

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)	LEGAY J.-M. (France)
BEAULATON J. (France)	LIU S.-X. (Chine / China)
BECK D. (France)	LU H.-S. (Chine / China)
BOSQUET G. (France)	MANO Y. (Japon / Japan)
CROIZIER 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)

SOMMAIRE - CONTENTS

Statistiques 1996 / 1996 Statistics	i
Articles scientifiques / Scientific papers	
Study on the differential diagnosis of <i>Nosema bombycis</i> of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> , by monoclonal antibody-sensitized latex	1
Etude sur le diagnostic différentiel de <i>Nosema bombycis</i> infestant le ver à soie <i>Bombyx mori</i> à l'aide d'anticorps monoclonaux fixés sur latex	7
L. SHI & W. JIN	
A new technique proposed for estimation of pebrine in grainages	11
Nouvelle technique d'évaluation de la pébrine dans les centres de grainage	15
A.K. BANSAL, N.N. SAXENA, R.M. SHUKLA, D.K. ROY, B.R.R.P. SINHA & S.S. SINHA	
Effect of vertebrate sex-hormones on <i>Bombyx mori</i> L.	19
Effet des hormones sexuelles de vertébrés chez <i>Bombyx mori</i> L.	27
B.N. SAHA & A.R. KHAN	
Studies on trehalase and trehalose in the fat body, haemolymph, silk gland and head region of the muga silkworm, <i>Antheraea assama</i> , during the spinning period	31
Etude sur la tréhalase et le tréhalose dans le corps adipeux, l'hémolymphe, la glande séricigène et la région céphalique chez le ver à soie muga, <i>Antheraea assama</i> , pendant la période de filage	37
B.G. UNNI, A. CHOUDHURY, D. KHANIKOR & A.C. GHOSH	
Preliminary study on artificial hatching of silkworm eggs stimulated by corona discharge	41
Etude préliminaire sur l'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie par décharge électrique en couronne	53
YANG M.-G., XU X.-Z., CHEN J.-S., YE S.-J. & YE Y.-Q.	
Studies on heterosis and heterobeltiosis in the tasar silkworm, <i>Antheraea mylitta</i> D.	59
Etude sur l'hétérosis et l'hétérobeltiosis chez le ver à soie tasar, <i>Antheraea mylitta</i> D.	67
A.A. SIDDIQUI	
Leaf nutritive quality associated with maturity levels in fourteen important varieties of mulberry (<i>Morus</i> spp.)	71
Association de la qualité nutritive des feuilles avec les degrés de maturité chez quatorze variétés importantes de mûrier (<i>Morus</i>)	83
U.D. BONGALE, CHALUVACHARI, R.S. MALLIKARJUNAPPA, B.V. NARAHARI RAO, M.N. ANANTHARAMAN & S.B. DANDIN	
Studies on the photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation: occurrence of the C_4 photosynthetic syndrome in mulberry (<i>Morus</i> spp.)	89
Etude sur la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par photosynthèse : présence du syndrome de photosynthèse C_4 chez le mûrier	99
C. DAS, B.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR	

Effect of VAM fungi, <i>Glomus fasciculatum</i> and <i>Acaulospora laevis</i>, against the root-knot nematode of mulberry	105
Effet des champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens <i>Glomus fasciculatum</i> et <i>Acaulospora laevis</i> contre le nématode de la galle des racines chez le mûrier	109
D.S. CHANDRASHEKAR, H. SHEKAR SHETTY & R.K. DATTA	

Rapports techniques / Technical reports

Comparative performance of multivoltine × bivoltine and bivoltine × multivoltine hybrids of <i>Bombyx mori</i> L. for commercial use in eastern India	113
Performance comparative d'hybrides polyvoltins × bivoltins et d'hybrides bivoltins × bivoltins de <i>Bombyx mori</i> destinés à l'exploitation commerciale dans l'est de l'Inde	123
G.C. ROY, B. GHOSH, S.K. DAS, B.P. NAIR, P.R.T. RAO, S.K. SEN, K. SENGUPTA & S.S. SINHA	

Oviposition in the muga silkmoth, <i>Antheraea assama</i> Westwood (Lepidoptera: Saturniidae)	127
Oviposition chez le ver à soie muga <i>Antheraea assama</i> Westwood (Lepidoptera : Saturniidae)	133
A.K. SAHU, G. RAJKHOWA, P.K. DAS & U.P. GRIYAGHEY	

Studies on crude protein and amino acid contents of mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaves in relation to cocoon production of the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	137
Etude sur les teneurs en protéines et en acides aminés des feuilles de mûrier (<i>Morus alba</i> L.) en relation avec la production de cocons chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i>	143
A.A. SARKER, M.R. HAQUE, M.A. RAB & N. ABSAR	

Mulberry raising under subtropical conditions of India — an economic appraisal	147
Production de mûrier dans les conditions subtropicales de l'Inde : évaluation économique	153
ANIL DHAR & B.B. BINDROO	

Notes brèves / Brief notes

Adaptive significance of gut pH in the oak tasar silkworm, <i>Antheraea proylei</i> J.	157
Signification de l'adaptation du pH de l'intestin chez le ver à soie tasar, <i>Antheraea proylei</i> J.	161
R.K. PANDEY	

Seed mycoflora of mulberry	163
Flore mycologique des graines de mûrier	165
D.S. CHANDRASHEKAR & H. SHEKAR SHETTY	

Bibliographie / Bibliography	167
Sériciculture générale / General sericulture	168
Mûrier / Mulberry	171
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	175
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	180
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	182
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	186
Vers à soie : œufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	192
Glandes séricigènes / Silk glands	194
Soie / Silk	195

Instructions aux auteurs / Information for contributors

Statistiques 1996 - 1996 Statistics

Tableau I Production de cocons et de soie grège en 1996

Table I. 1996 cocoon and raw silk production

Pays Country	Cocons frais Fresh cocoons (tonnes)	Soie grège Raw silk (tonnes)
Afrique du Sud / <i>South Africa</i>	4	1
Bangladesh	923.44	-
Brésil / <i>Brazil</i>	15 368 ⁽¹⁾	2 270
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	65	11
Chine / <i>China</i>	430 000 ⁽²⁾	68 500 ⁽³⁾
Colombie / <i>Colombia</i>	65.7	17.4
Corée du Sud / <i>South Korea</i>	524	480
France	1	0.2
Grèce / <i>Greece</i>	33	-
Inde / <i>India</i> ⁽¹⁾	122 802 ⁽⁴⁾	13 909 ⁽⁵⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	535.8	85.8
Iran	5 000	700
Italie / <i>Italy</i>	24	4
Japon / <i>Japan</i>	3 021	2 579
Népal / <i>Nepal</i>	10	1
Ouganda / <i>Uganda</i>	9.45	-
Ouzbékistan / <i>Uzbekistan</i>	21 700	1 349
Philippines	0.69	-
Roumanie / <i>Romania</i>	10.5	1
Syrie / <i>Syria</i>	32	-
Thaïlande / <i>Thailand</i> ⁽⁶⁾	2 381	1 596
Turquie / <i>Turkey</i>	215	40
Vietnam	12 920 ⁽⁷⁾	1 600

- Non disponible / *Not available.*

(1) 95/96.

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

(3) dont 9 500 tonnes non mûrier / *including 9 500 tonnes non mulberry.*

(4) dont 6 440 tonnes non mûrier / *including 6 440 tonnes non mulberry.*

(5) dont 1 025 tonnes non mûrier / *including 1 025 tonnes non mulberry.*

(6) Estimations / *Estimates.*

(7) dont 120 tonnes non mûrier / *including 120 tonnes non mulberry.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 1996

Table II. 1996 cocoon and raw silk imports and exports

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Afrique du Sud / South Africa	0	0	0	1
Bangladesh	-	-	-	-
Brésil / Brazil	69	2 175 ⁽¹⁾	14	6
Bulgarie / Bulgaria	0	-	-	-
Chine / China	3 059	12 101 ⁽²⁾	773	240 ⁽³⁾
Colombie / Colombia	0	30.5	0	0
Corée du Sud / South Korea	-	5.3	450	1 568
France	-	3	-	487
Grèce / Greece	0	0	0	-
Inde / India ⁽⁴⁾	0	28	14	4 149 ⁽⁵⁾
Indonésie / Indonesia	0	0.5	70.7	0
Iran	6.5	-	-	-
Italie / Italy ⁽⁶⁾	0	125	2.1	2 922
Japon / Japan	0	6	2 988	2 829 ⁽⁷⁾
Népal / Nepal	0	-	0	0
Ouganda / Uganda	-	0	-	-
Ouzbékistan / Uzbekistan	577	800	-	-
Pérou / Peru	-	0.14	-	3.89
Philippines	-	-	-	24.18
Roumanie / Romania	0	0	0	0
Syrie / Syria	-	4	-	-
Thaïlande / Thailand	-	-	-	440 ⁽⁸⁾
Turquie / Turkey	10	0	-	-
Vietnam	75	1 120	46.15	49.01

- Non disponible / Not available.

(1) dont 692 tonnes fil de soie / including 692 tonnes silk yarn.

(2) dont 881 tonnes non mûrier / including 881 tonnes non mulberry.

(3) dont 216 tonnes non mûrier / including 216 tonnes non mulberry.

(4) 95/96.

(5) dont 918 tonnes non mûrier / including 918 tonnes non mulberry.

(6) Provisoire / Provisional.

(7) dont 172 tonnes non mûrier / including 172 tonnes non mulberry.

(8) estimation / estimate.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 1996

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 1996

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
Country	Price paid to producers (fresh cocoons)	Export price (dry cocoons)	Import price (dry cocoons)
Afrique du Sud / <i>South Africa</i>	-	xx	xx
Bangladesh	1.1	-	-
Brésil / <i>Brazil</i>	2.74	10.63	8.26
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	1.25	-	-
Chine / <i>China</i>	-	9.4	1.7
Colombie / <i>Colombia</i>	2.7	xx	xx
Corée du Sud / <i>South Korea</i>	15.3	-	10.7
France	11.8	-	-
Grèce / <i>Greece</i>	7	xx	xx
Inde / <i>India</i>	3.26	xx	3.44
Indonésie / <i>Indonesia</i>	2.6	xx	10.19
Iran	3.5	-	-
Italie / <i>Italy</i>	10	xx	-
Japon / <i>Japan</i>	15.05	xx	10.33
Népal / <i>Nepal</i>	2.19	xx	xx
Ouganda / <i>Uganda</i>	2.3	-	-
Ouzbékistan / <i>Uzbekistan</i>	1.28	3.95	-
Philippines	2.30	6.77	-
Roumanie / <i>Romania</i>	2	xx	xx
Syrie / <i>Syria</i>	5	-	-
Thaïlande / <i>Thailand</i>	4	-	-
Turquie / <i>Turkey</i>	5	8.75	-
Vietnam	2	-	5.76

- Non disponible / *Not available.*xx : Pas d'exportation/d'importation de cocons / *No cocoon exports/imports.*

STUDY ON THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF *NOSEMA BOMBYCIS* OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*, BY MONOCLONAL ANTIBODY-SENSITIZED LATEX

L. SHI & W. JIN

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

*The spleen cells from BALB/c mice immunized with spores of *Nosema bombycis* of the silkworm, *Bombyx mori*, and FO myeloma cells were fused by polyethylene glycol. Six stable hybridoma cell lines (N1-6) secreting monoclonal antibodies (McAb) to specific antigens on the surface of spores of *N. bombycis* were derived. In the agglutination test, N5 McAb-sensitized latex particles were largely attached to the spores of *N. bombycis* in homogenate of pebrine mother moths and larvae of silkworm but were not attached to the spores of other microsporidians. The results showed that the agglutination test using N5 McAb-sensitized latex particles was a very practical technique for the diagnosis of the pebrine disease of the silkworm.*

Keywords: Latex agglutination, monoclonal antibody, *Nosema bombycis*, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The pebrine disease of the silkworm, *Bombyx mori*, is an infectious disease caused by the infection of *Nosema bombycis*, it has a close relationship with silkworm egg production and has been decided as a quarantine disease since 1870 in all sericultural countries because it can infect and prevail through eggs. Discarding of the eggs of pebrine moths by mother moth inspection has been the most effective method for the control of the pebrine disease of the silkworm up to now. Moreover, the correct distinction of *N. bombycis* of silkworm was the most important technique in this method. In recent years, some microsporidian spores which are similar in shape but different in the pathogenicity and germinative infection compared with *N. bombycis* of silkworm were isolated from the silkworm by researchers in China and other countries (Tanaka *et al.*, 1972; Fujiwara, 1980, 1984a, 1984b, 1985; Sato *et al.*, 1981; Li, 1985; Fang *et al.*, 1991). The existence of these microsporidian spores causes confusion in the diagnosis of pebrine mother moths by microscopic observation in silkworm egg production. Therefore, the development of a new and practical technique for the correct distinction of *N. bombycis* of silkworm will have a positive significance on the control of the pebrine disease of the silkworm. Many methods such as slide agglutination test (Li, 1985), antibody-sensitized latex agglutination test (Hayasaka and Ayuzawa, 1987), fluorescent antibody test (Sato *et al.*, 1981; Huang *et al.*, 1983; Zheng *et al.*, 1992), enzyme-linked immunosorbent assay (Han and Watanabe, 1987; Kawarabata and Hayasaka, 1987; Qian *et al.*, 1986) and SPA coagglutination (Mei and Jin, 1988) for the detection or distinction of *N. bombycis* of silkworm, were developed based on the antigen-antibody reaction of traditional antiserum in China and other countries. However, these methods have some shortcomings such as unstable source of antibody and cross reaction, etc. Monoclonal antibody (McAb) has very high specificity and stability, and has played a great role in the study of classification, diagnosis, pathology, etc., of microorganisms (Wiktor *et al.*, 1980; Roberts and Naser, 1982; Zhang and Kaupp, 1988; Chen *et al.*, 1989; Carlos *et al.*, 1996). We have prepared the McAb against spore surface antigens of *N. bombycis* of silkworm, and developed the McAb-sensitized latex agglutination into a rapid technique for the differential diagnosis of *N. bombycis* of silkworm.

MATERIALS AND METHODS

Microsporidian spores:

The spores of *N. bombycis* of silkworm were propagated in the larvae of the silkworm by per os inoculation and were isolated and purified according to the method described by Li (1985). The spores of large-shape microsporidian (LSM) were isolated from the silkworm. The spores of *Nosema pieris* of *Pieris rapae*, *Nosema hemerophila* of *Hemerophila atrilineata*, *Nosema* sp. of *Antheraea pernyi*, *Nosema apis* of *Apis mellifera* and *Nosema ostrina* of *Ostrinia nubilalis* were supplied by Prof. Li D. (Suzhou Sericulture College, Suzhou, China).

Production of McAb:

Purified spores of *N. bombycis* of silkworm suspended in physiological saline were mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant. BALB/c mice were immunized with this emulsion by abdominal cavity injection of 2×10^8 spores four times at 12-day intervals. Four days after the last injection, the mice were vivisected to derive the spleen. The spleen cells were fused with cells of a non-secreting FO myeloma cell line by 50% polyethylene glycol according to the method of Yu (1992). The resulting fusion product was selectively cultured in 24-well cell plates by HAT medium. After 2 weeks, specific antibody to the *N. bombycis* of silkworm in the supernatant fluid of hybrid cultures was assayed by the slide agglutination test (Li, 1985) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Kawarabata and Hayasaka, 1987). Specific antibody-secreting hybridomas were further propagated and cells from cultures yielding high antibody titres were cloned under conditions of limiting dilution. Cloned cells secreting specific antibody were further cloned to derive the stable hybridoma cell lines secreting McAb to *N. bombycis* of silkworm. The hybridoma cells were propagated and injected into the abdominal cavity of BALB/c mice injected with paraffin oil to make the ascites. Ascites or supernatant fluid were centrifuged at 4000 rpm for 10 min. to remove hemocytes or hybridoma cells and stored at -20 °C until use.

McAb-sensitization of latex particles:

The IgG of the McAb against *N. bombycis* of silkworm were isolated by ammonium sulfate precipitation (Yu, 1992) and sensitize the polystyrene latex particles ($\phi = 0.81 \mu\text{m}$, Difco) according to the method of Shimizu *et al.* (1983). Precisely, 4 ml of a gamma globulin in 0.1 M glycine-buffered saline (GBS), pH 8.2, was mixed with 1 ml of a latex particle suspended in GBS, pH 8.2, and was shaken for definite time at 37 °C. The mixture was then diluted by solution of 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween-80 in GBS and washed twice in GBS by centrifugation (10,000 rpm, 20 min.) to remove non-combined IgG. The McAb-sensitized latex particles were suspended in GBS added with 0.01% NaN_3 and stored at 4 °C until use.

Latex agglutination test:

A drop of spores suspended in GBS or homogenate was put on a glass slide, then a drop of McAb-sensitized latex particle suspension was added, and they were thoroughly mixed. After incubation for definite time at 37 °C, a coverglass was lightly placed on the mixture. The degree of agglutination was observed under a phase-contrast microscope (600 ×).

Protein determination:

Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) by using bovine serum albumin as the standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Six stable hybridoma cell lines (N1-6) secreting McAb to *N. bombycis* of silkworm were derived through extensive clonal screening. The McAb secreted by N1, N2 and N4 belonged to IgM isotype, but the McAb secreted by N3, N5 and N6 belonged to IgG isotype. Through the comparison of specificity and antibody titre by slide agglutination test, N5 McAb secreted by N5 was used for the diagnosis test of *N. bombycis* of silkworm. The agglutination titres (reciprocal of endpoint dilution)

of N5 McAb were 64-128 of supernatant fluid of hybrid cultures and 1250-2500 of ascites, respectively. N5 McAb could only agglutinate the spores of *N. bombycis* of silkworm, but could not agglutinate all the spores of *N. pieris*, of *Pieris rapae*, of *N. hemerophila*, of *Hemerophila atrilineata*, of *N. sp.*, of *Antheraea pernyi*, of *N. apis*, of *Apis mellifera*, of *N. ostrina*, of *Ostrinia nubilalis* and of LSM, of silkworm. The result showed that N5 McAb had a very high specificity.

Through the detection by checkerboard titration method, the optimum conditions for the sensitization of latex particles using the N5 McAb were as follows: 16 µg/ml of IgG of antibody, 30 min. of sensitization time (Table I).

Table I. Titration of optimum conditions for the sensitization of latex particles^a.

Tableau I. Titrage des conditions optimales de sensibilisation des particules de latex^a.

Sensitization time Temps de sensibilisation (min)	Concentration of IgG of monoclonal antibody (µg/ml) Concentration en IgG d'anticorps monoclonal (µg/ml)						
	0	2	4	8	16	32	64
5	- ^b	±	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	++	++	+++
30	-	+	+	++	+++	+++	+++
40	-	+	+	++	+++	+++	+++
50	-	+	+	++	+++	+++	+++

^a: 10^{10} particles/ml of latex.

^b: Agglutination was observed after incubation for 20 min. at 37 °C with 4×10^6 spores/ml of *Noxema bombycis* of silkworm, and graded as follows: +++, 100% of immuno-adsorbed spores with latex particle; ++, 70-99% of immuno-adsorbed spores with latex particle; + 30-69% of immuno-adsorbed spores with latex particle; ±, 1-29% of immuno-adsorbed spores with latex particle; -, 0% of immuno-adsorbed spores with latex particle.

