in the roots of mulberry by Sephadex G-75 gel filtration.

Séparation des métaux lourds solubles des racines du mûrier par filtration sur gel Sephadex G-75.

XIAN X.

Cats Environmental Science Laboratories, Ibaraki 302-01, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 292-297. (J,e)

Relationship between the distribution of Cd and Zn in root tissue and the heavy metal tolerance of mulberry and *Athyrium yokoscence*.

Relation entre la distribution de Cd et de Zn dans les tissus des racines et tolérance du mûrier et d'*Athyrium yokoscence* aux métaux lourds.

XIAN X.

Cats Environmental Science Laboratories, Ibaraki 302-01, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 286-291. (J,e)

Effects of pH in polluted soils on the amount of heavy metals uptake by mulberry plant.

Effets du pH dans les sols pollués sur l'absorption de métaux lourds par les mûriers.

XIAN X.

International Foundation of Technology, Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 255-261. (J,e)

Preliminary report on the selection of fruit mulberry.

Rapport préliminaire sur la sélection des mûriers à fruits.

YANG Y.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(1), 19-20. (C)

The fertilization result of paddy straw in mulberry field.

Le résultat de la fertilisation à la paille de riz dans les mûraies.

YI D.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 20-21. (C)

Test of fertilizer efficiency of high concentration compound manure with different ratio.

Test d'efficacité des engrais à teneur élevée et variable de fumier composé.

ZAO W. *et al.*

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 23-24. (C)

Effect of potassium nutrients on leaf yield and quality.

Effet du potassium sur le rendement et la qualité des feuilles.

ZHANG Y.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 18-20. (C)

Comparative studies on soil in different-yield mulberry field in Jinaxin plain.

Etudes comparatives du sol dans des mûraies à rendement différent dans la plaine de Jiaxin.

ZHANG Y.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 32-34. (C)

Advancement on the control of mulberry disease and pest in Zhejiang province in the past 15 years.

Progrès dans la lutte contre les maladies et les parasites du mûrier dans la province du Zhejiang au cours des 15 dernières années.

ZHOU J.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 1-3. (C)

To forecast the optimum period to control the first generation of mulberry gall-midge by applying the line regression equation.

Prévision de la période optimum de contrôle de la première génération de moucheron de la galle du mûrier par application d'une équation de régression linéaire.

ZHOU W.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 10-11. (C)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Low cost earthen pot incubator.

Un incubateur à bas prix.

ASTAGI S.G., SRINIVASABABU G.K., THANGAVELU K.

SSPC, National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Gadhinglaj, Maharashtra, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3), 29-31. (E)

Studies on the effect of hexachlorocyclohexane on the growth and silk quantities of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes sur l'effet de l'hexachlorocyclohexane sur la croissance et les quantités de soie du ver à soie *Bombyx mori* L.

BHAGYALAKSHMI A., REDDY S.V., RAMAMURTHI R., REDDY P.S.

1995 *Chem. Ecol.*, Vol. 11(2), 97-104. (E)

Change of pH value and calcium ion concentration in haemolymph of the toxicated silkworm larvae by fluoride.

Variation du pH et de la concentration des ions calcium dans l'hémolymph des vers à soie intoxiqués par le fluorure.

CANG R. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 14. (C)

Superiority of the sampling method for female moth group-inspection by sampling moths at different stage.

Supériorité de la méthode d'échantillonnage pour l'inspection du groupe de papillons femelles par échantillonnage de papillons à différents stades.

CHEN A.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 32-33. (C)

Quality management of the good silkworm egg reproduction.

Gestion de la reproduction des bons oeufs de ver à soie.

CHEN Z.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 23-24. (C)

Enfermedades en gusanos de seda. / Silkworm diseases.

Les maladies du ver à soie.

CIFUENTES C.A.

C.D.T.S., San José Km 5, Via La Florida, Apartado Aéreo 1757, Pereira, Risaralda, Colombia.

1996 *Sericultura Colombiana*, Vol. 15, 14-18. (S)

Studies on the techniques for good cocoon production in autumn erop.

Etudes sur les techniques de production de cocons de bonne qualité dans les élevages d'automne.

DAI J.

*1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 7-8. (C)***Test of Ti-coumpound application in sericulture to increase cocoon production.**

Test de l'application des composés Ti dans la sériciculture pour l'amélioration de la production de cocons.

DIN X. *et al.**1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 36. (C)***Application of the artificial diet during the young stage of the silkworm.**

Nourrissage à l'aliment artificiel des jeunes vers à soie.

FAN J.

*1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 18-19. (C)***Relationship between the peak period of leaf consumption in 5th instar and cocoon yield.**

Relation entre la période de pointe de la consommation de feuilles au 5e âge et le rendement des cocons.

GOU W.