^a: 10^{10} particules de latex/ml.

^b: L'agglutination a été observée après incubation pendant 20 mn à 37 °C avec 4×10^6 spores de *Nosema bombycis*/ml. +++ : 100 % des spores immuno-adsorbées par particules de latex ; ++ : 70 à 99 % des spores immuno-adsorbées par particules de latex ; + : 30 à 66 % des spores immuno-adsorbées par particules de latex ; ± : 1 à 29 % des spores immuno-adsorbées par particules de latex ; - : 0 % des spores immuno-adsorbées par particules de latex.

With these optimum sensitization conditions, serial concentrations of N5 McAb-sensitized latex particles were prepared and mixed with purified spores of *N. bombycis* of silkworm. Their agglutination was observed at designed times (Table II). The result indicated that McAb-sensitized latex particles were strongly attached to the spores of *N. bombycis* of silkworm by the agglutination reaction conditions of the 2.5×10^9 - 1.25×10^{10} particles/ml of sensitized latex and the 20 min. of reaction times.

The agglutinability of McAb-sensitized latex particles with purified spores of *N. bombycis*, of *N. pieris*, of *N. hemerophila*, *N. sp.*, of *N. apis*, of *N. ostrina* and of LSM were examined under the optimum condition of latex agglutination, respectively. McAb-sensitized latex particles were only largely attached on spores of *N. bombycis*, but were not attached to all the spores of other microsporidians such as *N. pieris* etc. (Table III). The result showed that spores of *N. bombycis* of silkworm could be distinguished specifically by the agglutination test using the McAb-sensitized latex particles.

Table II. Titration of optimum conditions for the latex agglutination.

Tableau II. Titrage des conditions optimales d'agglutination au latex.

Concentration of sensitized latex (particles/ml) <i>Concentration en latex sensibilisé (particules/ml)</i>	Reaction time (min.) / <i>Temps de réaction (mn)</i>				
	5	10	20	30	40
2×10^7	^a +	+	+	+	+
1×10^8	+	+	++	++	++
5×10^8	+	+	++	++	+++
2.5×10^9	+	++	+++	+++	+++
1.25×10^{10}	+	++	+++	+++	+++

a: Symbol is the same as b in Table I / *a : Voir note b du tableau I.*

Table III. Agglutination test of monoclonal antibody-sensitized latex particles to some microsporidian spores.

Tableau III. Test d'agglutination des particules de latex sensibilisées aux anticorps monoclonaux de certaines spores microsporidiennes.

Microsporidian spore	Anti- <i>Nosema bombycis</i> monoclonal antibody-sensitized latex
<i>Spore microsporidienne</i>	<i>Latex sensibilisé aux anticorps monoclonaux anti-Nosema bombycis</i>
Purified spores of <i>Nosema bombycis</i> / <i>Spores purifiées de Nosema bombycis</i>	+++ ^a
Spores of <i>Nosema bombycis</i> in homogenate of pebrine silkworm mother moths	+++
<i>Spores de Nosema bombycis dans un broyat de papillons mères pébrinés</i>	
Spores of <i>Nosema bombycis</i> in homogenate of pebrine silkworm larvae	+++
<i>Spores de Nosema bombycis dans un broyat de larves pébrinées</i>	
Spores of <i>Nosema pieris</i> / <i>Spores de Nosema pieris</i>	-
Spores of <i>Nosema hemerophila</i> / <i>Spores de Nosema hemerophila</i>	-
Spores of <i>Nosema</i> sp. / <i>Spores de Nosema</i>	-
Spores of <i>Nosema apis</i> / <i>Spores de Nosema apis</i>	-
Spores of <i>Nosema ostrina</i> / <i>Spores de Nosema ostrina</i>	-
Spores of LSM / <i>Spores de microsporidiens de forme large</i>	-

a: Symbol is the same as b in Table I / *a : voir note b du tableau I.*

Pebrine mother moths and larvae of silkworm were prepared according to the method of Shi *et al.* (1994) and homogenized with 0.1 M GBS, pH 8.2. The homogenates were filtered through 2 coats of antiseptic gauze. The filter liquors were also tested for McAb-sensitized latex agglutination

(Table III). The result suggested that the homogenate of pebrine mother moths and larvae did not hinder the agglutination reaction of the McAb-sensitized latex particles, and the spores of *N. bombycis* in pebrine mother moths and larvae could also be specifically distinguished by McAb-sensitized latex agglutination test.

The latex agglutination technique developed in this study organically combined the sensitivity and specificity of McAb with accuracy of microscope. By using this technique, *N. bombycis* of silkworm could be diagnosed specifically, sensitively and quickly. In addition, the operational procedure of this technique is simpler and easier than those of other serological methods. Therefore, this technique will be a very practical means for the diagnosis of the pebrine disease of silkworm. Besides, this technique has also a broad application prospect for field investigation of microsporidian spores of insects in the wild.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Huang Shousen, Dr Chen Jianguo and Dr Fu Zhengwei for their helpful instructions and encouragements during the study. We also thank Dr Wu Xidofeng for reading the manuscript and providing helpful suggestions.

REFERENCES

- CARLOS A., DIDIER P., JEAN C. (1996) Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J. Virol.*, 70(2), 985-991.
- CHEN J., TENG J., HU C., MICHAEL M. (1989) Production of monoclonal antibodies to densovirus of silkworm (*Bombyx mori*) and their application in diagnosis. *Chinese J. Virology*, 5(1), 77-81.
- FANG D., LIAO S., ZHENG M., ZHU D., CHEN H., LIU J., QI L., LU K., NONG Z., BAI B., MAO K., CHEN J. (1991) Study on the two microsporidians (MG1, MG2) from the silkworm, *Bombyx mori*. *Guangdong Agricultural Sci.*, 2, 35-38.
- FUJIWARA T. (1980) Three microsporidians (*Nosema* sp.) from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 49(3), 229-236.
- FUJIWARA T. (1984a) A *Pleistophora*-like microsporidian isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 53(5), 398-402.
- FUJIWARA T. (1984b) *Thelohania* sp. (Microsporidia, Thelohanidae) isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 53(5), 459-460.
- FUJIWARA T. (1985) Microsporidia from silkworm moths in egg-production sericulture. *J. Sericult. Sci. Japan*, 54(2), 108-111.
- HAN M., WATANABE H. (1987) Immunoperoxidase-staining methods for discrimination of microsporidian spores in the pebrine inspection of silkworm mother moths. *J. Sericult. Sci. Japan*, 56(5), 431-435.
- HAYASAKA S., AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody-sensitized latex. *J. Sericult. Sci. Japan*, 56(2), 169-170.
- HUANG Z., ZHENG X., LU Y. (1983) A primary study on the detection of spores, *Nosema bombycis* of silkworm, *Bombyx mori*, by fluorescent antibody technique. *Science of Sericulture*, 9(1), 59-60.
- KAWARABATA T., HAYASAKA S. (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of strains of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae). *J. Invert. Pathol.*, 50(2), 118-123.
- LI D. (1985) Studies on the serological diagnosis of the pebrine of silkworm, *Bombyx mori*, by slide agglutination test. *Science of Sericulture*, 11(2), 99-102.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MEI L., JIN W. (1988) Study on fast distinguishing *Nosema bombycis* by SPA coagglutination. *Science of Sericulture*, 14(2), 110-111.
- QIAN Y., GUO X., HU X. (1986) Distinguishing the pebrine spores, *Nosema bombycis*, of the mulberry silkworm by immunoenzymatic technique. *Science of Sericulture*, 12(3), 183-184.

- ROBERTS P.L., NASER W. (1982) Characterization of monoclonal antibodies to the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 122, 424-430.
- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H., FUJIWARA T. (1981) Serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm, *Bombyx mori*, by an indirect fluorescent antibody technique. *J. Sericult. Sci. Japan*, 50(3), 180-184.
- SHI L., TAO T., JIN W. (1994) Study on the infectivity of pebrine silkworm moth. *J. Zhejiang Agricultural University*, 20(5), 508-512.
- SHIMIZU S., OHBA M., KANDA K., AIZAWA K. (1983) Latex agglutination test for the detection of the flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invert. Pathol.*, 42, 151-155.
- TANAKA S., SHIMIZU T., KOBAYASHI M., ISHIHARA R. (1972) A new microsporidian pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 41(2), 89-95.
- WIKTOR T.J., FLAMAND A., KOPROWSKI H. (1980) Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Methods*, 1, 33-46.
- YU L. (1992) Immunology experimental technique. Zhejiang University Publish House, 11-15, 151-173.
- ZHANG G., KAUPP W.J. (1988) Use of monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus. *Chinese J. Virology*, 4(1), 61-64.
- ZHENG X., FANG D., LIAO S., ZHU D. (1992) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* of silkworm, *Bombyx mori*, by several serological techniques. *Guangdong Sericulture*, 3, 29-33.

ETUDE SUR LE DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DE *NOSEMA BOMBYCIS* INFESTANT LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* A L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX FIXES SUR LATEX

L. SHI & W. JIN

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, Chine.

Des cellules de rate issues de souris BALB/c immunisées avec des spores de Nosema bombycis du ver à soie Bombyx mori ont été fusionnées avec des cellules de myélome FO en utilisant le polyéthylène glycol. On a obtenu six lignées cellulaires hybridomes stables (N1 à N6) sécrétant des anticorps monoclonaux (McAb) d'antigènes spécifiques de la surface des spores de N. bombycis. D'après le test d'agglutination, les particules de latex sensibilisées au McAb N5 sont fortement attachées aux spores de N. bombycis dans un broyat de papillons mères et de larves de vers à soie pébrinés mais ne se fixent pas sur les spores des autres microsporidiens. Ces résultats montrent que le test d'agglutination avec des particules de latex sensibilisées au McAb N5 est une technique très pratique de détection de la pébrine chez le ver à soie.

INTRODUCTION

La pébrine du ver à soie *Bombyx mori* est une maladie infectieuse provoquée par l'infestation par *Nosema bombycis*. Elle est étroitement liée avec la production d'oeufs de vers à soie et la mise en quarantaine pour cette maladie a été décrétée depuis 1870 dans tous les pays séricicoles car elle peut infester et se transmettre par les oeufs. A ce jour, l'élimination des oeufs des papillons pébrinés après examen des papillons mères est la méthode la plus efficace de lutte contre la pébrine. De plus, l'identification exacte de *N. bombycis* du ver à soie est l'étape la plus importante de cette méthode. Depuis quelques années, des spores microsporidiennes, identiques par la forme aux spores de *N. bombycis* mais différentes au niveau de la pathogénie et de l'infestation germinative, ont été isolées chez le ver à soie par des chercheurs en Chine et dans d'autres pays (Tanaka et coll., 1972 ; Fujiwara, 1980, 1984a, 1984b, 1985 ; Sato et coll., 1981 ; Li, 1985 ; Fang et coll., 1991). La présence de ces spores microsporidiennes provoque une confusion lors du diagnostic des papillons mères pébrinés par observation au microscope des oeufs de ver à soie. La mise au point d'une technique nouvelle et pratique d'identification exacte de *N. bombycis* du ver à soie est donc d'une importance capitale dans la lutte contre la pébrine du ver à soie. Plusieurs méthodes de détection ou d'identification de *N. bombycis* basées sur les réactions antigènes-anticorps des antisérums traditionnels ont été élaborées en Chine et dans d'autres pays : le test d'agglutination sur lame (Li, 1985), le test d'agglutination du latex sensibilisé aux anticorps (Hayasaka et Ayuzawa, 1987), le test des anticorps fluorescents (Sato et coll., 1981 ; Huang et coll., 1983 ; Zheng et coll., 1992), le dosage immunoenzymatique (Han et Watanabe, 1987 ; Kawarabata et Hayasaka, 1987 ; Qian et coll., 1986) et la congglutination SPA (Mei et Jin, 1988). Cependant, ces méthodes présentent des points faibles comme l'utilisation d'une source instable d'anticorps, les réactions croisées, etc. Les anticorps monoclonaux (McAb) ont une spécificité et une stabilité très élevées et ils jouent un rôle important dans la classification, le diagnostic, la pathologie, etc., des micro-organismes (Wiktor et coll., 1980 ; Roberts et Naser, 1982 ; Zhang et Kaupp, 1988 ; Chen et coll., 1989 ; Carlos et coll., 1996). Nous avons préparé des McAb contre les antigènes de surface des spores de *N. bombycis* du ver à soie et mis au point une technique rapide de diagnostic spécifique de *N. bombycis* par agglutination de latex traité aux McAb.

MATERIELS ET METHODES

Spores microsporidiennes :

Les spores de *N. bombycis* du ver à soie ont été propagées dans des larves de ver à soie par inoculation *per os*. Elles ont été isolées et purifiées selon la méthode décrite par Li (1985). Les spores de microsporidiens de grande taille (LSM) ont été isolées chez le ver à soie. Les spores de *Nosema pieris* infestant *Pieris rapae*, de *Nosema hemerophila* infestant *Hemerophila atrilineata*, de *Nosema* infestant *Antheraea pernyi*, de *Nosema apis* infestant *Apis mellifera* et de *Nosema oestrina* infestant *Ostrinia nubilalis* ont été fournies par le Professeur Li D. (Suzhou Sericultural College, Suzhou, Chine).

Obtention des anticorps monoclonaux :

Des spores purifiées de *N. bombycis* du ver à soie suspendues dans du sérum physiologique ont été mélangées à un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Des souris BALB/c ont été immunisées avec cette émulsion par injection de 2×10^8 spores quatre fois à intervalles de 12 jours dans la cavité abdominale. Quatre jours après la dernière injection, la rate des souris a été prélevée par vivisection. Les cellules de rate ont été fusionnées avec des cellules d'une lignée cellulaire de myélome FO par utilisation de polyéthylène glycol à 50 % selon le protocole de Yu (1992). Le produit de fusion obtenu a été cultivé de manière sélective dans des plaques cellulaires de 24 puits en milieu HAT. Après deux semaines, l'anticorps spécifique de *N. bombycis* du ver à soie dans le liquide surnageant des cultures hybrides a été analysé par test d'agglutination sur plaque (Li, 1985) et par dosage immunoenzymatique (Kawarabata et Hayasaka, 1987). Les hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques ont ensuite été propagés et les cellules des cultures présentant des titres d'anticorps élevés ont été clonées en conditions de dilution restrictive. Les cellules sécrétant les anticorps spécifiques ont été clonées pour obtenir les lignées cellulaires d'hybridomes sécrétant le McAb de *N. bombycis* du ver à soie. Les cellules hybridomes ont été propagées et injectées dans la cavité abdominale des souris BALB/c traitées avec de l'huile paraffinée pour obtenir les ascites. Les ascites, ou le liquide surnageant, ont été centrifugés à 4 000 tours/mn. pendant 10 mn pour éliminer les hémocytes, ou les cellules hybridomes, et stockées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Sensibilisation des particules de latex aux McAb :

Les immunoglobulines G (IgG) des McAb de *N. bombycis* du ver à soie ont été isolées par précipitation dans du sulfate d'ammonium (Yu, 1992) et activation des particules de latex en polystyrène ($\phi = 0.81 \mu\text{m}$, Difco), selon le protocole de Shimizu et coll. (1983). Plus précisément, 4 ml d'une gammaglobuline dans 0,1 M de solution saline tamponnée à la glycine (GBS), pH 8,2, ont été mélangés avec 1 ml de particules de latex suspendues dans le tampon GBS, pH 8,2, et agitées pendant un laps de temps déterminé à 37 °C. Le mélange a ensuite été dilué avec une solution de sérumalbumine bovine à 1 % et du Tween-80 à 0,05 % dans le tampon GBS et lavé deux fois dans le tampon GBS par centrifugation (10 000 tours/mn, 20 mn) pour éliminer les IgG non combinées. Les particules de latex enrobées de McAb ont été suspendues dans le tampon GBS additionné de NaN_3 à 0,01 % et stockées à 4 °C jusqu'à utilisation.

Test d'agglutination au latex :

Une goutte de spores suspendues dans le tampon GBS, ou le broyat, a été déposée sur une lame de verre, puis une goutte de suspension de particule de latex sensibilisé aux McAb a été ajoutée et les deux gouttes ont été mélangées soigneusement. Après incubation pendant une durée déterminée à 37 °C, une lamelle couvre-objet a été placée sur le mélange. Le degré d'agglutination a été observé au microscope à contraste de phase (600 ×).

Détermination des protéines :

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Lowry et coll. (1951) en utilisant de la sérumalbumine bovine comme standard.

RESULTATS ET DISCUSSION

On a obtenu 6 lignées cellulaires hybridomes (N1 à N6) sécrétant les McAb de *N. bombycis* du ver à soie par sélection extensive des clones. Les McAb sécrétés par les lignées N1, N2 et N4 appartiennent à l'isotype IgM mais les McAb sécrétés par les lignées N3, N5 et N6 appartiennent à l'isotype IgG. Les McAb N5 sécrétés par la lignée N5 ont été utilisés pour diagnostiquer *N. bombycis* du ver à soie en comparant la spécificité et le titre des anticorps par test d'agglutination au latex. Les titres d'agglutination (réciproque de la dilution finale) des McAb N5 sont de 64 à 128 de liquide surnageant de cultures hybrides et de 1 250 à 2 500 d'ascites. Les McAb N5 n'agglutinent que les spores de *N. bombycis* et sont incapables d'agglutiner les spores de *N. pieris* (de *Pieris rapae*), de *N. hemerophila* (d'*Hemerophila atrilineata*), de *Nosema* (d'*Antheraea pernyi*), de *N. apis* (d'*Apis mellifera*), de *N. ostrina* (d'*Ostrinia nubilalis*) et de LSM (du ver à soie). Ce résultat montre que les McAb N5 ont une spécificité très élevée.

Les conditions optimales de sensibilisation des particules de latex à l'aide des McAb N5 déterminées par la méthode de titrage sur damier sont les suivantes : 16 µg/ml d'IgG d'anticorps, 30 mn de sensibilisation (Tableau I).

Dans ces conditions optimales de sensibilisation, des concentrations en série de particules de latex sensibilisées aux McAb N5 ont été préparées et mélangées avec des spores purifiées de *N. bombycis* du ver à soie. L'agglutination obtenue a été observée à des instants déterminés (Tableau II). Les résultats indiquent que les particules de latex sensibilisées aux McAb sont fortement fixées aux spores de *N. bombycis* du ver à soie en conditions de réaction d'agglutination de $2,5 \times 10^9$ - $1,25 \times 10^{10}$ particules/ml de latex sensibilisé et 20 mn de durée de réaction.

L'agglutination des particules de latex sensibilisées aux McAb avec des spores purifiées de *N. bombycis*, de *N. pieris*, de *N. hemerophila*, de *N. apis*, de *N. ostrina* et de LSM a été observée dans les conditions optimales d'agglutination du latex. Les particules de latex sensibilisées aux McAb sont fortement fixées aux spores de *N. bombycis* mais ne se fixent sur aucune des spores des autres microsporidiens comme *N. pieris*, etc. (Tableau III). Ce résultat montre que les spores de *N. bombycis* du ver à soie peuvent être identifiées de manière spécifique par test d'agglutination utilisant des particules de latex sensibilisées aux McAb.

Des papillons mères et des larves de ver à soie pébrinisés ont été préparés suivant la méthode de Shi et coll. (1994) et broyés dans un tampon GBS 0,1 M, pH 8,2. Les broyats ont été filtrés à travers deux épaisseurs de gaze antiseptique. La solution filtrée a été testée pour évaluer l'agglutination du latex sensibilisé aux McAb (Tableau III). Les résultats obtenus suggèrent que le broyat de papillons mères et de larves pébrinisés n'inhibe pas la réaction d'agglutination des particules de latex sensibilisées aux McAb et que le test d'agglutination du latex sensibilisé aux McAb permet de détecter de manière spécifique les spores de *N. bombycis* des papillons mères et des larves pébrinisés.

La technique d'agglutination au latex élaborée dans cette étude combine de manière organique la sensibilité et la spécificité des McAb avec l'exactitude du microscope. Cette technique permet d'identifier rapidement et de manière spécifique *N. bombycis* du ver à soie. De plus, le mode d'opération de cette technique est plus simple et plus facile à adopter que d'autres méthodes sérologiques. Cette technique constituera donc un moyen très pratique de détection de la pébrine du ver à soie. En outre, elle présente également des perspectives d'application pour l'étude sur le terrain des spores microsporidiennes d'insectes dans la nature.

A NEW TECHNIQUE PROPOSED FOR ESTIMATION OF PEBRINE IN GRAINAGES

A.K. BANSAL, N.N. SAXENA, R.M. SHUKLA, D.K. ROY, B.R.R.P. SINHA & S.S. SINHA

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

*The estimation of pebrine infection in seed cocoons at the time of their consignment to grainages (egg production units) is an important phenomenon in sericulture. A new method has been proposed for assessment of pebrine infection in grainages by examination of the testes of male pupae. This method gave more accurate results as the infection was found much higher in testes and ovaries when compared to other tissues, i.e., gut, Malpighian tubules and fat body. The comparison of this method with the conventional method and other methods is also discussed in *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama* and *Bombyx mori*.*

Keywords: *Antheraea mylitta*, pebrine, grainage, forecast.

INTRODUCTION

The tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury, suffers considerable loss due to microsporidiosis, a protozoan disease caused by *Nosema* sp. In addition to peroral infection, it transmits transovarially, i.e., from the mother to its offspring via the eggs. This is a major mortality factor in sericulture. In acute conditions, the disease causes crop loss and poor quality of silk yield. Various methods have been adopted to screen infected moths in the grainage (seed production unit). While procuring seed cocoons for commercial grainages, the method of Pasteur (1870), i.e., examination of pupae under a microscope, is adopted. But due to the high fat contents, it is difficult to assess the actual percentage of pebrine in a given lot, until the lot is found heavily infected. To make an easy and accurate estimation of pebrine a simple method is imperative. In view of its transovarial transmission mode, a method has been tested by the examination of the testes of the pupae. As such, an experiment was designed to assess pebrine through testis examination in *Antheraea mylitta* Drury, *Antheraea assama* Westwood and *Bombyx mori* Linnaeus, the three major silk-producing varieties of India, which are reported to be infected with *Nosema* species.

MATERIALS AND METHODS

To conduct the experiment, cocoons of *A. mylitta*, *A. assama* and *B. mori* were kept in the grainage. The experiment was designed as follows:

Part I (A):

Out of 10,000 cocoons of *A. mylitta*, 100 male and 100 female pupae were selected on a random basis (Fisher and Yates, 1963). The pupae were cut open and testes, ovaries, Malpighian tubules, fat body and gut were crushed on a slide in one drop of 0.5% K_2CO_3 and examined under the microscope. If any of the above tissues was found infected with *Nosema* spores (commonly known as pebrine spores) the material from the same pupae was diluted in a fixed ratio in 0.5% K_2CO_3 (1:5) and the number of spores was counted with an improved Neubauer haemocytometer and tabulated.

Part I (B):

Two batches [B(i) and B(ii)] of 100 pupae each (male and female mixed) were collected randomly and the pupae of batch B(i) were crushed individually as a whole and a drop of this smear was examined by adding one drop of 2% KOH (conventional method). In another batch B(ii), individual pupae were crushed in 0.5% K_2CO_3 , filtered through a cheesecloth and the solution was centrifuged at 4,000 rpm for 5 minutes. The remainder was diluted with water and one drop was examined under a microscope (centrifugation method).

Part II (A):

Just before the start of grainage, 1,500 live cocoons were kept in a wire-mesh cage. Day-to-day moth emergence of males and females was recorded. The lower middle abdominal portion of the moth was crushed in 0.5% K_2CO_3 and the smear was examined microscopically. If the moth was found infected sex-wise, the percentage of disease infection (PDI) was calculated.

Part II (B):

The rest of the cocoons were kept in a separate grainage and the emerged moths were allowed to mate. The mated female moths after completion of egg-laying were crushed in 0.5% K_2CO_3 and the smear was examined. The PDI was calculated for pebrine infection.

The method was repeated with a smaller population of *A. assama* and *B. mori* cocoons. In each case, 1,000 cocoons were kept in the grainage and 50 pupae each were examined for Parts I A, I B(i) and B(ii). Two hundred cocoons were used for Part II (A) and the rest for Part II (B).

RESULTS

The data presented in Table I indicate that there is a wide gap (approximately three times) in the conventional method of pupal examination (20%) to actual moth examination (males, 66.9%; females, 61.2% and mated females, 72.9%) in the case of *A. mylitta*. The forecasting done through gonad examination (55%) was closer to the actual results in contrast with the conventional method. Moreover, before the start of the grainage, the gonad examination results and the results of pupal examination through the centrifugation method (60%) were very close to each other. Further, the results of both gonads, i.e., testes and ovaries, were at par. Similar observations were also recorded in the case of *A. assama* and *B. mori*. The tabulation of the spore concentration in different tissues (Table II) clearly indicates that the concentration is distinctly higher in testes (4.3×10^5) in comparison to other susceptible tissues.

DISCUSSION

For the preparation of disease-free layings, the cocoons are purchased from the adopted rearers/farmers or from the stock of the seed multiplication centre. Before procurement, sample testing of pupae is done through the conventional method to record the pebrine infection. It is a common observation of the technicians in the grainage that the pebrine infection during seed production is always higher than the estimation at the time of the consignment of the cocoons to the grainage. This indicates some lacunae in the examination method. In addition to the method of Pasteur (1870), there are several other methods, i.e., use of India ink (Geetha Bai *et al.*, 1985); dry moth testing (Kurusu, 1986); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Qian *et al.*, 1986; Kawarabata and Hayasaka, 1987; Sato *et al.*, 1981; Ke *et al.*, 1990); indirect fluorescent body technique (Fujiwara *et al.*, 1966; Sato *et al.*, 1981; Huang *et al.*, 1983); latex bead agglutination method (Hayasaka and Ayuzawa, 1987); protein A-linked latex antisera test (PALLAS) (Baig *et al.*, 1992); examination of exuviae (Sharan *et al.*, in press), which can be used for detection of *Nosema* spores. Among these, immunological tests are the most accurate and confirmatory. These techniques, though sensitive, are not used in the field, owing to the technical complexity involved in the tests. At present, no accurate method is in practice for forecasting the disease percentage in a given lot of cocoons before its procurement.

Table I. Assessment of pebrine infection (%) through the conventional method, gonad examination and during the grainage period.

Tableau I. Evaluation de l'infestation par la pébrine (%) par la méthode conventionnelle, l'examen des gonades et au cours de la période de grainage.

Silkworm host	Gonad		Co	Ce	Moth examination					
	Testis	Ovary			Male		Female		Mated female	
					%	PDI	%	PDI	%	PDI
Ver à soie hôte	Gonade		Co	Ce	Examen des papillons					
	Testicule	Ovaire			Mâle		Femelle		Femelle accomplée	
					%	PDI	%	PDI	%	PDI
<i>A. mylitta</i>	55	55	20	60	66.9	54.6	61.2	36.6	72.9	41.5
<i>A. assama</i>	63	62	20	68	71.3	62.2	70.4	40.3	75.2	44.6
<i>B. mori</i>	10	10	3	11	12.2	58.2	11.3	32.5	13.2	42.0

Co: Conventional method / *Méthode conventionnelle*.

Ce: Centrifugation method / *Méthode de centrifugation*.

Table II. Spore concentration in the susceptible tissues of infected pupae.

Tableau II. Concentration en spores dans les tissus sensibles des chrysalides infestées.

Tissue <i>Tissu</i>	Spore count / <i>Numération des spores</i>		
	<i>A. mylitta</i>	<i>A. assama</i>	<i>B. mori</i>
Gut / <i>Intestin</i>	0.4×10^5	0.6×10^5	0.4×10^5
Malpighian tubules / <i>Tubes malpighiens</i>	0.3×10^5	0.3×10^5	0.2×10^5
Fat body / <i>Corps adipeux</i>	0.9×10^5	1.0×10^5	0.7×10^5
Testis / <i>Testicule</i>	4.3×10^5	4.8×10^5	4.2×10^5
Ovary / <i>Ovaire</i>	1.7×10^5	1.9×10^5	1.8×10^5

The systematic study of infected tissues indicates that *Nosema bombycis* spores reach the gonads from the eighth day onward (Nordin and Maddox, 1974) in larvae of *Bombyx mori* when infected perorally. The *Nosema* sp. spores in *A. mylitta* also reach the gonads between the eighth and the ninth day at 30 to 35 °C. The spore starts its multiplication in the gut region and spreads almost in seven to eight days in the tissues prone to the infection. Its rapid multiplication in the midgut and gonads may be due to the availability of nutritional material. But in pupae, the gut contains either much less spore (0.4×10^5) or no spore was found. Hsu *et al.* (1992) have described that the sperms of *Spodoptera*

litura are capable of carrying *Nosema* sp. by vertical transmission. So far, this phenomenon has not been observed in *A. mylitta* (Griyaghey and Sengupta, 1989) but infected male moths are one reason for poor fecundity and poor hatching. The high percentage of infection recorded in mated females (72.9%) in comparison to virgin females (61.2%) may be due to the transmission of spores along with the sperms and seminal fluid. Moreover, the fact that the PDI is highest in males (54.6%) in comparison to females (36.6%), which is the lowest, and mated females (41.5%), also confirms our observations.

In view of the above facts and its high accuracy, it is proposed that the pupal testis examination in comparison to whole pupal examination is a fairly accurate method for forecasting/assessing the disease percentage in a given lot. This may also help to save valuable female pupae which can otherwise be used for securing viable eggs.

REFERENCES

- BAIG M., DATTA R.K., NATARAJU B., SAMSON M.V., SIVAPRASAD V. (1992) Protein A-linked latex antisera test for the detection of *Nosema bombycis* Naegeli spores. J. Invertebr. Pathol., 60, 312-313.
- FISHER R.A., YATES F. (1938) Statistical Table for Biological, Agricultural and Medical Research. Longman Group Limited, England.
- FUJIWARA T., OGIMOTO K., SUDO K., VEDA K. (1966) Immunofluorescence study of *Nosema bombycis* N., a causative agent of the pebrine. Acta Sericol., 58, 14-19.
- GEETHA BAI M., PATIL C.S., KASTURI BAI A.R. (1985) A new method for detection of pebrine spores. Sericologia, 25, 297-300.
- GRIYAGHEY U.P., SENGUPTA K. (1989) Studies on the transmission of *Nosema* sp. in tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Sericologia, 29, 383-387.
- HAYASAKA S., AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody-sensitized latex. J. Sericult. Sci. Japan, 56, 658-665.
- HSU T.H., HSU E.L., YEN D.F. (1992) Vertical transmission of a *Nosema* sp. in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. Plant Prot. Bull., 34, 33-40.
- HUANG Z., ZHENG X., LU Y. (1983) Detection of pebrine sporozoan, *Nosema bombycis*, in the silkworm, *Bombyx mori*, by fluorescent antibody techniques. Sci. Sericult., 9, 59-60.
- KAWARABATA T., HAYASAKA S. (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae). J. Invertebr. Pathol., 50, 118-123.
- KE Z., XIE W., WANG X., LONG Q., PU Z. (1990) A monoclonal antibody of *Nosema bombycis*, its use for identification on microsporidian spores. J. Invertebr. Pathol., 56, 395-400.
- KURISU K. (1986) Simplified calculation of the operating characteristics in the pebrine, inspection of the grouping mother moths method. J. Sericult. Sci. Japan, 55, 351-352.
- NORDIN G.L., MADDOX J.V. (1974) Microsporidia of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. I. Identification, distribution and comparison of *Nosema* sp. with similar *Nosema* spp. from other Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol., 24, 1-13.
- PASTEUR L. (1870) Etudes sur la maladie des vers à soie. Gauthier Villars, Paris, Tome I, 322 pp., Tome II, 327 pp.
- QIAN Y., CAUO X., HU X. (1986) Distinguishing the pebrine spores, *Nosema bombycis*, of the mulberry silkworm by immunoenzymatic technique. Sci. Sericult., 72, 183-184.
- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H., FUJIWARA T. (1981) Sericological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm, *B. mori*, by an indirect fluorescent antibody technique. J. Sericult. Sci. Japan, 50, 180-184.
- SHARAN S.K., BANSAL A.K., SHUKLA R.M., THANGAVELU K. A new method of detection of pebrine disease in tasar silk moth, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). J. Res. Lepidoptera (in press).

NOUVELLE TECHNIQUE D'EVALUATION DE LA PÉBRINE DANS LES CENTRES DE GRAINAGE

A.K. BANSAL, N.N. SAXENA, R.M. SHUKLA, D.K. ROY, B.R.R.P. SINHA & S.S. SINHA

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

*L'estimation de l'infestation par la pébrine chez les cocons au moment de leur envoi dans les centres de grainage (unités de production des oeufs) est une étape importante de la sériciculture. Une nouvelle méthode a été mise au point pour l'estimation de l'infestation par la pébrine dans les centres de grainage par examen des testicules des chrysalides mâles. Cette méthode donne des résultats plus fiables car l'infestation s'avère beaucoup plus élevée dans les testicules et dans les ovaires que dans les autres tissus comme l'intestin, les tubes de Malpighi et le corps adipeux. Les résultats de cette méthode sont comparés avec ceux obtenus par la méthode conventionnelle et d'autres méthodes chez *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama* et *Bombyx mori*.*

INTRODUCTION

L'élevage du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury, subit des pertes considérables dues à la microsporidiose, une maladie protozoaire provoquée par *Nosema*. Outre la transmission par voie buccale, cette maladie se transmet par les voies ovariennes, c'est-à-dire de la mère à ses descendants par l'intermédiaire des oeufs. C'est un facteur de mortalité biologique majeur en sériciculture. Lorsque l'infestation est sévère, cette maladie provoque des pertes de récolte et un rendement en soie de qualité médiocre. Plusieurs méthodes ont été adoptées pour détecter les papillons infestés dans les centres de grainage (unités de production des oeufs). Pour les cocons destinés au grainage à l'échelle commerciale, on utilise la méthode de Pasteur (1870), c'est-à-dire l'examen des chrysalides au microscope. Cependant, du fait des teneurs élevées en graisse, il est souvent difficile d'évaluer le pourcentage réel de pébrine dans un lot donné, jusqu'à ce que ce lot s'avère fortement infesté. Il est donc impératif de mettre au point une méthode simple permettant d'évaluer de manière rapide et exacte l'infestation par la pébrine. Cette maladie se transmettant par les voies ovariennes, on a mis au point une méthode d'estimation par examen des testicules des chrysalides. Une expérience a été réalisée afin d'évaluer la pébrine par examen des testicules chez *Antheraea mylitta* Drury, *Antheraea assama* Westwood et *Bombyx mori* Linné, les trois principales variétés séricigènes d'Inde infestées par *Nosema*.

MATERIELS ET METHODES

Les cocons d'*A. mylitta*, d'*A. assama* et de *B. mori* destinés à cette expérience ont été conservés dans un centre de grainage. L'expérience a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessous.

1ère partie (A) :

Cent chrysalides mâles et 100 chrysalides femelles ont été prélevées au hasard sur 10 000 cocons d'*A. mylitta* (Fisher et Yates, 1963). Après dissection des chrysalides, les testicules, les ovaires, les tubes de Malpighi, le corps adipeux et l'intestin ont été broyés sur une lame dans une goutte de K_2CO_3 à 0,5 % et examinés au microscope. Lorsque les spores de *Nosema* (communément appelées spores de pébrine) sont présentes dans l'un de ces tissus, le matériel issu de la même chrysalide est dilué dans un volume fixé avec du K_2CO_3 à 5 % (1:5). Le nombre de spores a été compté sur un hémocytomètre Neubauer amélioré et enregistré.

1ère partie (B) :

Deux lots [B(1) et B(2)] comportant chacun 100 chrysalides (mâles et femelles mélangés) ont été prélevés au hasard et les chrysalides du lot B(1) ont été broyées séparément en masse et une goutte de ce broyat a été examinée en ajoutant une goutte de KOH à 2 % (méthode conventionnelle). Les chrysalides du deuxième lot, B(2), ont été broyées séparément dans du K_2CO_3 à 0,5 % et filtrées dans de la gaze. La solution obtenue a été centrifugée à 4 000 tours/mn pendant 5 minutes. Le culot a été dilué dans l'eau et une goutte a été examinée au microscope (méthode par centrifugation).

2ème partie (A) :

Juste avant le début du grainage, 1 500 cocons vivants ont été maintenus dans une cage grillagée. L'émergence journalière des mâles et des femelles a été enregistrée. La moitié inférieure de l'abdomen des papillons a été broyée dans du K_2CO_3 à 0,5 % et le broyat a été examiné au microscope. Le pourcentage d'infestation par la maladie a été calculé en fonction du sexe chez les papillons infestés.

2ème partie (B) :

Les cocons restants ont été conservés dans un centre de grainage séparés et les papillons émergés ont été accouplés. Après la ponte, les papillons femelles accouplés ont été broyés dans du K_2SO_3 et le broyat a été examiné. Le pourcentage d'infestation par la maladie a été calculé afin de déterminer le taux d'infestation par la pébrine.

Cette méthode a été répétée sur une quantité moins importante de cocons d'*A. assama* et de *B. mori*. Dans chaque cas, 1 000 cocons ont été maintenus dans le centre de grainage et 50 chrysalides ont été soumises à chacun des traitements de la première partie [A, B(1) et B(2)] de l'expérience. Deux cents cocons ont été utilisés pour la deuxième partie (A) de l'expérience et les cocons restant ont été utilisés pour la deuxième partie (B).

RESULTATS

Les données présentées dans le tableau I indiquent qu'il y a un écart important (d'un facteur 3) entre les résultats obtenus par la méthode conventionnelle d'examen des chrysalides (20 %) et ceux obtenus par l'examen réel des papillons (mâles : 66,9 % ; femelles : 61,2 % ; femelles accouplées : 72,9 %) chez *A. mylitta*. La prévision faite par examen des gonades (55 %) donne des résultats plus proches des résultats réels que la méthode conventionnelle. De plus, avant le début du grainage, les résultats obtenus par examen des gonades sont très proches de ceux obtenus par examen des chrysalides par centrifugation (60 %). Les résultats des examens des deux types de gonades (testicules et ovaires) sont comparables. Des observations similaires ont été faites chez *A. assama* et *B. mori*. Les données concernant la concentration des spores dans les différents tissus (Tableau II) indiquent clairement que la concentration est plus élevée dans les testicules (4.3×10^5) que dans les autres tissus sensibles.