*1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(1), 35-36. (C)***Test of production of multi-purpose administering agent for silkworm.**

Test de production d'un agent de traitement à plusieurs usages pour le ver à soie.

GUO C.

*1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 20-21. (C)***Study on shaping agent in artificial diet.**

Etude sur un agent structurant dans l'aliment artificiel.

HUANG J.

*1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 38-40. (C)***Accelerative effects of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) sawdust on the efficiency of natural moutning in *Bombyx mori*.**Effets d'accélération de la sciure d'hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) sur l'efficacité de la montée naturelle chez *Bombyx mori*.

KAMIMURA M., KIUCHI M., FURUTA Y., KURIBAYASHI S.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

*1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(4), 298-302. (E,j)***Effect of photoperiod on young silkworm larvae rearing with artificial diet.**

Effet de la photopériode sur les jeunes larves de ver à soie nourris avec de l'aliment artificiel.

LI X. *et al.**1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(2), 32-33. (C)***Reproduction and technique reform of parents and grandparents silkworm eggs.**

Reproduction et réforme des techniques de production des œufs de ver à soie parents et grand-parents.

LI Y. *et al.**1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 6-13. (C)***Techniques for preventing the occurrence of penta-molter silkworm larva.**

Techniques de prévention de la présence de larves de ver à soie à cinq mues.

LIU W. *et al.**1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 25-26. (C)*

To measure the result of detoxication of 'silkworm detoxication agent' by 'fluoride susceptibility index'.

Mesurer le résultat de la désintoxication de "l'agent de désintoxication du ver à soie" par "l'index de sensibilité au fluorure".

LU S.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 18-20. (C)

Review on the studies of bacterial gastroenteric disease in silkworm.

Revue sur les études de la maladie gastro-entérique bactérienne chez le ver à soie.

LU X.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 1-3. (C)

Report on the countryside mid-scale rearing of silkworm treated by AJH.

Rapport sur l'élevage à échelle moyenne de vers à soie traités à l'AJH.

LU X. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 34-35. (C)

Techniques for once daily feeding with slant shoot in 5th instar.

Techniques de nourrissage une fois par jour avec des rameaux au cinquième âge larvaire.

MA Y.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 38. (C)

Relationship of pupal weight with some larval and grainage parameters in pure Mysore race of *Bombyx mori* L.

Relation entre le poids de la chrysalide et quelques paramètres des larves et du grainage chez la race pure de Mysore de *Bombyx mori* L.

NARAYANASWAMY T.K., VISWESWARA GOWDA, GOVINDAN R.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K., Bangalore 560 065, India.

1996 *Mysore J. agric. Sci.*, Vol. 30(3), 259-262. (E)

Testing of the feeding times of rearing on artificial diet.

Test des temps de nourrissage dans les élevages sur aliment artificiel.

RUI M.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 26. (C)

Seasonal influence on cytoplasmic polyhedrosis of silkworm, *Bombyx mori*.

Influence des saisons sur la polyédrose cytoplasmique du ver à soie *Bombyx mori*.

SUDHEER V., GOVINDAN R., DEVAIAH M.C., NARAYANASWAMY T.K.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K., Bangalore 560 065, India.

1996 *Mysore J. agric. Sci.*, Vol. 30(3), 252-258. (E)

High temperature-induced sterility in silkworms.

La stérilité induite par une haute température chez les vers à soie.

SUDIPTA DAS, SAHA A.K., SHAMSUDDIN M.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3), 26,28. (E)

Effect of rearing density of grown larvae on rearing results.

Effet de la densité de l'élevage des larves sur les résultats de l'élevage.

WANG B. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 31. (C)

Primary report on the test of administering silkworm with animal protein nutritive solution.
Rapport préliminaire sur le test de distribution aux vers à soie d'une solution nutritive contenant des protéines animales.

WANG Y.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 34. (C)

Opinion on the concept of 'newly-hatched larvae weight'.
Opinion sur le concept du "poids des larves nouvellement écloses".

WU Y.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(2), 31. (C)

Discussion on the grading method of parents silkworm cocoon.
Discussion sur la méthode de classification des cocons des races parentales de vers à soie.

WU Y.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 3-4. (C)

Test of rearing 5th instar silkworm larva with osage orange leaves.
Test d'élevage de larves de ver à soie au cinquième âge avec des feuilles d'osage orange.

XIA K.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(1), 32-33. (C)

Mulberry leaf powder made by sunshine and feeding behaviour of silkworm.
Poudre de feuilles de mûriers obtenue par séchage au soleil et comportement de nourrissage des vers à soie.

XU J.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 44. (C)

Studies on the mulberry leaf powder content and pH value in diet.
Etudes sur la teneur en poudre de feuilles de mûriers et la valeur du pH dans l'aliment.