DISCUSSION

Pour la préparation des pontes saines, les cocons sont achetés aux éleveurs/fermiers homologués ou dans les centres de reproduction des graines. Avant l'achat, un échantillon de chrysalide est testé par la méthode conventionnelle pour évaluer le taux d'infestation par la pébrine. Il est courant, chez les techniciens des centres de grainage, d'observer que le taux d'infestation par la pébrine est toujours plus élevé que celui estimé au moment de l'envoi des cocons au centre. Ceci montre que la méthode d'examen présente des lacunes. Outre celle de Pasteur (1870), plusieurs autres méthodes sont employées pour détecter la pébrine : l'encre de Chine (Geetha Bai et coll., 1985), le test des papillons secs (Kurusu, 1986), le dosage immunoenzymatique (ELISA) (Qian et coll., 1986 ; Kawarabata et Hayasaka, 1987 ; Sato et coll., 1981 ; Ke et coll., 1990), la technique des corps fluorescents indirects (Fujiwara et coll., 1966 ; Sato et coll., 1981 ; Huang et coll., 1983), la méthode d'agglutination en perles du latex (Hayasaka et Ayuzawa, 1987), le test d'antisérum de latex lié aux protéines A

(PALLAS) (Baig et coll., 192), l'examen des exuvies (Sharan et coll., sous presse). Parmi celles-ci, les dosages immunologiques sont les plus exacts et les plus fiables. Ces techniques, bien que sensibles, ne sont pas utilisées sur le terrain en raison de la complexité des tests. A l'heure actuelle, aucune méthode exacte n'est utilisée pour prévoir le pourcentage de maladie dans un lot donné de cocons avant qu'il ne soit vendu.

L'étude systématique des tissus infestés indique que les spores de *Nosema bombycis* atteignent les gonades en huit jours (Nordin et Maddox, 1974) chez les larves de *Bombyx mori* infestées par voie orale. Les spores de *Nosema* infestent *A. mylitta* en 8 à 9 jours lorsque la température se situe entre 30 et 35 °C. Les spores commencent à se multiplier dans la région intestinale et se propagent en 7 à 8 jours dans les tissus sensibles à l'infestation. Leur multiplication rapide dans l'intestin moyen et les gonades pourrait être due à la présence d'éléments nutritifs. Cependant, chez les chrysalides, l'intestin contient soit beaucoup moins de spores ($0,4 \times 10^5$), soit aucune spore. Hsu et coll. (1992) ont établi que le sperme de *Spodoptera litura* peut porter *Nosema* par transmission verticale. Ce phénomène n'a pas encore été observé chez *A. mylitta* (Griyaghey et Sengupta, 1988) bien que l'utilisation de papillons mâles infestés soit l'un des facteurs d'obtention de résultats médiocres pour la fécondité et le taux d'éclosion. Le pourcentage élevé d'infestation enregistré chez les femelles accouplées (72,9 %) par rapport aux femelles non accouplées (61,2 %) pourrait être dû à la transmission des spores par le sperme et le liquide séminal. De plus, le fait que le pourcentage d'infestation soit plus élevé chez les mâles (54,6 %) que chez les femelles (36,6 %) et chez les femelles accouplées (41,5 %) confirme nos observations.

Au vu de ces remarques et de l'exactitude des résultats obtenus, l'examen des testicules de chrysalides plutôt que des chrysalides entières est proposé comme méthode à peu près fiable de prédiction et/ou d'évaluation du pourcentage de maladie dans un lot donné. Cette méthode peut également permettre de préserver des chrysalides femelles saines pouvant ainsi être utilisées pour assurer l'approvisionnement en oeufs viables.

EFFECT OF VERTEBRATE SEX-HORMONES ON *BOMBYX MORI* L.

B.N. SAHA & A.R. KHAN*

Department of Zoology, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

The present paper reports the results of dietary administration of the vertebrate sex-hormones, ethynyl estradiol (EE) and norethindrone (NE), on the silkworm, Bombyx mori L. These hormones increased the larval weight. The female pupal and adult weights, and cocoon and shell weights were significantly increased. The larval and pupal periods were significantly reduced. The oviposition was enhanced at lower concentrations but the highest concentration (50 ppm of EE and 1250 ppm of NE) reduced the parameter. The hatchability of the eggs was drastically reduced at all the treatments. Hormone treatments enhanced all the growth indices in females. However, they produced deleterious effects on the male silkworms.

Keywords: Vertebrate sex-hormones, ethynyl estradiol, norethindrone, *Bombyx mori*, growth, development.

INTRODUCTION

Recently, the use of vertebrate hormones to enhance the commercial characters of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., has taken a great turn. Singh and Datta (1980) reported that the administration of cyclic AMP and prostaglandin E of fifth instar silkworm, *B. mori*, larvae resulted in enhanced pupal and cocoon weights. A topical application of prolactin on *B. mori* larvae accelerated growth, shortened larval duration and increased oviposition (Bhaskar *et al.*, 1983). Bharathi *et al.* (1983, 1986) noted enhanced larval growth, early pupation and increased cocoon weight following a pituitary extract treatment. Prostaglandin F₂ seemed to increase larval growth, advance pupation and increase silk yield in *B. mori* (Bharathi and Govindappa, 1987).

Very recently, Venkata Rami Reddy *et al.* (1994), for the first time, identified the titers of vertebrate steroid-like immunoreactive substances, i.e., testosterone, estradiol-17 β and progesterone in the haemolymph of *B. mori*. These authors opined that steroids in the silkworm might have some functions for the tissue biosynthetic activities.

The chief estrogenic hormone in the circulation and the most active form of the estrogens is estradiol, which is in metabolic equilibrium with the less active estrone. Ethynyl estradiol is a synthetic estrogen. It is 50 times as effective as water-soluble estrogenic preparation when taken orally and 30 times as effective as estradiol benzoate injected intramuscularly. Nowadays, many synthetic progestational agents have been devised that are much more effective biologically than progesterone when taken orally. Norethindrone is one of them.

The present communication deals with the effects of these vertebrate hormones on the growth and development of *B. mori*. Like progesterone, they have the ability to suppress ovulation for which they have found application in association with estrogens as oral contraceptives.

MATERIALS AND METHODS

The indigenous race Nistari of *B. mori* was used in the present experiment. Eggs were collected from mated females and incubated. Newly hatched larvae were reared on finely chopped white

* Corresponding author.

mulberry leaves (*Morus alba* L.) up to the second instar. The source of the hormones was the birth control pill Ovacon® containing 0.035 mg ethynyl estradiol and 0.5 mg norethindrone per tablet, manufactured by M/S Syntex Laboratories, USA. Various concentrations of the hormones were prepared by mixing the active ingredients of the tablets in distilled water. Silkworms were reared on the mulberry leaves dipped in these solutions from the first day of their third instar till the end of the feeding period. Three replicates of 50 larvae each were utilized for each treatment. Water-treated control larvae were identically maintained.

Observations were made on the weight of larvae, pupae and adults; cocoon characters like cocoon and shell weights, and shell ratio (%); larval and pupal durations; and reproductive potential, i.e. oviposition and hatchability (%). Various growth indices were computed using the formulae of Joshi (1985), Prasad and Bhattacharya (1975) and Desmukh *et al.* (1977).

The investigation was performed at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and $83.0 \pm 3.0\%$ RH.

RESULTS AND DISCUSSION

The results show that the larval weight of *B. mori* was significantly increased after the treatment with the hormones (Table I). It was interesting to note that hormone treatments significantly reduced the male pupal and adult weight but these significantly increased female pupal and adult weights.

Table I. Effect of ethynyl estradiol (EE) and norethindrone (NE) on the weight of *B. mori* (N = 30).

Tableau I. Effet de l'œstradiol éthyne (EE) et de la noréthindrone (NE) sur le poids de *B. mori* (N = 30).

Concentration (ppm)	Weight (mg) / Poids (mg)					
	Larvae Mean $\pm$ SD	Larval weight index	Pupae Mean $\pm$ SD	Pupal weight index	Adults Mean $\pm$ SD	Adult weight index
	<i>Larves</i> <i>Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Indice</i> <i>du poids</i> <i>larvaire</i>	<i>Chrysalides</i> <i>Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Indice</i> <i>du poids</i> <i>nymphal</i>	<i>Adultes</i> <i>Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Indice</i> <i>du poids</i> <i>adulte</i>
0 (control) (témoin)	1872.90 $\pm$ 125.82	1	705.45 $\pm$ 52.12 (865.48 $\pm$ 67.35)*	1 (1)	297.50 $\pm$ 32.25 (624.25 $\pm$ 74.62)	1 (1)
12.50 EE + 312.50 NE	2109.85 $\pm$ 135.56	1.1265	695.94 $\pm$ 62.12 (960.29 $\pm$ 59.03)	0.9865 (1.1095)	286.86 $\pm$ 38.52 (656.86 $\pm$ 61.48)	0.9642 (1.0522)
25.00 EE + 625.00 NE	2164.20 $\pm$ 142.71	1.1555	690.89 $\pm$ 43.18 (1000.71 $\pm$ 67.68)	0.9794 (1.1562)	274.25 $\pm$ 30.92 (670.35 $\pm$ 45.63)	0.9218 (1.0738)
50.00 EE + 1250.00 NE	2263.80 $\pm$ 121.56	1.2087	675.45 $\pm$ 42.12 (1050.87 $\pm$ 62.38)	0.9575 (1.2142)	248.33 $\pm$ 42.65 (740.50 $\pm$ 47.62)	0.9218 (1.1862)
F ratio Rapport F	20.61 (p < 0.001)	-	6.39 (p < 0.001) (13.68) (p < 0.001)	-	5.74 (p < 0.001) (20.13) (p < 0.001)	-

SD: Standard error / *Ecart type*.

* Figures in parentheses show corresponding values in females.

* Les chiffres entre parenthèse indiquent les valeurs correspondantes chez les femelles.

Treatments with hormones significantly reduced the male cocoon and shell weights. On the other hand, hormones significantly increased the female cocoon and shell weights (Table II). However, the administration of hormones produced no significant effect on the shell ratio (%).

Table II. Effect of ethynyl estradiol (EE) and norethindrone (NE) on the cocoon characters of *B. mori* (N = 30).

Tableau II. Effet de l'œstradiol éthyne (EE) et de la noréthindrone (NE) sur les caractères du cocon de B. mori (N = 30).

Concentration (ppm)	Character / Caractère			
	Cocoon weight (mg) Mean $\pm$ SD	Shell weight (mg) Mean $\pm$ SD	Shell ratio (%) Mean $\pm$ SD	Silk index
	Poids du cocon (mg) Moyenne $\pm$ SD	Poids de la coque (mg) Moyenne $\pm$ SD	Richesse soyeuse (%) Moyenne $\pm$ SD	Indice soyeux
0 (control) (témoin)	818.27 $\pm$ 79.52 (983.93 $\pm$ 86.01)	112.82 $\pm$ 14.56 (118.45 $\pm$ 17.28)	13.79 $\pm$ 1.25 (12.04 $\pm$ 1.70)	1 (1)
12.50 EE + 312.50 NE	806.83 $\pm$ 44.86 (1088.76 $\pm$ 55.25)	110.89 $\pm$ 12.99 (128.47 $\pm$ 11.71)	13.74 $\pm$ 1.99 (11.80 $\pm$ 1.84)	0.9829 (1.0846)
25.00 EE + 625.00 NE	799.65 $\pm$ 56.89 (1133.21 $\pm$ 69.11)	108.76 $\pm$ 14.01 (132.50 $\pm$ 15.03)	13.60 $\pm$ 0.95 (11.69 $\pm$ 1.48)	0.9640 (1.1186)
50.00 EE + 1250.00 NE	783.00 $\pm$ 45.17 (1190.14 $\pm$ 49.63)	100.55 $\pm$ 12.43 (139.27 $\pm$ 11.19)	13.73 $\pm$ 1.53 (11.70 $\pm$ 1.88)	0.9533 (1.1758)
F ratio Rapport F	6.49 (p < 0.05) (13.29) (p < 0.001)	6.8 (p < 0.001) (15.34) (p < 0.001)	1.85 (NS) 1.77 (NS)	

SD: Standard error / Ecart type. NS: Not significant / Non significatif.

Figures in parentheses show corresponding values in females.

Les chiffres entre parenthèse indiquent les valeurs correspondantes chez les femelles.

The effect of hormone supplementation was to significantly decrease the larval and pupal durations in *B. mori* (Table III). The lowest and highest developmental periods were recorded at 12.50 ppm EE + 312.50 ppm NE and 0 (control), respectively.

The oviposition by *B. mori* females was significantly enhanced following hormonal treatments up to 25.00 ppm EE + 625.00 ppm NE but it was reduced at the highest concentration (50.00 ppm EE + 1250.00 ppm NE) (Table IV). The hatchability of the eggs laid by the female moths resulting from the treated groups was drastically reduced and the effect was dose-dependent (Table IV). This parameter was reduced by 15.12, 21.42 and 25.27% over the controls at 12.50 ppm EE + 312.50 ppm NE, 25.00 ppm EE + 625.00 ppm NE and 50.00 ppm EE + 1250.00 ppm NE, respectively.

A perusal of data indicates that hormone administration increased the larval weight index. The hormones increased the female pupal and adult weight indices but their effect was the reverse in the case of the males. The female silk index was enhanced; however, that of the males was decreased. The larval-pupal index was decreased at all concentrations of the hormones. The oviposition index was increased at 12.50 ppm EE + 312.50 ppm NE and 25.00 ppm EE + 625.00 ppm NE but it was decreased at 50.00 ppm EE + 1250.00 ppm NE.

Table III. Effect of ethynyl estradiol (EE) and norethindrone (NE) on the developmental period (days).*Tableau III. Effet de l'œstradiol éthyne (EE) et de la noréthindrone (NE) sur la durée du développement (jours).*

Concentration (ppm)	Larval period Mean $\pm$ SD	Number of larvae	Pupal period Mean $\pm$ SD	Number of pupae	Total developmental period	Larval-pupal index
<i>Concentration (ppm)</i>	<i>Durée larvaire Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Nombre de larves</i>	<i>Durée nymphale Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Nombre de chrysalides</i>	<i>Durée totale du développement</i>	<i>Indice larves/chrysalides</i>
0 (control / témoin)	17.19 $\pm$ 0.47	134	10.19 $\pm$ 0.47	130	27.38	1
12.50 EE + 312.50 NE	15.35 $\pm$ 0.65	133	9.35 $\pm$ 0.65	131	24.70	0.9021
25.00 EE + 625.00 NE	16.29 $\pm$ 0.64	124	9.86 $\pm$ 0.58	121	26.15	0.9551
50.00 EE + 1250.00 NE	16.77 $\pm$ 0.90	146	10.15 $\pm$ 0.59	144	26.92	0.9832
<i>F ratio / Rapport F</i>	3.78 ($p < 0.05$)	-	3.26 ($p < 0.05$)	-	-	-

SD: Standard error / *Ecart type*.**Table IV.** Effect of ethynyl estradiol (EE) and norethindrone (NE) on the reproductive potential of *B. mori*.*Tableau IV. Effet de l'œstradiol éthyne (EE) et de la noréthindrone (NE) sur le potentiel de reproduction de B. mori.*

Concentration (ppm)	Fecundity Mean $\pm$ SD	Hatchability Mean $\pm$ SD	Number of eggs	Number of females	Oviposition index
<i>Concentration (ppm)</i>	<i>Fécondité Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Taux d'éclosion Moyenne $\pm$ SD</i>	<i>Nombre d'œufs</i>	<i>Nombre de femelles</i>	<i>Indice d'oviposition</i>
0 (control / témoin)	409.00 $\pm$ 45.75	96.73 $\pm$ 1.79	24540	60	1
12.50 EE + 312.50 NE	416.14 $\pm$ 49.14	81.61 $\pm$ 7.90	24968	60	1.0175
25.00 EE + 625.00 NE	436.40 $\pm$ 50.71	75.31 $\pm$ 4.47	26184	60	1.0670
50.00 EE + 1250.00 NE	381.40 $\pm$ 26.88	71.46 $\pm$ 4.50	22884	60	0.9325
<i>F ratio / Rapport F</i>	3.97 ($p < 0.05$)	25.21 ($p < 0.001$)			

SD: Standard error / *Ecart type*.

The administration of juvenile hormone increases the larval weight in *B. mori*, which results in a significant increase in cocoon and shell weights (Akai and Kobayashi, 1971; Akai *et al.*, 1971) and the treatments with juvenile hormone analogues (JHAs) increased the larval weight (Shimada *et al.*, 1979; Krishnaswami *et al.*, 1981); silk gland weight and its amino acid and nucleic acid contents

(Shigematsu, 1978; Wu *et al.*, 1978; Chen *et al.*, 1982); cocoon and shell weight (Aomori *et al.*, 1977; Kobari and Akai, 1978, 1979; Kamada *et al.*, 1985; Magadum and Hooli, 1989; Magadum *et al.*, 1993); and lengthened larval duration (Akai *et al.*, 1973; Kobari and Akai, 1978; Shigematsu, 1978; Kamada *et al.*, 1979; Shibukawa and Akai, 1981; Washida, 1984).

It has been reported that thyroxine increased body weight, cocoon weight and fecundity (Majumder and Medda, 1975; Medda *et al.*, 1980; Choudhuri and Medda, 1985, 1986; Magadum and Hooli, 1988; Thyagaraja *et al.*, 1991); and cocoon-shell ratio and fecundity (Thyagaraja *et al.*, 1985) in various races of *B. mori*. Magadum *et al.* (1992) recorded that the topical application of a JHA, Manta, followed by thyroxine significantly increased the larval period, larval weight, silk gland weight, male and female cocoon and shell weights and egg productivity in *B. mori*. However, there was a significant decrease in the cocooning and adult emergence following hormone treatments. The same authors observed that the treatment with thyroxine shortened the larval duration but increased the larval weight. Magadum and Hooli (1989) reported the effect of repeated treatment with Manta followed by insulin in improving silk production. Akai *et al.* (1988) obtained a cocoon as large as a hen's egg after administration of a high dose of JHA followed by ecdysteroid. Magadum *et al.* (1992) obtained increased female cocoon and shell weights following thyroxine treatment, which is also similar to the present result. Trivedy *et al.* (1993) recorded enhanced commercial characters in *B. mori* following treatments with the JHA, labomin. The increase in the silk contents due to hormone treatment might be due to the increase in silk protein synthesis, replication of DNA and accumulation of RNA in the silk gland (Akai *et al.*, 1971; Aomori *et al.*, 1977; Chen *et al.*, 1982).

It has been reported that estradiol-17 β stimulates the egg-specific proteins, vitellogenin, oocyte maturation and embryogenesis in the silkworm (Herbner *et al.*, 1983; Ohnishi *et al.*, 1985; Ogiso and Ohnishi, 1986).

Padki (1991) observed that insulin, thyroxine and adrenaline yielded higher cocoon weight in the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Boisd.) in comparison to controls. Kramer (1983) reported that the vertebrate insulin can affect lower forms of life physiologically in many ways, e.g., growth stimulation, lipid mobilization, uptake of sugars and cellular internalization and serves as a hormone of fuel storage.