XU J. *et al.*

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 28. (C)

Breeding of silkworm varieties, GSC5 and GSJ1, with good ingestion to artificial diet.
Lignage de variétés de vers à soie GSC5 et GSJ1 ingérant bien l'aliment artificiel.

XU M. *et al.*

1996 Canye Kexue, Vol. 22(3), 194-196. (C)

Report on the rearing of the introduced spring variety 'Chunmei x Wanhua'.
Rapport sur l'élevage de la variété introduite au printemps "Chunmei x Wanhua".

YE J.

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(4), 27-29. (C)

Pollution law of fluoride in silkworm and its control measures.
Pollution au fluorure chez le ver à soie et mesures de contrôle.

ZHANG X. *et al.*

1995 Bulletin of Sericulture, Vol. 26(3), 24-25. (C)

The effect of several trace elements in the artificial diet for young larvae of silkworm, *Bombyx mori*.

L'effet de plusieurs éléments trace dans l'aliment artificiel pour jeunes larves de vers à soie, *Bombyx mori*.

ZHANG G., WEI Y., YANG R., WU Z.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1996 Canye Kexue, Vol. 22(3), 145-149. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

New trend in bivoltine tasar silkworm rearing.

Nouvelle tendance dans l'élevage du ver à soie bivoltin tasar.

ALAM M.O., THANGAVELU K.

REC, Central Tasar Research and Training Institute, Bangripasi, Orissa, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3), 23-25. (E)

Ultrastructure and silk secretion of the Malpighian tubules in the Ant-lion.

Ultrastructure et sécrétion de la soie des tubes de Malpighi chez Ant-lion.

AOYAGI S.

Laboratory of Entomology, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 183-185. (E)

Cocoon filament properties of the interspecific F1 hybrids between *Antheraea yamamai* and *A. pernyi*.

Propriétés du filament du cocon des hybrides F1 interspécifiques entre *Antheraea yamamai* et *A. pernyi*.

KOBAYASHI M., HARA H., TANAKA K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda, Nagano 386, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 163-166. (E)

Improvement of artificial diet for *Antheraea yamamai*: hot water pre-treatment of oak leaves.

Amélioration de l'aliment artificiel pour *Antheraea yamamai* : pré-traitement à l'eau chaude des feuilles de chêne.

MIYATA Y., KANEKATSU R., KOBAYASHI M.

Kyodo Shiryō Co., Yokohama-shi, Kanagawa 240, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 245-249. (E)

Improvement of cooking method of tasar cocoons and assessment of their reeling efficiency.

Amélioration de la méthode d'étouffage des cocons tasar et évaluation de leur efficacité de dévidage.

MOON M.A., SENGUPTA D., SINHA S.S.

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

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 251-255. (E)

A new cocoon color strain, emerald green (EG), in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Une souche avec une nouvelle couleur de cocons, vert émeraude (EG), chez le ver à soie du chêne japonais, *Antheraea yamamai*.

NAKADA T., SAHARA K., KIKUCHI K., SAITOH H.

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 167-169. (E)

Tropical tasar egg transportation basket.

Panier de transport pour les oeufs du tasar tropical.

OJHA N.G., SINGH M.K., SHARAN S.K., SINHA B.R.R.Pd., SINHA S.S.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3), 27-28. -E)

Rearing and cocooning of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* in indoor condition.

Elevage et filage du cocon du ver à soie tropical tasar *Antheraea mylitta* en magnanerie.

OJHA N.G., SINHA S.S. *, SINGH M.K., SHARAN S.K.

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

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 257-260. (E)

A study on the reeling technology for cocoons of *Antheraea yamamai*.

Une étude sur la technologie de dévidage des cocons d'*Antheraea yamamai*.

REN C. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 202-203. (C)

Regulation of voltinism in *Antheraea mylitta* by manipulation of rearing period of larval stages.

Régulation du voltinisme chez *Antheraea mylitta* par manipulation de la période d'élevage des stades larvaires.

SHARAN S.K., SINGH M.K., OJHA N.G., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, Government of India, Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 191-194. (E)

Genetic analysis of quantitative traits in *Antheraea mylitta*.

Analyse génétique des caractères quantitatifs chez *Antheraea mylitta*.

SINHA S.S., SINHA A.K.

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

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 177-181. (E)

Conservation strategies of important wild silkworm populations of *Antheraea mylitta*.

Stratégies de conservation pour les importantes populations de papillons à soie sauvages d'*Antheraea mylitta*.

SINHA S.S., SINHA A.K.

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

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 159-162. (E)

Efficiency of rearing on different host plants in three non mulberry silkworms.

Efficacité de l'élevage sur différentes plantes hôtes chez trois vers à soie non-mûriers.

SRIVASTAVA A.K., SINHA A.K., SINGH B.M.K., SINHA B.R.R.P., SINHA S.S.