A survey of the data clearly indicates that vertebrate sex-hormones have profound effects on the growth and development of *B. mori*. Unfortunately, very little attention has been paid on this field. Future works are very much to be solicited towards this direction.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors extend sincere thanks to the Chairman, Department of Zoology, Rajshahi University, for providing laboratory facilities.

REFERENCES

- AKAI H., KOBAYASHI M. (1971) Induction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 6, 1938-1939.
- AKAI H., KIUCHI K., MORI K. (1971) Increased accumulation of silk protein accompanying JH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 6, 218-220.
- AKAI H., KIUCHI K., MORI K. (1973) The influence of juvenile hormone on the growth and metamorphosis of *Bombyx mori* larvae. Bull. Sericult. Exp. Sta., 25, 287.
- AKAI H., MIMURA K., KIUCHI M., SHIBUKAWA A. (1985) Increase of silk production by repeated treatment with a juvenile hormone analogue. J. Sericult. Sci. Japan, 54, 297-299.
- AKAI H., TAKABAYASHI K., KIUCHI M. (1988) Induction of spinning from JH-treated eternal larvae of *Bombyx mori* by ecdysteroid administration. J. Sericult. Sci. Japan, 57(4), 341-344.
- AOMORI S., OZAWA Y., NISHIMURA M. (1977) Timely administration of synthetic compounds with juvenile hormone activity to silkworm larvae treated on an artificial diet. J. Sericult. Sci. Japan, 46, 287-305.

- BHARATHI D., GOVINDAPPA S. (1987) Effect of prostaglandin F2 on the growth pattern of silkworm larvae of *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 27, 355-358.
- BHARATHI D., BHASKAR M., REDDANNA P., GOVINDAPPA S. (1983) An attempt to improve the organic constituents in the body of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 24, 473-479.
- BHASKAR M., BHARATHI D., REDDANNA P., GOVINDAPPA S. (1983) Growth pattern of silkworm larvae, *Bombyx mori* L., on exposure to prolactin. *Indian J. Seric.*, 21-22, 33-35.
- BHARATHI D., BHASKAR M., REDDANNA P., GOVINDAPPA S. (1986) Effect of vertebrate pituitary extract administration on the organic constituents of the silkworm larvae, *Bombyx mori* (L.). *Indian J. Comp. Anim. Physiol.*, 4, 9-12.
- CHEN E.Y., FENG H., GUO F. (1982) Effect of juvenile hormone analogue on the protein content and development of silkgland in 5th instar silkworm. *Insect Knowledge*, 19, 25-28.
- CHOUDHURI A., MEDDA A.K. (1985) Growth stimulating effect of thyroxine on female and male silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Physiol. & Allied Sci.*
- CHOUDHURI A., MEDDA A.K. (1986) Changes in protein and nucleic acid content of male gonad of silkworm, *Bombyx mori* L., at different developmental stages after thyroxine treatment. *Proc. Nat. Acad. Sci. India*, 56B, 300-304.
- DESMUKH P.D., RATHORE Y.S., BHATTACHARYA A.K. (1977) Studies on growth and development of *Diacrisia obliqua* (Lep.: Arctiidae) on sixteen plant species. *Z. Ang. Ent.*, 84, 431-435.
- HERBNER G.H., FELDHOFF R.C., FONDA M.L. (1983) A correlated morphometric study of estrogen-induced vitellogenesis in male *Rana pipens*. *J. Ultrastruct. Res.*, 83(1), 28-42.
- JOSHI K.L. (1985) Studies on growth index for Eri silkmoth, *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 25(3), 313-319.
- KAMADA A., SHIMADA S., ASANO S. (1979) Studies on utilisation of methoprene, a synthetic compound with juvenile hormone activity, for silkworm rearing. I: Effect on the development of fifth instar larvae. *J. Sericult. Sci. Japan*, 48, 129-136.
- KOBARI Y., AKAI H. (1978) Utilization of Manta (synthetic compound with juvenile hormone activity) for the silkworm rearing. *J. Sericult. Sci. Japan*, 48, 37-42.
- KOBARI Y., AKAI H. (1979) On quantitative increase of silk production by the administration of juvenile hormone (Manta). *J. Sericult. Sci. Japan*, 49, 73-76.
- KRAMER K.J. (1983) Vertebrate hormone in insects. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (Ed. Kerkut G.A. and Gilbert L.I.). Vol. 7, pp. 511-535, Pergamon Press, Oxford.
- KRISHNASWAMI S., BENCHAMIN K.V., RAGHURAMAN R., GEETADEVI R.G. (1981) Studies on the effect of juvenile hormone analogue 2R512 in silkworm, *Bombyx mori* L., to improve silk yield. *Proc. Symp. Sem. Sericult., TNAU, Coimbatore*, pp. 124-129.
- KURATA K. (1981) Effect of application of juvenile hormone analogue on the silk production of silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 21(4), 323-332.
- MAGADUM S.B., HOOLI M.A. (1988) Effect of thyroxine on the polyvoltine silkworm, the Pure Mysore breed of *Bombyx mori* L. *Environ. Ecol.*, 6, 863-868.
- MAGADUM S.B., HOOLI M.A. (1989) Effect of Manta on the cocoon parameters in polyvoltine silkworm, Pure Mysore breed of *Bombyx mori*. *Environ. Ecol.*, 7, 833-837.
- MAGADUM S.B., HOOLI M.A., MAGADUM V.B. (1992) Effect of application of juvenile hormone analogue in IV instar followed by thyroxine in the Pure Mysore breed of *Bombyx mori* (L.). *Sericologia*, 32(3), 385-390.
- MAGADUM V.B., GOVINDAN R., MAGADUM S.B., SATENAHALLI S.B., NARAYANA SWAMY T.K. (1993) Influence of Manta on some commercial characters of Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval. *Bull. Sericult. Res.*, 4, 67-70.
- MAJUMDER A.C., MEDDA A.K. (1975) Studies on the thyroxine and vitamin B12 induced changes in the life cycle of silkworms. *Indian J. Physiol. and Allied Sci.*, 29, 1-13.
- MEDDA A.K., RAY A.K., DAS GUPTA A.K., MAJUMDER A.C., DEY C.D. (1980) In *Thyroid Research VIII*. *Proc. 8th Internat. Thyroid Changes*. (Ed. Stockigt J.R. and Nagati S.) p. 240, Australian Acad. Sci., Canberra.

- OGISO M., OHNISHI E. (1986) Does estradiol play a role in ovarian maturation or embryonic development of silkworm? *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61(1), 82-86.
- OHNISHI E., OGISO M., WAKABAYASHI K., FUGIMOTO Y., IKEKAWA N. (1985) Identification of estradiol in the ovaries of silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60(1), 35-38.
- PADKI P.R. (1991) Some aspects of physiology of the Eri silkworm, *Philosamia ricini*. Ph.D. thesis, Karnatak University, India, 247 pp.
- PRASAD J., BHATTACHARYA A.K. (1975) Growth and development of *Spodoptera littoralis* (Lep.: Noctuidae) on several plants. *Z. Ang. Ent.*, 79, 34-48.
- SHIGEMATSU H. (1978) The nature of juvenoid effects on growth and changes of protein, amino acids and nucleic acid content in silkworm, *Bombyx mori*, in the case of application of excessive dose. *J. Sericult. Sci. Japan*, 47, 292-300.
- SHIBUKAWA A., AKAI H. (1981) Effects of Manta on the silk production of a silkworm race producing heavy cocoon shells. *J. Sericult. Sci. Japan*, 50(2), 73-76.
- SHIMADA S., KAMADA A., ASANO S. (1979) Studies on the utilization of methoprene, a synthetic compound with juvenile hormone activity, for the silkworm rearing. II: An aspect of silk formation in the silkworm *Bombyx mori*, applied with methoprene examined by vital staining with thionine. *J. Sericult. Sci. Japan*, 48, 282-286.
- SINGH B.D., DATTA S. (1980) Effect of cyclic (C-AMP) and prostaglandin E on post embryonic development of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Entomol.*, 42, 197-201.
- TRIVEDI K., REMADEVI O.K., MAGADUM S.D., DATTA R.K. (1993) Effect of juvenile hormone analogue, labomin, on the growth and economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 32(2), 162-168.
- THYAGARAJA B.S., JOLLY M.S., DATTA R.K., MURTHY CUN (1985) Effect of thyroxine on silk improvement in *Bombyx mori*. *Indian J. Seric.*, 24, 77-82.
- THYAGARAJA B.S., KELLY T.J., MASLER E.P., BORKOVEC A.B. (1991) Thyroxine induced haemolymph protein and ecdysteroid increase in the silkworm, *Bombyx mori*. Effect on larval growth and silk production. *J. Insect Physiol.*, 37(2), 153-159.
- VENKATA RAMI REDDY K., MAGADUM S.B., MEERA V., DATTA R.K. (1994) Metabolic significance of vertebrate-type steroids in silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 33(1), 6-11.
- WASHIDA S. (1984) Influence of juvenile hormone analogues applied at fourth instar on larval growth and cocoon weight in *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 53, 210-215.
- WU T.N., HU C.Y., QUO F. (1978) Effect of juvenile hormone analogue on the nucleic acid metabolism in the posterior silk gland in silkworm, *Bombyx mori* L. *Acta Entomologica Sinica*, 21, 290-296.

EFFET DES HORMONES SEXUELLES DE VERTEBRES CHEZ *BOMBYX MORI* L.

B.N. SAHA & A.R. KHAN*

Department of Zoology, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

*Cet article présente les effets de l'administration par voie orale d'œstradiol éthinyl (EE) et de noréthindrone (NE), hormones sexuelles de vertébrés, chez le ver à soie **Bombyx mori** L. Ces hormones donnent une augmentation du poids larvaire. Le poids des chrysalides, des adultes, des cocons et des coques augmente de manière significative chez les femelles. Les durées larvaire et nymphale diminuent de manière significative. Le taux d'oviposition s'améliore avec de faibles concentrations mais la concentration maximale (50 ppm EE + 1 250 ppm NE) entraîne une dégradation de ce paramètre. Le taux d'éclosion des œufs chute chez tous les traitements. Le traitement hormonal améliore tous les indices de croissance chez les femelles ; cependant, il a des effets négatifs chez les mâles.*

INTRODUCTION

L'utilisation des hormones de vertébrés pour l'amélioration des caractères commerciaux du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L., a récemment pris beaucoup d'importance. Singh et Datta (1980) ont observé que l'administration d'AMP cyclique et de prostaglandine E chez des larves du cinquième âge de *Bombyx mori* se traduisait par une amélioration du poids du cocon et de la chrysalide. L'application topique de prolactine sur les larves de *B. mori* accélère la croissance, réduit la durée larvaire et augmente l'oviposition (Bhaskar et coll., 1983). Bharathi et coll. (1983, 1986) ont observé une amélioration de la croissance larvaire, une nymphose précoce et une augmentation du poids du cocon après traitement avec un extrait d'hypophyse. Il semble que la prostaglandine F2 permette d'améliorer la croissance larvaire, d'avancer la nymphose et d'augmenter le rendement en soie chez *B. mori* (Bharathi et Govindappa, 1987).

Plus récemment, Venkata Rami Reddy et coll. (1994) ont identifié pour la première fois des substances immunoréactives analogues aux stéroïdes de vertébrés (testostérone, 17β œstradiol et progestérone) dans l'hémolymphe de *B. mori*. Ces auteurs estiment que les stéroïdes pourraient jouer un rôle dans les activités de biosynthèse des tissus chez le ver à soie.

La principale hormone œstrogénique dans la circulation et la forme la plus active d'œstrogène est l'œstradiol qui est en équilibre métabolique avec l'œstrone, moins actif. L'œstradiol éthinyl est un œstrogène de synthèse ; il est 50 fois plus efficace sous forme œstrogénique soluble dans l'eau lorsqu'il est administré par voie orale et 30 fois plus efficace que le benzoate d'œstradiol injecté par voie intramusculaire. A l'heure actuelle, il existe de nombreux agents progestatifs de synthèse qui sont beaucoup plus efficaces sur le plan biologique que la progestérone lorsqu'ils sont administrés par voie orale. La noréthindrone est l'un de ces agents.

Cet article traite des effets de ces hormones de vertébrés sur la croissance et le développement de *B. mori*. De même que la progestérone, elles ont la propriété de supprimer l'ovulation, propriété mise en application par association avec les œstrogènes comme contraceptifs oraux.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

La race indigène Nistari de *B. mori* a été utilisée dans cette étude. Les oeufs, issus de femelles accouplées, ont été incubés. Après l'éclosion, les larves ont été élevées sur des feuilles de mûrier blanc (*Morus alba* L.) finement hachées jusqu'au deuxième âge. La source d'hormone est la pilule contraceptive Ovacon® contenant 0,035 mg d'œstradiol éthinyl et 0,5 mg de noréthindrone par comprimé (M/S Syntex Laboratories, États-Unis). Différentes concentrations d'hormones ont été préparées en mélangeant la matière active des comprimés dans de l'eau distillée. Les vers à soie ont été nourris avec des feuilles de mûrier trempées dans ces solutions à partir du premier jour du troisième âge jusqu'à la fin de la période de nourrissage. Trois répétitions de 50 larves ont été utilisées pour chaque traitement. Des larves traitées à l'eau distillée ont été utilisées comme lot témoin.

Les observations portent sur le poids des larves, des chrysalides et des adultes, certains caractères du cocon comme le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, les durées larvaire et nymphale et le potentiel de reproduction, c'est-à-dire l'oviposition et le taux d'éclosion. Différents indices de croissance ont été calculés selon les formules de Joshi (1985), Prasad et Bhattacharya (1975) et Desmukh et coll. (1977).

Les expériences ont été effectuées à 30 ± 1 °C et $83,0 \pm 3,0$ % d'humidité relative.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que le poids larvaire de *B. mori* augmente de manière significative après traitement hormonal (Tableau I). Il est intéressant de noter que les traitements hormonaux entraînent une réduction significative des poids de l'adulte et de la chrysalide chez les mâles mais une augmentation significative de ces paramètres chez les femelles.

Les traitements hormonaux donnent une diminution significative des poids du cocon et de la coque chez les mâles mais une augmentation significative de ces caractères chez les femelles (Tableau II). Cependant, l'administration d'hormones n'a pas d'effet significatif sur la richesse soyeuse.

L'addition d'hormones a pour effet de réduire les durées larvaire et nymphale chez *B. mori* (Tableau III). La durée du développement est minimale pour le traitement à 12,50 ppm EE + 312,50 ppm NE et maximale pour le traitement 0 (témoin).

L'oviposition des femelles de *B. mori* augmente de manière significative avec les traitements hormonaux jusqu'à la concentration de 25 ppm EE + 625 ppm NE mais diminue à la concentration maximale (50 ppm EE + 1 250 ppm NE) (Tableau IV). Le taux d'éclosion des oeufs pondus par les papillons femelles issus des groupes traités diminue fortement, cet effet est lié à la dose (Tableau IV). Par rapport au témoin, ce paramètre diminue de 15,12, 21,42 et 25,27 % respectivement pour les concentrations de 12,50 ppm EE + 312,50 ppm NE, 25 ppm EE + 625 ppm NE et 50 ppm EE + 1250 ppm NE.

La lecture des données révèle que l'administration d'hormones entraîne une augmentation de l'indice du poids larvaire. Les traitements hormonaux donnent une augmentation des indices de poids adulte et nymphal chez les femelles mais leurs effets sont inverses chez les mâles. L'indice de soie des femelles augmente tandis que celui des mâles diminue. L'indice larve-chrysalide diminue quelle que soit la concentration hormonale. L'indice d'oviposition augmente aux concentrations de 12,50 ppm EE + 312,50 ppm NE et 25 ppm EE + 625 ppm NE mais diminue à la concentration de 50 ppm EE + 1 250 ppm NE.

L'administration d'hormone juvénile donne une augmentation du poids larvaire chez *B. mori* ; ce qui se traduit par une augmentation significative des poids du cocon et de la coque (Akai et Kobayashi, 1971 ; Akai et coll., 1971) et les traitements utilisant des analogues d'hormones juvéniles donnent une augmentation du poids larvaire (Shimada et coll., 1979 ; Krishnaswami et coll., 1981), du poids de la glande séricigène et de sa teneur en acides aminés et nucléiques (Shigematsu, 1978 ; Wu et coll., 1978 ; Chen et coll., 1982), des poids du cocon et de la coque (Aomori et coll., 1977 ; Kobari et Akai, 1978, 1979 ; Kamada et coll., 1979 ; Krishnaswami et coll., 1981 ; Kurata, 1981 ; Akai et coll., 1985 ; Magadum et Hooli, 1989 ; Magadum et coll., 1993) ainsi qu'un allongement de

la durée larvaire (Akai et coll., 1973 ; Kobari et Akai, 1978 ; Shigematsu, 1978 ; Kamada et coll., 1979 ; Shibukawa et Akai, 1981 ; Washida, 1984).

La thyroxine entraîne une augmentation du poids du corps, du poids du cocon et de la fécondité (Majumder et Medda, 1975 ; Medda et coll., 1980 ; Choudhuri et Medda, 1985, 1986 ; Magadum et Hooli, 1988 ; Thyagaraja et coll., 1991) ainsi que de la richesse soyeuse et de la fécondité (Thyagaraja et coll., 1985) chez différentes races de *B. mori*. Magadum et coll. (1992) ont observé que l'application topique d'un analogue d'hormone juvénile, Manta, suivie de l'administration de thyroxine entraîne une augmentation significative de la période larvaire, du poids larvaire, du poids de la glande séricigène, des poids du cocon et de la coque chez les mâles et les femelles ainsi que du rendement en oeufs chez *B. mori*. Cependant, les traitements à base d'hormones entraînent une diminution significative du filage et de l'émergence des adultes. Ces auteurs ont également observé que le traitement à la thyroxine permet de réduire la durée larvaire mais donne une augmentation du poids larvaire. Magadum et Hooli (1989) ont observé que l'administration répétée de Manta puis d'insuline améliorent la production de soie. Akai et coll. (1988) ont obtenu des cocons de la taille d'un oeuf de poule après administration d'une dose élevée d'analogue d'hormone juvénile puis d'ecdystéroïdes. Magadum et coll. (1992) ont obtenu une augmentation des poids du cocon et de la coque chez les femelles après traitement à la thyroxine, ce qui corrobore les résultats présentés ici. Trivedy et coll. (1993) ont observé une amélioration des caractères commerciaux chez *B. mori* après traitement avec l'analogue d'hormone juvénile Labomine. L'augmentation des teneurs en soie après traitement hormonal pourrait être due à l'augmentation de la synthèse des protéines de soie, du taux de réplication de l'ADN et à l'accumulation d'ARN dans la glande séricigène (Akai et coll., 1971 ; Aomori et coll., 1977 ; Chen et coll., 1982).

La 17β œstradiol stimule les protéines spécifiques des oeufs, la vitellogénine, la maturation des ovocytes et l'embryogenèse chez le ver à soie (Ohnishi et coll., 1985 ; Ogiso et Ohnishi, 1986).

Padki (1991) a observé que l'insuline, la thyroxine et l'adrénaline donnaient une augmentation du poids du cocon chez le ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* (Boisd.) par rapport aux lots témoins. Kramer (1983) a observé que l'insuline de vertébré peut affecter des formes de vie inférieures au niveau physiologique et de plusieurs manières (stimulation de la croissance, mobilisation des lipides, absorption de sucres et internalisation des cellules) et sert d'hormone de stockage d'énergie.