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

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 241-244. (E)

Advancement on the rearing technique of Japanese tussah *Antheraea yamamai* Guenel.

Progrès dans la technique d'élevage du tussah japonais *Antheraea yamamai* Guenel.

WANG Y.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(1), 22-23. (C)

Studies on blue bilin from the cocoon of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Etudes sur la biline bleue provenant du cocon du ver à soie du chêne japonais *Antheraea yamamai*.

YAMADA H., KATO Y.

Department of Biology, International Christian University, Osawa 3-10-2, Mitaka, Tokyo 181, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 211-212. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Isolation and characterization of Urbain, a 20-hydroxyecdysone-inducible gene expressed during morphogenesis of *Bombyx mori* wing imaginal discs.

Isolement et caractérisation d'Urbain, un gène inductible par la 20-hydroxyecdysone exprimé au cours de la morphogenèse des disques imaginaires alaires de *Bombyx mori*.

BESSON M.T. *et al.*

C'GMC UMR 106, Université Lyon I, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1996 *Roux's Arch. Dev. Biol.*, Vol. 205, 333-345. (E)

Expression of viral DNA polymerase gene in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) during infection with nuclear polyhedrosis virus.

Expression du gène de l'ADN polymérase virale chez les larves du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) au cours de l'infection par le virus de la polyédrose nucléaire.

CHAECHOMSRI S., IKEDA M., KOBAYASHI M.

1995 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 30(3), 451-465. (E)

Studies on the resistance to NPV and its hereditary regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L.).

Etudes sur la résistance au virus de la polyédrose nucléaire et la régularité héréditaire chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.)

CHEN K., LIN C., YAO Q.

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

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 160-164. (C,e)

Green fluorescent protein as a tool for screening recombinant baculoviruses.

La protéine fluorescente verte utilisé pour dépister les baculovirus recombinant.

ERIKSSON S., RAIVIO E., KUKKONEN J.P., ERIKSSON K., LINDQVIST C.*

Abo Academy University, Department of Biology, FIN-20520, Abo, Finland.

1996 *Journal of Virology Methods*, Vol. 59, 127-133. (E)

Chromatin-mediated fibroin gene transfer from *Antheraea yamamai* to *Bombyx mori*.

Transfert du gène de la fibroïne d'*Antheraea yamamai* à *Bombyx mori*.

LI Z., HOSICK H.L., FAN J., TANG H.

Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 233-236. (E)

Breeding of fluorescence cocoon color sex-limited varieties Yingguang and Chunyu and the preparation of their F1 hybrid.

Lignage des variétés Yingguang et Chunyu limités au sexe pour la fluorescence du cocon et préparation de leur hybride F1.

LIU J., YU Z., CUI Y., DUAN Z.

Shandong Sericultural Research Institute, Yantai 264002, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 155-159. (C,e)

The progress on the transgenic research of the silkworm.

Progrès dans la recherche sur la transgénèse chez le ver à soie.

MENG Z.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 4-6. (C)

Structure of the *Bombyx* sorbitol dehydrogenase gene: a possible alternative use of the promoter.

Structure du gène de la sorbitol-déshydrogénase de *Bombyx* : un usage alternatif possible du promoteur.

NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan.

1996 *Insect Molecular Biology*, Vol. 5(4), 269-280. (E)

Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) in silkmoths.

RAPDs chez les papillons à soie.

PROMBOON A., SHIMADA T., KOBAYASHI M.

Department of Agrobiolgy, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 171-176. (E)

Studies on sex chromosomes of the silkworms, *Philosamia cynthia ricini* and *Dictyoploca japonica*.

Etudes sur les chromosomes sexuels chez les vers à soie *Philosamia cynthia ricini* et *Dictyoploca japonica*.

SONG F., XIANG Z., LIU S., YUTAKA B., YUTAKA K., KATSUMI K.

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 170-174. (C,e)

The comprehension index for individual selection in the reproduction of silkworm, *Bombyx mori* L.

Un index pour la sélection individuelle dans la reproduction chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

TAO M., PAN S., HE S.

Zhenjiang Silkworm Seed Production Station, Zhenjiang 212018, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 165-169. (C,e)

Breeding of spring use silkworm varieties, Lian x Hua and Tian x Dou and the preparation of their F1 hybrid.

Sélection de variétés de vers à soie pour le printemps, Lian x Hua et Tian x Dou et la préparation de leurs hybrides F1.

XU H., CHEN H., LU Z., ZHAO Z., LI S.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 150-154. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Developmental ultrastructure of brain in early larval stages of *Bombyx mori*.

Ultrastructure du cerveau au cours du développement dans les premiers âges larvaires chez *Bombyx mori*.

AKAI H., NAGASHIMA T., AOYAGI S., ASAOKA K.

Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 187-190. (E)

The study on changes of 20-hydroxyecdysone content during temperature-sensing period of the pupae of oak silkworm (*Antheraea pernyi*).

L'étude des variations du titre en 20-hydroxyecdysone au cours de la période thermo-sensible de la chrysalide du ver à soie du chêne (*Antheraea pernyi*).

CAI X., LI D., FAN Y.

Department of Animal Science, Jilin Agricultural University, Chuangchun 130000, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 179-182. (C,e)

Lipopolysaccharide-induced phosphorylation and partial amino acid sequence of a hemocyte protein in the silkworm, *Bombyx mori*.

Phosphorylation induite par les lipopolysaccharides et séquence partielle d'acides aminés d'une protéine d'hémocyte chez le ver à soie *Bombyx mori*.

CHOI H.K. *et al.*

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 262-269. (E,j)

Effects of fenoxycarb on the secretory activity on the prothoracic glands in the fifth instar on the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets du fénoxycarbe sur l'activité sécrétoire des glandes prothoraciques au cinquième âge chez le ver à soie *Bombyx mori*.

DEDOS S.G., FUGO H.

Department of Environmental Science and Resources, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

1996 *General and comparative Endocrinology*, Vol. 104, 213-224. (E)

A deficiency in prothoracicotropic hormone transduction pathway during the early larval instar of *Bombyx mori*.

Une déficience dans la voie de transduction de l'hormone prothoracicotrope au cours de la phase précoce du stade larvaire de *Bombyx mori*.

GU S.H., CHOW Y.S., LIN F.J., WU J.L., HO R.J.

Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan, ROC.

1996 *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 120, 99-105. (E)

Detection of female sex pheromone of giant silkworm, *Dictyoploca japonica*, by electroantennography-gas chromatography technique.

Détection de la phéromone sexuelle femelle du papillon à soie géant *Dictyoploca japonica* par une technique d'électroantennographie et de chromatographie en phase gazeuse.

HATANAKA A., TOMIDA I.

Laboratory of Biochemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University, Minamiminowa, Kamiina, Nagano 386, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 229-232. (E)

Specific protein in haemolymph of wild silkworm and its genetic mode.

Protéine spécifique dans l'hémolymph du ver à soie sauvage et son mode génétique.

HE K. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 8-10. (C)

Geographical variation in thermal requirements for insect development.

Variation géographique des exigences thermiques pour le développement des insectes.

HONEK A.

Research Institute of Plant Production, 161 06 Praha 6 - Ruzyně 507, Czech Republic.

1996 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 93(3), 303-312. (E)

Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization.

Expression du gène de la bombyxine dans des tissus autres que ceux du cerveau détectée par PCR en transcription inverse et hybridation *in situ*.

IWAMI M.*, TANAKA A., HANO N., SAKURAI S.

* Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-11, Japan.

1996 *Experientia*, Vol. 52, 882-887. (E)

Properties of midgut sucrases in some wild silkworms.

Propriétés des sucreses de l'intestin moyen chez quelques vers à soie sauvages.

KANEKATSU R., KOBAYASHI M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda-shi, Nagano 386, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 223-228. (E)

Unusually high concentration of free glycine in the midgut content of the silkworm, *Bombyx mori*, and other lepidopteran larvae.

Concentration élevée inhabituelle de glycine libre dans le contenu de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori* et d'autres larves de lépidoptères.

KONNO K., HIRAYAMA C., SHINBO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1996 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 115A(3), 229-235. (E)

Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et clonage moléculaire d'une protéine inductible liante à une bactérie Gram-négative à partir du ver à soie *Bombyx mori*.

LEE W.J., LEE J.D., KRAVCHENKO V.V., ULEVITCH R.J., BREY P.T.*

* Lab. de Biochimie et Biologie Moléculaire des Insectes, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France.

1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Immunology*, Vol. 93, 7888-7893. (E)

Dynamic changes in ATP levels in the brain of *Antheraea pernyi*.

Changements dynamiques des niveaux d'ATP dans le cerveau d'*Antheraea pernyi*.

LU M.X., ZHANG Y.C., WAN Y.W., XU Q.M., YANG C.S.

Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 219-220. (E)

To measure the activity of glycogen phosphorylase in different tissues of silkworm with enzyme coincidence system.

Mesure de l'activité de la glycogène-phosphorylase dans différents tissus du ver à soie par système de coïncidence d'enzymes.

LU S.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(1), 11-12. (C)

Estimation of the adenosine triphosphatase activity in larval digestive gut of the silkworm.

Estimation de l'activité de l'adénosine triphosphatase dans l'intestin du ver à soie.

LU S.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 22. (C)

Identification of a maturation factor inducing post-diapause development in pharate first-instar larvae of the wild silkmoth, *Antheraea yamamai*.