La lecture des données indique clairement que les hormones sexuelles de vertébrés ont des effets prononcés sur la croissance et le développement de *B. mori*. Malheureusement, peu d'études ont été faites dans ce domaine. Des travaux sont donc fortement nécessaires dans cette voie.

STUDIES ON TREHALASE AND TREHALOSE IN THE FAT BODY, HAEMOLYMPH, SILK GLAND AND HEAD REGION OF THE MUGA SILKWORM, *ANTHRAEA ASSAMA*, DURING THE SPINNING PERIOD

B.G. UNNI*, A. CHOUDHURY, D. KHANIKOR & A.C. GHOSH

Biochemistry Department (Silkworm Biochemistry and Endocrinology), Regional Research Laboratory (CSIR), Jorhat 785006, Assam, India.

*The variation of trehalase activity and trehalose content in the haemolymph, silk gland, fat body and head region of the silkworm, **Anthraea assama**, during the spinning period (12 hr intervals) was studied and compared. Among the tissues, the silk gland, fat body and haemolymph trehalase exhibited an enhanced level of activity during the early part of the spinning (0-48 hr) and attained a low level during the latter part of the spinning. During the spinning period (36 hr) a higher level of activity was demonstrated in the head region. This medium level of trehalase activity was slightly higher in comparison to other tissues and was maintained. Trehalose concentration varied from 0.15 to 1.50 mg/gram in the fat body, haemolymph, silk gland and head region. The accumulation of trehalose was low during the early part of the spinning and reached a maximum until completion of the spinning.*

Keywords: *Anthraea assama*, trehalose, trehalase, spinning period.

INTRODUCTION

Trehalose, a non-reducing disaccharide, has been proved to be the major blood carbohydrate of insects and is hydrolysed to two glucose molecules by the enzyme trehalase (EC 3.2.1.28). Trehalase is one of the most important carbohydrases in insects, occurring in the gut, flight muscles, fat bodies, labial glands, haemolymph and also in the silk gland of silkworms. It degrades trehalose to glucose for internal energy supply for the synthesis of chitin, muscular activity during flight, cocoon formation and other metabolic purposes. Trehalose content and trehalase activity vary according to the method of preparation, types of tissues used and the species sources (Zabe and McShan, 1959; Gilby *et al.*, 1967). Intensive studies on disaccharides and their hydrolysis have been carried out on several insects, including the silkworms, *Philosamia ricini* and *Bombyx mori* (Pant and Morris, 1974; Saito, 1960; Unni and Pant, 1985). Unlike other silkworms, very little information on the biochemical aspects of the muga silkworm has been reported. In view of the above reasons, it was considered worthwhile to study the comparative variation in the activity of trehalase and trehalose in the tissues of the silkworm, *Anthraea assama*, during the spinning period (0 hr to 72 hr) at 12 hr intervals. The spinning period is completed in three to four days.

MATERIALS AND METHODS

Insects:

The fifth instar healthy larvae of *A. assama* for the experiments were collected from the Muga Seed Supply Station, Ladohigarh, and then reared at the Regional Research Laboratory on Som plants (*Machilus bombycina*) following conventional methods (Choudhury, 1981).

* To whom correspondence should be addressed.

Preparation of tissue homogenates:

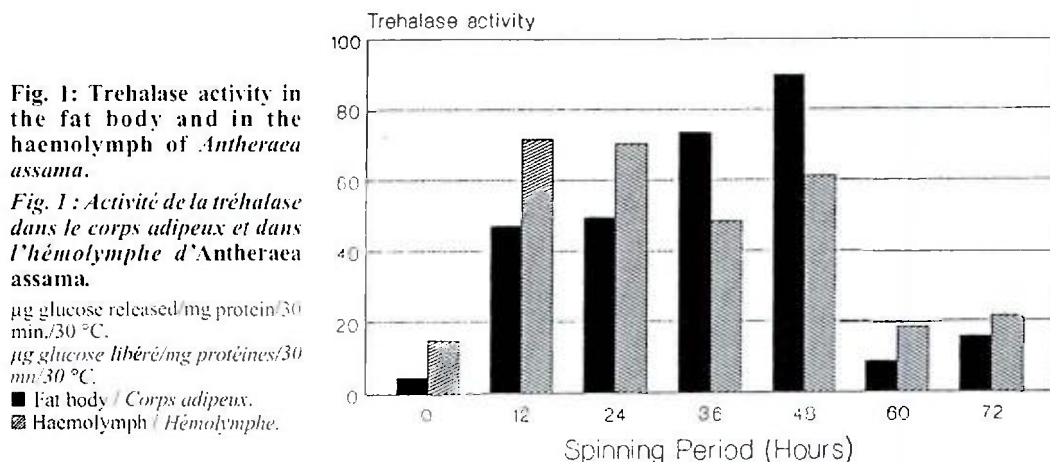
Tissue homogenates of larvae (spinning stage) and prepupae were made as described by Pant and Morris (1972). Larval haemolymph samples were collected according to Unni and Pant (1984).

Method of enzyme assay:

The trehalase activity was assayed as described by Dahlqvist (1960) and Derr and Randall (1966) by estimating the rate of trehalose hydrolysis. Trehalose was estimated by the method of Wyatt and Kalf (1956). Experiments with the insects were started at 0 hr spinning stage, continued up to 72 hr at 12 hr intervals. Trehalase activity was expressed as microgram glucose released per mg protein under assay conditions. The trehalose content was expressed as mg trehalose per gram fresh tissue/ml haemolymph. The protein concentration of the enzyme extract was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951). Assays were made in duplicates and repeated over, employing 5 to 10 insects in each time.

RESULTS

The variations of trehalase activities and trehalose concentration in the fat body, haemolymph, silk gland and head region of *A. assama* are shown in Fig.'s 1 to 4. There was a continuous increase in trehalase activity in the fat body and in the haemolymph from 0 hr spinning (Fig. 1), trehalase activity reached maximum at 48 hr stage and then declined sharply during the remaining part of the spinning period.



There was a gradual increase in the silk gland enzyme activity (Fig. 2) during the early period of the spinning, the enzyme activity was highest during the later part of the spinning (48 hr). The head region during the 36 hr and 48 hr stages exhibited a considerably high trehalase activity. The low level of trehalase in the fat body, haemolymph, silk gland and head region during the early hours of spinning began to increase until completion of the spinning (Fig.'s 3 and 4).

DISCUSSION

The presence of trehalase in insects is of great interest because the metabolic sugar, trehalose, is the principal sugar of almost all insects studied so far, with the remarkable exception of the larvae of

Fig. 2: Trehalase activity in the silk gland and in the head region of *Antheraea assama*.

*Fig. 2 : Activité de la tréhalase dans la glande séricigène et dans la région céphalique d'*Antheraea assama*.*

µg glucose released/mg protein/30 min./30 °C.

µg glucose libéré/mg protéines/30 mn/30 °C.

■ Silk gland / Glande séricigène.
▨ Head region / Région céphalique.

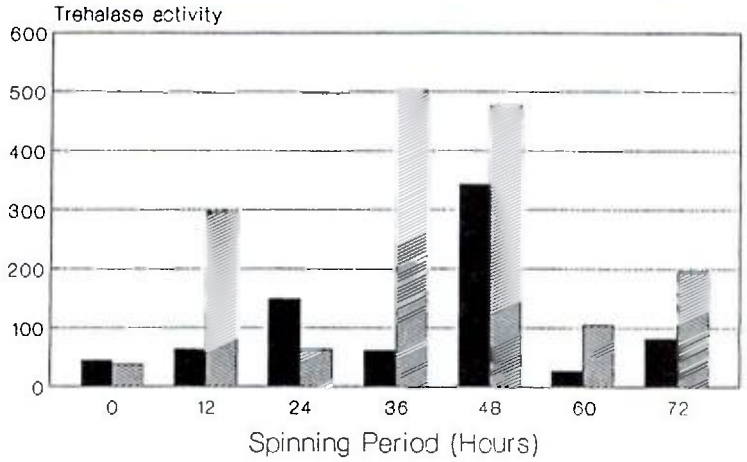


Fig. 3: Distribution of trehalose in the haemolymph and head region of *A. assama*.

*Fig. 3 : Répartition du tréhalose dans l'hémolymph et dans la région céphalique d'*A. assama*.*

µg/ml and mg/g fresh tissue.

µg/ml et mg/g tissu frais.

■ Haemolymph / Hémolymphé.
▨ Head region / Région céphalique.

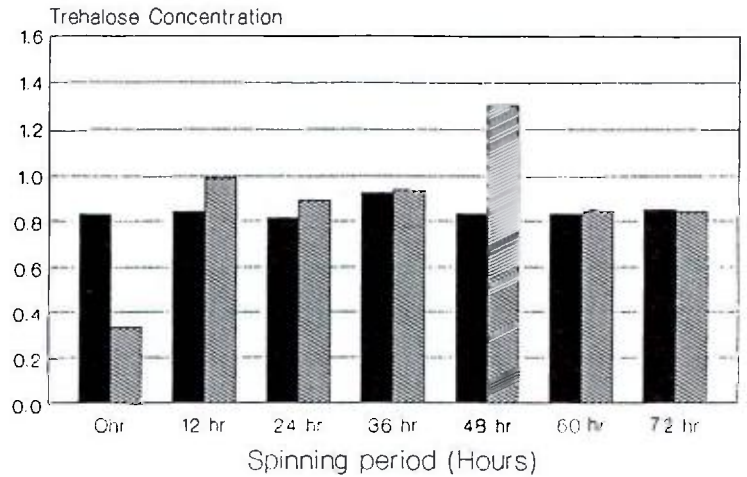
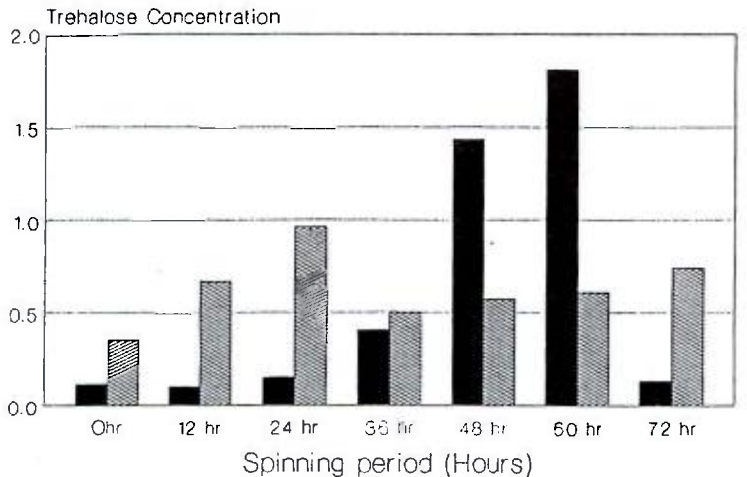


Fig. 4: Distribution of trehalose in the silk gland and fat body of *A. assama*.

*Fig. 4 : Répartition du tréhalose dans la glande séricigène et dans le corps adipeux d'*A. assama*.*

mg/g fresh tissue / mg/g tissu frais.

■ Silk gland / Glande séricigène.
▨ Fat body / Corps adipeux.



Phormia regina and *Agaria affinis* (Florkin and Jeuniaux, 1974). The presence of trehalase in the haemolymph and fat body (Howden and Kilby, 1956) and other tissues in insects, including the silkworms, *Bombyx mori* and *Philosamia ricini* (Pant and Morris, 1972; Unni, 1991), has been reported. Sufficient evidence has been accumulated, suggesting that the fall in the blood trehalose level during muscular activity or starvation is due to the ready availability of trehalose as an immediate carbohydrate reserve (Saito, 1960; Clegg and Evans, 1961). Amongst the tissues studied so far, the silkworm's fat body is found to be the major organ for trehalose biosynthesis (Candy and Kilby, 1961). An elevated activity until 48 hr stage of spinning and then a decrease suggest that the trehalase of the fat body provides a substrate to glycogen synthesis, which indirectly provides energy during the spinning of the larvae of *A. assama*. In the silk gland, the trehalase activity was found to be the highest (89.6 µg and 342.3 µg glucose/mg protein) at 36 and 48 hr stages and the corresponding trehalose content was 0.57 mg and 1.43 mg/g, respectively. The trehalose content in the silk gland of *B. mori* (Shimada, 1975; Shimada *et al.*, 1980) increases along with the growth of the silk gland and reaches the maximum level just before cocoon spinning and then decreases with the histolysis of the glands. Our observation in the silk gland of *A. assama* is very much in the same line as their finding. This result suggests that the trehalose during the pre-spinning stage is utilised either for growth, or for maintenance of the gland and in the latter part used for the formation of cocoon or any other metabolic purpose.

A. assama haemolymph was observed to maintain more or less the same level of trehalase activity until the 48 hr stage of spinning and then decreased. The trehalose content was high and maintained the same level during the entire spinning period (0 hr to 72 hr). The higher concentration of trehalose in the haemolymph may be due to the release of trehalose as a result of histolysis of various tissues or release from the fat body. It was reported that trehalose diffuses from the haemolymph according to the concentration into the gut, and then degrades into glucose to meet the energy needs (Jabbar and Mohamed, 1990). The trehalase activity and trehalose concentration in the head region exhibit a high level all through the spinning in comparison to other tissues. The highest trehalase activity was recorded at 36 hr stage and then slightly declined and maintained a low level during the 60 and 72 hr stages of spinning. The high activity of trehalase during the spinning period may be due to probable activation of trehalase by some factors present in the neurosecretory cells of the brain. In 1961, Steele reported that the corpora cardiaca extract increases the trehalose level in the haemolymph of the American cockroach. Recently, a neurohormone called hypertrehalosemic has been isolated from the whole head of the adult cockroach, *Blaberus discoidalis*, which mobilises the trehalose from the fat body glycogen store. It also stimulates protein synthesis in the fat body (Allison *et al.* 1993). The rate at which trehalose is utilised has been observed to be almost the same as that at which it is synthesised and secreted. Trehalose and trehalase play a very important role in regulating the blood sugar level, glycogen synthesis in the fat body, larval-pupal transformation, and other physiological and functional properties of the silk gland.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Director for permission to publish this article. We thank the referee (unknown to us) for very critically reviewing this manuscript. Part of the research work is financed by the Department of Biotechnology and Central Silk Board, Govt of India.

REFERENCES

- CANDY D.J., KILBY B.A. (1961) *Biochem. J.*, 78, 531-536.
- CHOUDHURY S.N. (1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt of Assam, Gauhati.
- CLEGG J.S., EVANS D.R. (1961) *J. Exp. Biol.*, 38, 771.
- DAHLQVIST A. (1960) *Acta Chem. Scand.*, 14, 9.
- DERR R.F., RANDALL D.D. (1966) Trehalase of the differential grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *J. Insect Physiol.*, 12, 1105-1114.

- DUCHATEAU BOSSON G.C., JEUNIAUX C., FLORKIN M.M. (1963) Contribution à la biochimie du ver à soie. XXVII. Tréhalose, tréhalase et mue. Arch. Insect Physiol. Biochem., 71, 556-576.
- FLORKIN M., JEUNIAUX C. (1974) Haemolymph composition. In The Physiology of Insecta. Rockstein (Ed.), Vol. 5, pp. 256-360. Academic Press, New York.
- GILBY A.R., WYATT S.S., WYATT G.R. (1967) Trehalase from the cockroach, *Blaberus discoidalis*: activation, solubilization and properties of intestinal enzymes. Acta Biochem. Polson, 14, 83-120.
- HOWDEN C.F., KILBY B.A. (1956) Chem. Ind., 1453.
- JABBAR U.A.T., MOHAMED U.V.K. (1990) Properties and developmental changes in occurrence of trehalase in the digestive system of immature stages of *Orthoga exvinacea*. Acta Entomol. Bohemoslov., 87, 176-181.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FERR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- PANT R., MORRIS I.D. (1972) Variation in glycogen, total sugars, protein, alkaline and acid phosphatases, citrate and inorganic phosphorus levels in fat body of *P. ricini* during development. J. Biochem., Tokyo, 71, 1-8.
- PANT R., MORRIS I.D. (1974) Variation in trehalase activity in the fat body, haemolymph of *P. ricini* (Eri silkworm) during development. Experientia, 30, 145-146.
- SAITO S. (1960) Trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and properties of the enzyme. J. Biochem., Tokyo, 48, 101-109.
- SHIMADA S. (1975) Trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *B. mori*. Can. Ent., 107, 1311-1314.
- SHIMADA S., MASARU K., KAMADA A., SHOJI A. (1980) Trehalose in the silk glands of the silkworm, *B. mori*. Insect Biochem., 10, 175-177.
- STEELE J.E. (1961) Nature, 192, 680-681.
- STREY A., HAYES T.K., ELWYN I.R. (1993) Metabolism of insect hypertrehalosemic hormones in *Blaberus discoidalis* cockroaches. Biochem. Soc. Trans., 21, 224 S.
- UNNI B.G., PANT R. (1984) Variation in tyrosine transaminase activity in the haemolymph of *P. ricini* during fifth instar development and spinning period. Proceed. 3rd Orient. Entomol. Symp., University of Kerala, Trivandrum, 2, 27-30.
- UNNI B.G., PANT R. (1985) Photoperiodic response on the silk gland of *P. ricini* during fifth instar development and spinning period. Indian J. Comp. Anim. Physiol., 3(1), 33-42.
- UNNI B.G. (1991) Trehalose — The insect blood sugar. Adv. Biosci., 10, 27-32.
- WYATT G.R., KALF G.F. (1956) Fed. Proceed., 15, 388.
- ZABE E.C., McSHAN W.H. (1959) Trehalase in the thoracic muscles of the woodroach, *Leucophaea maderae*. J. Cell Comp. Physiol., 53, 21-29.

ETUDE SUR LA TREHALASE ET LE TREHALOSE DANS LE CORPS ADIPEUX, L'HEMOLYMPHE, LA GLANDE SERICIGENE ET LA REGION CEPHALIQUE CHEZ LE VER A SOIE MUGA, *ANTHERAEA ASSAMA*, PENDANT LA PERIODE DE FILAGE

B.G. UNNI*, A. CHOUDHURY, D. KHANIKOR & A.C. GHOSH

Biochemistry Department (Silkworm Biochemistry and Endocrinology), Regional Research Laboratory (CSIR), Jorhat 785006, Assam, Inde.