Identification d'un facteur de maturation induisant le développement post-diapause des larves avant le premier âge chez le papillon à soie sauvage *Antheraea yamamai*.

NAYA S., SAGISAKA A., SUZUKI K.*

* Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8, Morioka 020, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 195-200. (E)

Evidences for a stage-specific juvenile hormone binding protein in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L.: identification and characterization by photoaffinity labeling and immunological analysis.

Preuve d'une protéine liante à l'hormone juvénile spécifique d'un stade dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori* L. : identification et caractérisation par marquage par photaffinité et analyse immunologique.

PARK C.H., KIM H.R.*

* Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

1996 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 32, 83-98. (E)

Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph.

Les inhibiteurs de protéinases à sérine d'hémolymphe d'insectes.

POLANOWSKI A., WILUSZ T.

Institute of Biochemistry, University of Wrocław, Tamka 2, 50-137 Wrocław, Poland.

1996 *Acta Biochemica Polonica*, Vol. 43(3), 445-454. (E)

N-terminal amino acid sequence of the biliverdin-binding protein (BBP) from the molting fluid of the eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.

Séquence N-terminale d'acides aminés de la protéine liante à la biliverdine (BBP) provenant du fluide de mue du ver à soie eri *Samia cynthia ricini*.

SAITO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 213-217. (E)

The change of enzyme activity and haemolymph protein in the silkworms infected by *Nosema bombycis*.

Les changements de l'activité des enzymes et des protéines de l'hémolymphe chez les vers à soie infectés par *Nosema bombycis*.

SHEN Z. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 197-198. (C)

Detection of peptidoglycan and beta-glucan with silkworm larvae plasma test.

Détection de peptidoglycane et de beta-glucane par le plasma des larves de vers à soie.

TSUCHIYA M.*, ASAHU N., SUZUOKI F., ASHIDA M., MATSUURA S.

* Osaka Research Laboratories, Wako Pura Chemical Industries Ltd., 6-1 Takada-cho, Amagasaki, Hyogo 661, Japan.

1996 *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 15, 129-134. (E)

Ecdysteroid inactivation in response to elevated levels of 20-hydroxyecdysone or an agonist, RH 5849 in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Inactivation d'ecdystéroïdes en réponse aux taux élevés de 20-hydroxyecdysone ou d'un agoniste RH 5849 chez le sphinx du tabac *Manduca sexta*.

WILLIAMS D.R., CHEN J.H., FISHER M.J., REES H.H.

Department of Biochemistry, University of Liverpool, PO Box 147, Liverpool, L69 3BX, United Kingdom.

1996 *Biochemical Society Transactions*, Vol. 24, 438S. (E)

Enzymic activities involved in the silk- and cuticle-tanning of the Japanese giant silkmoth, *Dictyoploca japonica* Butler.

Activités enzymatiques impliquées dans la pigmentation de la soie et de l'épiderme du papillon à soie géant japonais *Dictyoploca japonica* Butler.

YAGO M., SATO H., HAYASHI S., OTSUBO A.

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Iwate Medical University, Uchimarui 19-1, Morioka, Iwate 020, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 203-209. (E)

Dynamic changes in respiration rates of the brain of *Antheraea pernyi*.

Changements dynamiques des taux respiratoires du cerveau d'*Antheraea pernyi*.

ZHANG Y.C., LU M.X., WAN Y.W., XU Q.M., YANG C.S.

Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 221-222. (E)

Influence of fluoride and VD3 on the transportation of PO3-4 in larval midgut of *Bombyx mori*.

Influence du fluorure et de VD3 sur le transport de PO3-4 dans l'intestin moyen des larves de *Bombyx mori*.

ZANG R. et al.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 199-201. (C)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Studies on the technique of artificial hatching of silkworm eggs by corona discharge.

Etudes sur les techniques d'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie par décharge électrique.

CHENG J. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 16-17. (C)

Studies on the techniques of protection and cold storage of current summer-autumn silkworm eggs produced in last spring.

Etudes sur les techniques de protection et de stockage au froid des oeufs de vers à soie produits au printemps au cours de l'été et de l'automne.

CHENG Q.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(4), 32-35. (C)

Standard for artificial hatching with acid treatment and cold storage before and after acid treatment.

Standard pour l'éclosion artificielle par traitement acide et stockage au froid avant et après traitement à l'acide.

FENG J.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(4), 30-31. (C)

Effect of temperature and light in oviposition room on the number of remained eggs in body.

Effet de la température et de la lumière dans la pièce des pontes sur le nombre d'oeufs restant dans le corps.

HE Y.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 36-37. (C)

The reason for the occurrence of tail-shrunk pupae and hunchbacked pupae and its effect on egg production.

La raison de la présence de chrysalides à l'abdomen peu développé et de chrysalides bossues et son effet sur la production des oeufs.

HE Y.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 38-39. (C)

Egg color mutation detected by meiotic parthenogenesis in the parthnotes induced by hot-water treatment in the silkworm, *Bombyx mori*.

Mutation de la couleur des oeufs détectée par parthénogénèse méiotique chez les parthénotes induits par traitement à l'eau chaude chez le ver à soie *Bombyx mori*.

HIROKAWA M.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 315-317. (J)

Diapause development, diapause termination and the end of diapause.

Développement de la diapause, interruption de la diapause et fin de la diapause.

HODEK I.

Institute of Entomology, Academy of Sciences, Braniskova 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic.

1996 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 93(3), 475-487. (E)

Cryopreservation of silkworm eggs.

Conservation par congélation des oeufs de vers à soie.

IMANISHI S., SINBO H., KIGUCHI K.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(4), 235-240. (J,e)

Spatial and temporal expression pattern of *Bombyx* fork head/SGF-1 gene in embryogenesis.

Expression temporelle et spatiale du gène "fork head/SGF-1" de *Bombyx* pendant l'embryogenèse.

KOKUBO H., TAKIYA S., MACH V., SUZUKI Y.*

* National Institute for Basic Biology, Myodaiji-cho, Okazaki 444, Japan.

1996 *Dev. Genes Evol.*, Vol. 206, 80-85. (E)

The breeding of silkworm variety which only the male can hatch by the control of incubation condition.

Sélection d'une variété de vers à soie dont seuls les mâles peuvent éclore par contrôle des conditions d'incubation.

LIN J.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 15. (C)

Change of the free amino acid concentration in larval haemolymph of silkworm toxicated by fluoride.

Variation de la concentration d'acides aminés libres dans l'hémolymph des vers à soie intoxiqués par du fluorure.

LU S.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(4), 37. (C)

The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*.

Le noyau et la séquence complémentaire responsable de l'activité biologique de l'hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori*.

SAITO H. *et al.*

Aburahi Laboratories, Shionogi and Co., Ltd, Koka, Shiga 520-34, Japan.

1994 *Peptides*, Vol. 15(7), 1173-1178. (E)

Test of hatching in the eggs treated by acid after chilling.

Test d'éclosion chez des oeufs traités à l'acide après réfrigération.

SHEN K.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 16-17. (C)

Dynamic observation of embryo cleavage nuclei of silkworm.

Observation dynamique de la division des noyaux embryonnaires chez le ver à soie.

SUN C.

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 21-22. (C)

Embryo development of diapause eggs after washing.

Développement embryonnaire des oeufs diapausants après lavage.

TANG Y. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 31. (C)

Techniques for reproduction of good-quality silkworm eggs.

Techniques pour une reproduction des oeufs de vers à soie de bonne qualité.

TAO T. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 1-2. (C)

Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function.

L'hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori* : structure, expression du gène et fonction.

YAMASHITA O.

Laboratory of Sericultural Sciences & Entomoresources, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42(7), 669-679. (E)

Structure and function of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure et fonction de l'hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori*.

YAMASHITA O.

School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1995 in 'Molecular Mechanisms of Insect Metamorphosis and Diapause', Industrial Publishing & Consulting, Inc., 25-34. (E)

Studies on the technique of artificial hatching of silkworm eggs by corona discharge. IV. The result of artificial hatching by corona discharge in the short-period chilling eggs.

Etudes sur la technique d'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie par décharge électrique en couronne. IV. Le résultat de l'éclosion artificielle par décharge électrique en couronne sur des oeufs conservés au froid pendant une période courte.

YANG M.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 12-14. (C)

Studies on the technique of artificial hatching of silkworm eggs by corona discharge.

Etudes sur la technique d'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie par décharge électrique.

YANG M. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(3), 14-16. (C)

The size and number of eggs produced by the triploid females of *Bombyx mori*, homozygous for the giant egg (Ge) gene.

La taille et le nombre des oeufs produits par les femelles triploïdes de *Bombyx mori*, homozygotes pour le gène de l'oeuf géant (Ge).

YOKOYAMA T., SUZUKI M., QU D.C., ABE H., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(4), 248-254. (J,e)

Testing to induce silkworm 'Zhelei Xchunxiao' into trimolters to produce hybrid eggs.

Induction du ver à soie "Zhelei Xchunxiao" en trimuant pour produire des oeufs hybrides.

YUAN X. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(1), 26(1), 11-12. (C)

Glandes séricigènes

Silkglands

Acidification of the glandular lumen by a vacuolar-type H⁺-ATPase in the anterior silk gland cell of *Bombyx mori*.

Acidification du lumen glandulaire par une H⁺-ATPase de type vacuolaire dans les cellules de la glande séricigène antérieure de *Bombyx mori*.