*On a étudié et comparé les variations de l'activité tréhalase et de la teneur en tréhalose dans l'hémolymph, la glande séricigène, le corps adipeux et la région céphalique chez le ver à soie *Antheraea assama* pendant la période de filage (à intervalles de 12 heures). L'activité tréhalase dans la glande séricigène, le corps adipeux et l'hémolymph présente une augmentation au début du filage (de 0 à 48 heures) et atteint un faible niveau au cours de la période finale. Au cours de la période de filage (36 heures), on observe une augmentation de l'activité dans la région céphalique. Ce niveau moyen d'activité tréhalase est légèrement supérieur à celui observé dans les autres tissus et est stable. La teneur en tréhalose varie de 0,15 à 1,50 mg/g dans le corps adipeux, l'hémolymph, la glande séricigène et la région céphalique. L'accumulation de tréhalose est faible au début du filage et atteint un niveau maximal jusqu'à la fin du filage.*

INTRODUCTION

Il a été démontré que le tréhalose, disaccharide non réducteur, est un hydrate de carbone sanguin majeur des insectes et est hydrolysé sous la forme de deux molécules de glucose par la tréhalase (EC 3.2.1.28). La tréhalase est l'une des carbohydrases les plus importantes des insectes et est présente dans l'intestin, les muscles alaires, le corps adipeux, les glandes labiales, l'hémolymph et la glande séricigène du ver à soie. Elle dégrade le tréhalose en glucose pour fournir de l'énergie lors de la synthèse de chitine, l'activité musculaire au cours du vol ou lors de la formation du cocon et pour d'autres activités métaboliques. La teneur en tréhalose et l'activité tréhalase varient suivant le mode de préparation, les types de tissus utilisés et les espèces sources (Zabe et McShan, 1959 ; Gilby et coll., 1967). Des études approfondies sur les disaccharides et leur hydrolyse ont été réalisées chez plusieurs insectes, dont les vers à soie *Philosamia ricini* et *Bombyx mori* (Pant et Morris, 1974 ; Saito, 1960 ; Unni et Pant, 1985). En revanche, on dispose de très peu d'informations sur les aspects biochimiques du ver à soie muga. Au vu de ces remarques, on a jugé utile d'effectuer une étude comparative de la variation de l'activité tréhalase et de la teneur en tréhalose dans les tissus du ver à soie *Antheraea assama* au cours de la période de filage (0 à 72 heures) à intervalles de 12 heures. La période de filage dure trois à quatre jours.

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

Les larves saines du cinquième âge d'*A. assama* utilisées dans cette expérience proviennent de la *Muga Seed Supply Station* de Ladohigarh. Elles ont été élevées au campus du *Regional Research*

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

Laboratory sur des plants de Som (*Machilus bombycina*) suivant les méthodes conventionnelles (Choudhury, 1981).

Préparation des broyats tissulaires :

Les broyats tissulaires des larves (stade de filage) et des pré-chrysalides ont été préparés selon la méthode de Pant et Morris (1972). Les échantillons d'hémolymphe larvaire ont été prélevés selon le protocole d'Unni et Pant (1984).

Dosage enzymatique :

L'activité tréhalase a été mesurée selon les méthodes de Dahlqvist (1960) et de Derr et Randall (1966) en estimant le taux d'hydrolyse du tréhalose. Le tréhalose a été évalué selon la méthode de Wyatt et Kall (1956). Les expériences sur les insectes ont été démarrées à l'heure 0 du stade de filage et poursuivies jusqu'à 72 heures à intervalles de 12 heures. L'activité tréhalase a été exprimée en microgrammes de glucose libéré par mg de protéines dans les conditions du dosage. La teneur en tréhalose a été exprimée en mg de tréhalose par gramme de tissu frais ou par ml d'hémolymphe. La concentration en protéines de l'extrait enzymatique a été déterminée suivant la méthode de Lowry et coll. (1951). Les dosages ont été réalisés en double et ont été répétés sur 5 à 10 insectes chaque fois.

RESULTATS

Les variations de l'activité tréhalase et de la teneur en tréhalose dans le corps adipeux, l'hémolymphe, la glande séricigène et la région céphalique d'*A. assama* sont présentées dans les figures 1 à 4. L'activité tréhalase dans le corps adipeux et dans l'hémolymphe augmente de manière régulière à partir de l'heure 0 du filage (Fig. 1), elle atteint son niveau maximal à 48 heures et diminue de manière marquée pendant la dernière partie du filage.

L'activité enzymatique dans la glande séricigène augmente progressivement au début du stade de filage (Fig. 2) et atteint son niveau maximal dans la deuxième partie du filage (48 heures). La région céphalique présente une activité tréhalase excessivement élevée à 38 heures et à 48 heures. La teneur en tréhalose, faible dans le corps adipeux, l'hémolymphe, la glande séricigène et la région céphalique au début du filage, va croissante jusqu'à la fin du filage (Fig. 3 et 4).

DISCUSSION

La présence de tréhalase chez les insectes est d'un grand intérêt car le tréhalose, qui est un sucre métabolique, est le sucre principal chez la plupart des insectes à l'exception notoire des larves de *Phormia regina* et d'*Agaria affinis* (Florkin et Jeuniaux, 1974). On a déjà observé la présence de tréhalase dans l'hémolymphe et le corps adipeux (Howden et Kilby, 1956) et dans d'autres tissus d'insectes, dont les vers à soie *Bombyx mori* et *Philosamia ricini* (Pant et Morris, 1972 ; Unni, 1991). Les données accumulées suggèrent que la chute du niveau de tréhalose dans le sang au cours des activités musculaires est due à la facilité d'approvisionnement en tréhalose comme réserve immédiate d'hydrate de carbone (Saito, 1960 ; Clegg et Evans, 1961). Parmi les tissus étudiés jusqu'à présent, le corps adipeux du ver à soie est l'organe principal de biosynthèse du tréhalose (Candy et Kilby, 1961). L'augmentation de l'activité jusqu'à la 48^e heure du filage et la diminution consécutive de cette activité suggère que la tréhalase du corps adipeux fournit un substrat à la synthèse de glycogène qui fournit indirectement de l'énergie au cours du filage chez les larves d'*A. assama*. Dans la glande séricigène, l'activité tréhalase est maximale (89,6 µg et 342,3 µg de glucose/mg de protéines) à 36 heures et à 48 heures, la teneur en tréhalose correspondante étant respectivement de 0,57 mg et 1,43 mg/g. La teneur en tréhalose de la glande séricigène de *B. mori* (Shimada, 1975 ; Shimada et coll., 1980) augmente à mesure que se développe la glande séricigène et atteint son niveau maximal juste avant le filage des cocons, elle diminue ensuite au moment de l'histolyse des glandes. Nos observations sur la glande séricigène d'*A. assama* confirment tout à fait leurs résultats. Les données obtenues suggèrent que le tréhalose est utilisé pour la croissance ou pour l'entretien de la glande au cours du pré-filage ainsi que pour la formation du cocon ou d'autres fonctions métaboliques dans la dernière partie du filage.

L'activité tréhalase de l'hémolymph de *A. assama* se maintient à un niveau à peu près stable jusqu'à la 48e heure du filage puis diminue. La teneur en tréhalose reste élevée sur toute la durée du filage (de 0 à 72 heures). La concentration supérieure en tréhalose dans l'hémolymph pourrait être due à la libération de tréhalose résultant de l'histolyse de différents tissus ou à la libération à partir du corps adipeux. Le tréhalose se diffuse à partir de l'hémolymph suivant la concentration dans l'intestin et se dégrade en glucose pour répondre aux besoins énergétiques (Jabbar et Mohamed, 1990). Pendant toute la durée du filage, l'activité tréhalase et la concentration en tréhalose dans la région céphalique présentent un niveau plus élevé que dans les autres tissus. L'activité tréhalase est maximale à la 36e heure ; elle diminue ensuite légèrement et reste à un niveau faible entre la 60e et la 72e heure du filage. L'activité élevée de la tréhalase au cours du filage peut être due à l'activation probable de la tréhalase par certains facteurs présents dans les cellules neurosécrétrices du cerveau. En 1961, Steele a observé que l'extrait de corpora cardiaca augmente le niveau de tréhalose dans le cerveau de la blatte américaine. Récemment, une neurohormone appelée hypertréhalosémique a été isolée dans la tête entière de la blatte adulte *Blaberus discoidalis* ; cette neurohormone mobilise le tréhalose issu du stock de glycogène de l'hémolymph (Strey et coll., 1993). Le taux auquel le tréhalose est utilisé est pratiquement identique à celui auquel il est synthétisé et sécrété. Le tréhalose et la tréhalase jouent un rôle très important dans la régulation du niveau de sucres dans le sang, la synthèse de glycogène dans le corps adipeux, la transformation de la larve en chrysalide et dans d'autres propriétés physiologiques et fonctionnelles de la glande séricigène.

PRELIMINARY STUDY ON ARTIFICIAL HATCHING OF SILKWORM EGGS STIMULATED BY CORONA DISCHARGE

YANG M.-G.¹, XU.-Z.¹, CHEN J.-S.², YE S.-J.² & YE Y.-Q.²

1. Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029, P.R. China.

2. Department of Physics, East China Normal University, Shanghai, 200062, P.R. China.

Diapause silkworm eggs 20 hr after oviposition and 50 hr eggs after 58 days of chilling at 5 °C were stimulated by corona discharge from a new apparatus, and their hatchability and rearing parameters were compared with eggs activated by traditional common acid treatment and acid treatment after chilling in laboratory. The results indicate that eggs stimulated by optimum levels of corona discharge can yield good artificial hatching and subsequent silkworm rearing similar to those of acid treatment. This indicates that activation by corona discharge instead of hydrochloric acid treatment has good potential as a practical application, especially for its elimination of environmental pollution from hydrochloric acid, diminishing the cost of production and alleviating costly labor.

Keywords: Eggs, *Bombyx mori*, artificial hatching, corona discharge stimulation.

INTRODUCTION

The artificial hatching of silkworm eggs is important for providing baby silkworms (larvae) at any time in rearing seasons. Generally, people prefer to use hydrochloric acid immersion for artificial hatching although there are many different hatching techniques, such as hatching by immersion in warm water, electrical stimulation, rubbing, change of air pressure, immersion in different kinds of acid and artificial hibernation. In the south of China, only warm water immersion is used for polyvoltine races. Hoshino (1914) and Hori (1927) obtained greater than a 90% hatching rate using electrical stimulation. Because the larvae were too weak, however, this method could not be used in practice. Xian and Kobayashi (1993) used a corona discharge technique to stimulate diapause eggs, which were about 20 hr after oviposition, and obtained a very high hatching rate. This reopened the prospect for a new application in artificial hatching of silkworm eggs.

Since 1994, a series of tests have been done on artificial hatching of silkworm eggs by corona discharge. And some very good experimental results were obtained.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials:

The samples for testing were diapause eggs. Some of them were from 20 hours after oviposition in the spring of 1994 and the others were chilled eggs, which, within 50 hours after oviposition, were stored at 5 °C for 58 days. The 20 hr eggs were from 8605 × 8615 × 8618 × 8608 tetra hybrids and their reciprocal; the odd number symbolizes a Chinese strain and the even one is a Japanese one. A hybrid with a Chinese maternal race is simplified by C1, and that with a Japanese maternal race is called J1. The second type of strain tested was from 8605 × 8618 × 8608 trihybrid C2 and its reciprocal, J2. We selected the multihybrids because the number of eggs from multihybrid moths is larger than that of a pure strain.

2. Apparatus for corona discharge:

The apparatus consists of a high-voltage DC power supply, a comb-like cathode and a plate anode. When the DC power supply is connected with these two electrodes (poles), the corona discharge phenomenon appears. The high voltage was provided by the doubling electric potential method. The grades of this supply were 4 kV, 8 kV and 12 kV. The degree of density for the comb-like needles could be changed and the distance between these two electrodes could be adjusted. The effective area measured empirically was approximately 84 cm².

3. Experimental conditions and method of measurement:

The parameters of the corona discharge are as follows: Value of DC voltage, 12 kV; length of needles, 10 mm; distance between needles, 10 mm; distance between two electrodes, 20 mm. The duration of discharge for 20 hr eggs was 0', 1', 2.5', 5', 10' and 20', and that for cold-stored eggs was 0', 5', 10' and 20', where 0' represents the control sample, meaning acid immersion. The conditions for 20 hr eggs were: specific gravity of hydrochloric acid (SG), 1.075; temperature (T), 46 °C; immersion time (t), 5.0'-5.5'; the conditions for cold-stored eggs were: SG, 1.095; T, 48 °C; and t, 6'-6.5'.

Each sample was taken from the same egg batch and one batch was subdivided into 4 or 6 equal parts for different kinds of treatment to avoid individual sample differences and to eliminate sampling error. There were three subsamples of 20 hr eggs and four subsamples of cold-stored eggs for statistical analysis.

For comparing the polarity effect depending on whether the cathode was the comb-like electrode or the plate electrode, we selected a 20 hr egg batch and divided it into 6 equal groups. Three of them were used for a normal polarity test, and the other 3 were used for the opposite polarity; the duration of stimulation was 1', 2.5' or 5'.

Each sample was incubated using routine conditions. For comparing the effect of corona discharge stimulation with that of the acid immersion, data collected included the days of incubation, one-day hatching rate, practical hatching rate (2 days), general hatching rate (7 days), rate of bluish eggs, rate of non-bluish eggs and rate of dead eggs.

4. Results of laboratory rearing:

4.1. Comparison of the growth and development of 1st-2nd instar larvae:

The first-day hatched silkworms of the 4 cold-stored sample groups, two of which were stimulated by corona discharge and the other two which were treated by acid immersion, were reared using routine methods in aluminum boxes until the beginning of the third instar. The following data were gathered: developmental duration of the 1st-2nd instars, body weight of molting larvae and rate of late molters. The rates of late molters for all the groups were investigated when most of the larvae in acid-treated groups had molted and nets were spread simultaneously on all the groups for picking out late molters.

4.2. Comparison of silkworm rearing through all instars:

For obtaining results of rearing, 4 egg batches were used from the normal and reciprocal triple hybrids, respectively. After cold storage for 58 days, two of them were stimulated by corona discharge for 10' and the other two were treated by hydrochloric acid. All were reared until mounting and spinning cocoons. The data included: duration of the fifth instar, duration of all instars, cocoon crop per 10,000 silkworms, cocoon shell weight per 10,000 silkworms, cocooning rate, cocoon weight, cocoon shell weight and shell weight percentage.

RESULTS AND ANALYSIS

1. Effect of artificial hatching on the 20 hr eggs stimulated by corona discharge:

The duration of incubation was 10 days for both the stimulated and control groups C1 and J1. The hatching results are listed in Table I.

Table I. Hatching results of 20 hr eggs stimulated by corona discharge.

Tableau I. Effet de la stimulation par décharge électrique sur l'éclosion des oeufs âgés de 20 heures.

Variety	Treatment condition		One-day hatching rate	Practical hatching rate	General hatching rate	Rate of bluish eggs	Rate of non-bluish eggs	Rate of dead eggs
Variété	Condition de traitement		Taux d'éclosion après 1 jour	Taux d'éclosion pratique	Taux d'éclosion global	Taux d'oeufs bleus	Taux d'oeufs non bleus	Taux d'oeufs morts
C1	1'	$\bar{X}$	89.46	94.13	97.08	97.72	1.28	0.99
		I	100.65	104.39	107.11	105.77	137.63	14.82
	2.5'	$\bar{X}$	86.40	87.90	90.85	91.97	7.26	0.78
		I	97.21	97.48	100.23	99.55	780.64	11.68
	5'	$\bar{X}$	71.25	78.12	84.05	85.78	9.73	4.49
		I	80.16	86.64	92.73	92.84	1046.24	67.22
	10'	$\bar{X}$	81.92	89.17	89.78	91.40	0.35	8.60
		I	92.17	98.89	99.05	98.93	37.63	128.74
	20'	$\bar{X}$	48.87	54.92	55.67	56.45	0.00	43.55
		I	54.98	60.91	61.42	61.10	0.00	651.95
	Control Témoin	$\bar{X}$	88.88	90.17	90.64	92.39	0.93	6.68
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
J1	1'	$\bar{X}$	73.86	78.77	83.81	85.09	8.25	2.38
		I	82.64	86.74	92.29	93.38	-	26.80
	2.5'	$\bar{X}$	77.71	83.15	89.45	91.73	7.88	0.39
		I	86.99	91.56	98.50	100.67	-	4.39
	5'	$\bar{X}$	92.35	95.66	96.74	97.81	0.28	1.92
		I	103.38	105.34	106.53	107.34	-	21.62
	10'	$\bar{X}$	95.43	97.60	97.60	98.20	0.00	1.80
		I	106.83	107.48	107.48	107.77	-	20.27
	20'	$\bar{X}$	91.60	94.48	95.47	97.37	1.02	1.61
		I	102.54	104.04	105.13	106.86	-	18.13
	Control Témoin	$\bar{X}$	89.33	90.81	90.81	91.12	0.00	8.88
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00

 $\bar{X}$: Average value for 3 samples / Valeur moyenne de 3 échantillons.

I: Relative value comparing with control index of 100.00 / Valeur relative par rapport à l'indice 100 du témoin.

Table I shows that the one-day hatching rate, practical hatching rate, general hatching rate and the rate of bluish eggs were highest for 1' stimulation and slightly higher than that for the control. This was followed by the 2.5' and 10' groups, in which the hatching rate and rate of bluish eggs were approximately equal to the control. The one-day and practical hatching rates for 5' groups were lower than those of the control by about 12-17%; the general hatching rate and the rate of bluish eggs were also lower by about 6%. The main reason was perhaps that about 10% eggs were non-bluish. The worst was the 20' group, in which about 49-56% of the eggs were bluish and hatched, because more than 40% of the eggs were dead. These results indicated that Chinese maternal hybrids were more

sensitive to corona discharge stimulation. A stimulus of 1'-2.5' was enough for hatching and produced an effect nearly equal to that of acid treatment.

Table I also indicates that the effects of stimulation were different between J1 and C1. The hatching rates of the 1' and 2.5' sample groups for J1 were worse than that of the control and about 8% of eggs were not bluish. The hatching effects of the 5' and 20' sample groups were better than those of the control. This suggests that the Japanese maternal hybrids were not very sensitive to the corona discharge stimulation, so it was necessary to use a higher level of stimulation for terminating diapause and promoting growth and development. This result coincided with the results of acid treatment.

The conclusion of these studies is that the appropriate developmental period of eggs and the suitable strength of corona discharge stimulation for the individual silkworm varieties were very important for hatching. Moreover, hatchability and rearing parameters were potentially equivalent or better than those using the acid immersion method.

2. Effect of artificial hatching on cold-stored eggs stimulated by corona discharge:

Duration of incubation of the stimulated and control groups were 9 days for variety C2, but 10 days for variety J2; all of these eggs were stored in the cold for about 58 days. The hatching results are listed in Table II.

The results show that the one-day hatching rates for the stimulated groups were very high, from 82% to 93%, but they were slightly lower than those of the controls. Especially for the 5' stimulated group, hatching rates were reduced by about 10%. The practical and general hatching rates and the rate of bluish eggs were almost the same between the stimulated and control groups, and there were no non-bluish eggs. These results indicate that when the period of cold storage was longer, the promotion of embryo development was no different between corona discharge stimulation and acid treatment. The rates of dead eggs for different groups showed small fluctuations, but all were low.

Compared to the previous results, the rates of dead eggs for 20 hr eggs of Chinese maternal tetra hybrids stimulated for 20' were very high, about 40%, but for the cold-stored eggs were very low; concomitantly, the latter's hatching rates were high. Perhaps these anomalous results depended on the degree of diapause of the eggs. The degree of diapause of these eggs, which were refrigerated at about 50 hours after oviposition, was deeper than that of 20 hr eggs, so they could withstand stronger corona discharge stimulation.

The data prompted the conclusion that hatching stimulated by suitable corona discharge stimulation to cold-stored eggs for autumn rearing is almost the same as that produced by acid treatment.