AZUMA M.

Laboratory of Insect Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama 4-101, Tottori 680, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 303-311. (J,e)

The activity of transaminases in posterior silk glands of silkworm and its relationship with cocoon quality.

L'activité des transaminases dans les glandes séricigènes postérieures du ver à soie en relation avec la qualité du cocon.

PENG W., ZHOU D., WANG J., WANG P.

Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 175-178. (E)

Amino acid uptake in cultured posterior silk gland.

Entrée des acides aminés dans des glandes séricigènes postérieures en culture.

TERAUCHI S., KAMINISHI T., NAGASHIMA T.*

* Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkworm & Silk*, Vol. 1(2), 201-202. (E)

Sol-gel transition of sericin.

Transformation hydrosol-gel de la sérécine.

ZHU L.J., ARAI M., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Koganei 184, Tokyo, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 270-274. (J,e)

Soie

Silk

Structural characterization of *Samia cynthia ricini* silk fibroin as biomaterial.

Caractérisation structurale de la fibroïne de la soie de *Samia cynthia ricini* en tant que biomatériau.

DEMURA M., ASAKURA T.

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 139-141. (E)

The development and application of an instrument for determining water content of fresh cocoon shells.

Le développement et l'application d'un instrument pour la détermination du titre en eau des coques soyeuses fraîches.

HU Z., LI S., ZHAO L., ZHANG S., HUANG G.

Institute of Sericulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, China.

1995 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 187-190. (C,e)

Determination and analysis on the structure of *Bombyx mori* silk fibroin membranes.

Détermination et analyse de la structure des membranes de fibroïne de soie de *Bombyx mori*.

HUANG C., XU X., SHENG J.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(3), 183-186. (C,e)

Analysis of cocoon filament quality of some silkworm varieties.

Analyse de la qualité du filament du cocon de quelques variétés de vers à soie.

HUANG G.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(1), 16-18. (C)

Physical properties of *Antheraea* silks.

Propriétés physiques des soies d'*Antheraea*.

IIZUKA E.

Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda, Nagano 386, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 143-146. (E)

Hygroscopicity and dyeing affinity of raw silk and silk yarn from silkworm larvae reared on an artificial diet supplemented with tofu cake powder.

Hygroscopicité et affinité tinctoriale de la grège et du fil de soie des vers à soie élevés sur milieu artificiel enrichi à la poudre de tofu.

KAKO T., SUMITA M., MORI H., MATSUBARA F.

Himeji College, Himeji, Hyogo 670, Japan

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 275-277. (J,e)

Matka spinning.

Le filage matka.

KAR N.B., CHAKROVORTY A., SEN S.K.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(2-3)32-35. (E)

Crease resistance of silk fabric treated with glyoxal, urethane and hydrazine.

Résistance au froissage des tissus de soie traités avec du glyoxal, de l'uréthane et de l'hydrazine.

KATO H., TAKEBE Y., OBO M., MIYAZAWA M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 159-162. (E)

Structural changes of Chinese tussah silk fibers by grafting with methacrylamide (MAA).

Changements de la structure des fibres de soie tussah chinoises par greffage de méthacrylamide (MAA).

KAWAHARA Y., SHIOYA M., KIKUTANI T., TAKAKU A.

Tokyo Metropolitan Textile Research Institute, Honjo 3-15-5, Sumida-ku, Tokyo 130, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 147-149. (E)

Improvement of molded silk fiber by sericin.

Amélioration par la sérécine des fibres de soie façonnées.

KOTANI O., ZHU L.J., ARAI M., HIRABAYASHI K.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 312-314. (J)

Analysis and comparison of the exfoliation tension of cocoon filament in the Japanese oak silkworm and mori silkworm cocoon.

Analyse et comparaison de la tension d'exfoliation du filament du cocon chez le ver à soie du chêne japonais et le ver à soie du mûrier.

TAKABAYASHI C.

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

1994 *Int. J. Wild. Silkmoth & Silk*, Vol. 1(2), 151-153. (E)

Influence of cocoon cooking conditions on variation of cocoon filament exfoliation tension.

Influence des conditions d'étouffage des cocons sur la variation de la tension d'exfoliation du filament du cocon.

TAKABAYASHI C., NAIK S.V., TSUBOI H.

Research Team of Filature Engineering, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-4-8 Gohda, Okaya, Nagano 394, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(4), 278-285. (E,j)

Studies on the manufacture of copper amino acid complex from waste silk.

Etudes sur la confection d'un complexe cuivre acides aminés à partir des déchets de soie.

TANG M. *et al.*

1995 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 26(2), 13. (C)

Correlation between the pupa weight and reelability.

Corrélation entre le poids de la chrysalide et la dévidabilité.

WANG Z.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(2), 28. (C)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4^{ème} édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Seric. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.