3. Comparison of the effects between negative and positive corona discharge stimulation:

Usually, in a 'negative' corona discharge, the comb-like electrode is the cathode and a plate electrode is used for the anode. If the positions of the electrodes are exchanged, it is called a 'positive' corona discharge. In order to compare the hatching effect of stimulation by negative corona discharge with that of positive corona discharge, we carried out a series of experiments for which the results are listed in Table III.

For the two different varieties, the one-day hatching and practical hatching rates of the 1', 2.5' and 5' groups of negative corona discharge stimulation were obviously higher than those obtained for positive corona discharge stimulation; the general hatching rate and the rate of bluish eggs were also higher than for the positive discharge, except for a few samples. For the rate of non-bluish eggs the effect of positive corona discharge stimulation was higher than that of the negative one. The conclusion was that the hatching effects obtained by negative corona discharge stimulation were clearly better than that by the positive one.

According to our understanding of static electricity, in the negative corona condition, the moving particles are electrons, which are released from the negative electrode (comb-like needles) and move toward the plate electrode. Most of those that collide with the silkworm eggs while moving have a higher energy level. For the positive situation the moving particles are ionized air particles, so that the silkworm eggs are bombarded by a stream of fast-moving ions. Because the volume and mass of the ions are larger than those of the electrons, their ability to penetrate is weaker and the stimulated

effect is therefore worse than that of the electrons. Since fewer diapause eggs were activated, the hatching rate was therefore reduced.

Table II. Hatching results of cold-stored eggs stimulated by corona discharge.

Tableau II. Effet de la stimulation par décharge électrique sur l'éclosion des oeufs conservés au froid.

Variety	Treatment condition		One-day hatching rate	Practical hatching rate	General hatching rate	Rate of bluish eggs	Rate of non-bluish eggs	Rate of dead eggs
<i>Variété</i>	<i>Condition de traitement</i>		<i>Taux d'éclosion après 1 jour</i>	<i>Taux d'éclosion pratique</i>	<i>Taux d'éclosion global</i>	<i>Taux d'oeufs bleus</i>	<i>Taux d'oeufs non bleus</i>	<i>Taux d'oeufs morts</i>
C2	5'	$\bar{X}$	86.60	96.30	98.44	98.83	0.00	1.17
		I	89.39	98.24	100.43	100.09	-	92.86
	10'	$\bar{X}$	93.38	95.91	97.40	98.70	0.00	1.30
		I	96.39	97.85	99.37	99.96	-	103.17
	20'	$\bar{X}$	92.89	97.58	98.45	99.31	0.00	0.69
		I	95.88	99.55	100.44	100.58	-	54.76
	Control	$\bar{X}$	96.88	98.02	98.02	98.74	0.00	1.26
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00
	Témoin	$\bar{X}$	96.88	98.02	98.02	98.74	0.00	1.26
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00
J2	5'	$\bar{X}$	82.00	95.68	97.91	99.25	0.00	0.75
		I	85.58	96.98	99.24	100.26	-	74.26
	10'	$\bar{X}$	87.41	93.37	95.13	97.27	0.00	2.73
		I	91.22	94.64	96.42	98.26	-	270.30
	20'	$\bar{X}$	91.37	95.95	96.83	97.89	0.00	2.21
		I	95.36	97.25	98.15	98.89	-	218.81
	Control	$\bar{X}$	95.82	98.66	98.68	98.99	0.00	1.01
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00
	Témoin	$\bar{X}$	95.82	98.66	98.68	98.99	0.00	1.01
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00

$\bar{X}$: Average value for 4 samples / *Valeur moyenne de 4 échantillons.*

I: Relative value comparing with control index of 100.00 / *Valeur relative par rapport à l'indice 100 du témoin.*

4. Rearing results of silkworms artificially hatched by corona discharge stimulation:

4.1. Comparison of the result of growth and development for 1st-2nd instar larvae:

The data for growth and development of 1st-2nd instar larvae for the triple hybrids C2 and J2 are listed in Table IV. Data showing repeatability for experiments (two normal and two reciprocal crosses) are indicated by the variance analysis for the body weight of the molters and the rate of late molters in Table V.

From Table IV, we can see that the duration of development between the corona discharge stimulated and control groups showed no difference and the body weight of the molters for C2 hybrids stimulated by the corona discharge was slightly heavier than that of controls, but for J2 hybrids there was an opposite result. Comparing the normal hybrids with their reciprocal the body weight for the reciprocal hybrids of J2 was heavier than that for the normal C2. Using the analysis of variance for the body weight of the molters in Table V, the *F* value for the 1st and 2nd instar larvae of the

corona-stimulated groups did not reach a significant level, but the F value for the 1st instar larvae of replicated groups was significant. This shows that there was a maternal effect. Since the J2 female parents were hybrids from crossing Japanese strains, their laid eggs were larger and the larval body weight at hatching was heavier, causing the body weight of 1st instar larvae for J2 to be heavier than

Table III. Comparative results of hatching effect by negative and positive corona discharge stimulation.

Tableau III. Résultats comparatifs de l'éclosion obtenue par décharge électrique positive et négative.

Variety	Duration time	State of electrode	One-day hatching rate	Practical hatching rate	General hatching rate	Rate of bluish eggs	Rate of non-bluish eggs	Rate of dead eggs
<i>Variété</i>	<i>Durée du traitement</i>	<i>Type d'électrode</i>	<i>Taux d'éclosion après 1 jour</i>	<i>Taux d'éclosion pratique</i>	<i>Taux d'éclosion global</i>	<i>Taux d'oeufs bleus</i>	<i>Taux d'oeufs non bleus</i>	<i>Taux d'oeufs morts</i>
C1	1'	⊖	97.78	97.78	97.78	97.78	2.22	0.00
		±	65.71	71.43	97.14	100.00	0.00	0.00
		I	67.20	73.05	99.35	102.27	-	-
	2.5'	⊖	90.79	93.42	93.42	93.42	6.58	0.00
		±	62.96	74.07	82.72	82.72	17.28	0.00
		I	69.35	79.29	88.55	88.55	-	-
	5'	⊖	94.07	96.61	97.46	97.46	0.00	2.54
		±	45.45	47.73	54.55	56.82	43.18	0.00
		I	48.32	49.40	55.97	58.30	-	-
J1	1'	⊖	70.71	75.71	83.57	84.29	15.71	0.00
		±	62.32	69.57	76.81	79.71	20.29	0.00
		I	88.13	91.89	91.91	94.57	-	-
	2.5'	⊖	69.41	74.12	82.35	82.35	17.65	0.00
		±	53.57	64.29	83.93	85.71	13.39	0.89
		I	77.18	86.74	101.92	104.08	-	-
	5'	⊖	95.24	96.83	96.83	100.00	0.00	0.00
		±	38.38	47.47	54.55	55.56	43.43	1.01
		I	40.30	49.02	56.34	55.56	-	-

⊖ comb-like electrode was negative, plate electrode was positive; ± opposite state.

⊖ l'électrode en peigne est négative, l'électrode plate est positive; ± positions inverses.

I: Relative index of ± data with the index 100.00 of ⊖ data / Indice relatif des données ± par rapport à l'indice des données ⊖.

for C2. Because the maternal effect decreased step by step with the increasing age of instar, the amplitude of increasing body weight between J2 and C2 also decreased with the age of the larval instar. Thus, the F value from the 2nd instar larvae clearly could not reach a significant level.

Rates of late molters for any groups were all lower than the controls, indicating that molting was uniform for the corona-stimulated and acid immersion groups. According to the data from Table IV, the general tendency was for better performance of the corona-stimulated groups than the control, but the *F* value was not significant (Table V). This shows that there was no difference for the developmental uniformity of the 1st and 2nd instar larvae between the corona-stimulated and control groups.

Table IV. Growth and development of 1st-2nd instar cold-stored larvae with corona discharge stimulation.

Tableau IV. Croissance et développement des larves du premier et du deuxième âge conservées au froid après stimulation par décharge électrique.

Variety	Treatment condition		1st instar duration (d:h)	Body weight of molters (mg)	Rate of late molters (%)	2nd instar duration (d:h)	Body weight of molters (mg)	Rate of late molters (%)
<i>Variété</i>	<i>Condition de traitement</i>		<i>Durée du 1er âge (j:h)</i>	<i>Poids des muants (mg)</i>	<i>Taux de muants tardifs (%)</i>	<i>Durée du 2e âge (d:h)</i>	<i>Poids des muants (mg)</i>	<i>Taux de muants tardifs (%)</i>
Normal hybrid	5'	$\bar{X}$	3:07	5.35	2.16	3:00	30.90	2.21
		I	100.00	103.88	47.26	100.00	100.00	93.25
<i>Hybride normal</i>	10'	$\bar{X}$	3:07	5.30	6.28	3:00	30.00	2.51
		I	100.00	102.91	137.42	100.00	97.09	105.91
(C2)	20'	$\bar{X}$	3:07	5.35	2.01	3:00	31.40	1.23
		I	100.00	103.88	43.98	100.00	101.62	51.89
	Control	$\bar{X}$	3:07	5.15	4.57	3:00	30.90	2.37
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Reciprocal hybrid	5'	$\bar{X}$	3:07	5.80	1.28	2:20	31.70	1.45
		I	100.00	100.00	84.21	100.00	99.84	55.77
<i>Hybride réciproque</i>	10'	$\bar{X}$	3:07	5.55	1.27	2:20	31.10	1.66
		I	100.00	95.69	83.55	100.00	97.95	63.85
(J2)	20'	$\bar{X}$	3:07	5.60	1.83	2:20	31.65	1.66
		I	100.00	96.55	107.24	100.00	99.69	63.85
	Control	$\bar{X}$	3:07	5.80	1.52	2:20	31.75	2.60
		I	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

$\bar{X}$: Average value for 2 samples / *Valeur moyenne de 2 échantillons.*

I: Relative value comparing with control index of 100.00 / *Valeur relative par rapport à l'indice 100 du témoin.*

4.2. Comparison of rearing results:

The rearing data of all instars for the corona-stimulated and acid immersion groups in C2 and J2 are listed in Table VI. Table VII shows the analysis of variance for 4 data replicates, in which two were from normal triple hybrids and the other two from the reciprocals.

The duration for all instars taken together and for the fifth instar alone is shown for the corona-stimulated and acid immersion groups in Tables VI and VII. The cocoon crops and shell weight

per 10,000 fourth instar silkworms in the corona-stimulated groups of the C2 hybrid were lower than for the acid immersion groups by about 4-6%, but in the J2 hybrid the result was opposite, i.e., higher by about 11%. Therefore, the average value for the corona-stimulated group was higher than that for the control by about 2-5%. The analysis of variance (Table VII) indicated that the *F* value for the stimulated groups was significant, which means that in fact there was no difference between these two groups for these parameters.

Table V. Variance analysis from combined data of the normal and reciprocal hybrids.

Tableau V. Analyse de variance à partir des données combinées obtenues pour les hybrides normaux et réciproques.

Instar	Source of variance	Degrees of freedom	Body weight of molters			Rate of late molters		
			SS	MS	F	SS	MS	F
Age	Source de variance	Degrés de liberté	Poids des muants			Taux de muants tardifs		
			SS	MS	F	SS	MS	F
1	Treatment / <i>Traitement</i>	3	0.047	0.016	0.40	32.090	10.697	1.78
	Replication / <i>Répétition</i>	3	0.656	0.219	5.48*	58.197	19.399	3.23
	Error / <i>Ecart</i>	9	0.360	0.040		54.079	6.009	
2	Treatment / <i>Traitement</i>	3	2.205	0.735	2.21	16.446	5.482	0.22
	Replication / <i>Répétition</i>	3	2.835	0.945	2.84	131.187	43.729	1.73
	Error / <i>Ecart</i>	9	2.990	0.332		227.186	25.243	

Here % data are transformed using: $O = \sin^{-1} \sqrt{p}$

Les données en pourcentage sont transformées suivant le modèle: $\Theta = \sin^{-1} \sqrt{p}$

* Significant / *Significatif*.

SS: Sum square / *Somme des carrés*; MS: Mean square / *Carrés moyens*. F (0.05) = 3.88; F (0.01) = 6.99

The cocooning rate for the corona-stimulated groups of the C2 hybrid was lower than for the acid immersion groups by about 3%, but was higher by about 8% for the reciprocal hybrid, J2. Again, the average value for these two hybrids of the corona-stimulated groups was higher by nearly 2.5% than the acid immersion groups, but the *F* value from the variance analysis results was not significant.

Values, data or characters measuring the cocoon quality, cocoon weight and shell weight were better in the corona-stimulated groups than in the control, giving higher average values by about 3.5% and 2%, respectively. Although the increased sizes were not very great, the trends for the different replicated samples were almost the same. This caused the *F* value from the analysis of variance to reach its most significant level. Because the increased size of the cocoon weight from the corona-stimulated groups was larger than for the shell weight, this resulted in a slightly lower shell weight percentage for the corona-stimulated groups in comparison with the control. Nevertheless, due to fluctuations in this value among different experimental repetitions, the *F* value did not reach a significant level.

From these results we can conclude that there is no difference in the growth and development or survival rate of silkworms, nor for the quantity and quality of cocoons between corona-stimulated and acid-treated groups. Thus, it appeared that the use of the corona discharge technique instead of the acid immersion method for artificial hatching did not cause any ill effects on the rearing of silkworms.

Table VI. Rearing results of silkworms artificially hatched by corona discharge and acid immersion.

Tableau VI. Résultats de l'élevage des vers à soie éclos artificiellement par décharge électrique et par immersion dans l'acide.

Variety	Treatment condition		Duration of all instars (d:h)	Duration of 5th instar (d:h)	Cocoon crop per 10,000 larvae (kg)	Shell weight per 10,000 larvae (kg)	Cocooning rate (%)	Cocoon weight (mg)	Shell weight (mg)	Shell weight percentage
Variété	Condition de traitement		Durée du stade larvaire (d:h)	Durée du 5e âge (d:h)	Rendement en cocons pour 10 000 larves (kg)	Poids de la coque pour 10 000 larves (kg)	Taux de filage (%)	Poids du cocon (mg)	Poids de la coque (mg)	Richesse soyeuse (%)
C2	10'	$\bar{X}$	20:08	6:12	14.335	3.227	92.88	1584.0	353.00	22.48
		$\bar{I}$	100.00	101.30	95.71	94.22	97.28	104.35	103.32	98.29
	Control Témoin	$\bar{X}$	20:08	6:10	14.977	3.425	95.48	1518.0	345.00	22.87
		$\bar{I}$	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
J2	10'	$\bar{X}$	20:08	6:12	15.678	3.473	97.01	1596.0	351.00	22.16
		$\bar{I}$	100.00	101.30	111.29	110.68	108.16	102.57	102.03	99.59
	Control Témoin	$\bar{X}$	20:08	6:10	14.088	3.138	89.69	1556.0	344.00	22.25
		$\bar{I}$	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Mean of C2 and J2 Moyenne de C2 et J2	10'	$\bar{X}$	20:08	6:12	15.007	3.350	94.95	1590.0	352.00	22.32
		$\bar{I}$	100.00	101.30	104.94	102.07	102.55	103.45	102.03	98.94
	Control Témoin	$\bar{X}$	20:08	6:10	14.533	3.282	92.95	1537.0	345.00	22.56
		$\bar{I}$	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

 $\bar{X}$: Average value for 2 samples / Valeur moyenne de 2 échantillons. $\bar{I}$: Relative value comparing with control index 100.00 / Valeur relative par rapport à l'indice témoin 100.

Table VII. Variance analysis results from combined data of the normal and reciprocal hybrids in Table VI.

Tableau VII. Analyse de variance à partir des données combinées obtenues pour les hybrides normaux et réciproques dans le tableau VI.

Source of variance	Degrees of freedom	Cocoon crop per 10,000 larvae			Shell weight per 10,000 larvae		
		SS	MS	F	SS	MS	F
<i>Source de variance</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Rendement en cocons pour 10 000 larves</i>			<i>Poids de la coque pour 10 000 larves</i>		
		SS	MS	F	SS	MS	F
Treatment / <i>Traitement</i>	1	0.469	0.469	0.442	0.009	0.009	0.028
Replication / <i>Répétition</i>	2	5.468	1.823	1.720	0.271	0.090	0.280
Error / <i>Ecart</i>	3	7.423	1.060		0.968	0.323	

Source of variance	Degrees of freedom	Cocooning rate			Single cocoon weight		
		SS	MS	F	SS	MS	F
<i>Source de variance</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Taux de filage</i>			<i>Poids du cocon</i>		
		SS	MS	F	SS	MS	F
Treatment / <i>Traitement</i>	1	13.781	13.781	0.397	5724.5	5724.5	43.53**
Replication / <i>Répétition</i>	2	60.495	20.165	0.580	1322.5	440.8	3.35
Error / <i>Ecart</i>	3	104.249	34.750		394.5	131.5	

Source of variance	Degrees of freedom	Cocoon shell weight			Shell weight percentage		
		SS	MS	F	SS	MS	F
<i>Source de variance</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Poids de la coque</i>			<i>Richesse soyeuse</i>		
		SS	MS	F	SS	MS	F
Treatment / <i>Traitement</i>	1	112.5	112.5	61.48**	0.058	0.058	2.53
Replication / <i>Répétition</i>	2	17.5	5.83	3.19	0.212	0.071	3.09
Error / <i>Ecart</i>	3	5.5	1.83		0.069	0.023	

** Most significant / *Fortement significatif.*

SS: Sum square / *Somme des carrés*; MS: Mean square / *Carrés moyens*. F (0.05) = 10.13; F (0.01) = 34.12

DISCUSSION

Stimulation of diapausing silkworm eggs by corona discharge for artificial hatching is a novel research direction for the 1990s. If this technique can be confirmed, improved, and applied on a production scale, perhaps it could cause a revolution in the artificial hatching of silkworm eggs by eliminating environmental pollution from hydrochloric acid, improving the workers' health, simplifying the procedure for production, and reducing the labor and overall cost of production. It is also proposed that this technique could play an important role in establishing a system for hatching diapause eggs at any time.

As is well known, the voltage, needle length, distance between the needles, distance between the electrodes, and duration can affect the results of corona-stimulated treatment. The data presented here were gathered under fixed conditions of voltage, needle length, distance between the needles and distance between the electrodes, with the corona discharge duration as the only variable parameter. In the future, we will carry out a thorough study of variation of these parameters to obtain the optimum conditions for hatching.

Regarding the hatching mechanism, Sowers and Lieber (1986) proposed that temporary holes penetrating the plasma membranes of animal cells can appear by the action of a high voltage electric field. Thus, we consider that during corona discharge the high-speed electron flow could open up temporary holes penetrating the serous or yolk membranes of diapause eggs; this could allow some materials to pass freely through the membranes and ultimately lead to critical changes within the eggs. In addition, the energy of the moving electrons could give rise to changes in the conformation and configuration of macromolecules, affecting cell and organ movements and enzyme activity and starting the developmental process.

REFERENCES

- AKAZAKI M. (1981) Handbook of Static Electricity. Ohm Press, Tokyo, pp. 209-224.
 HORI M. (1927) Hatching apparatus of silkworm eggs by electricity. Rep. Seric. Sci. Japan, 421, 310-314.
 HOSHINO (1914) Artificial hatching method of silkworm eggs by electricity (1-6). Rep. Seric. Sci. Japan, 264, 9-16; 265, 48-51; 267, 34-40; 269, 9-16; 270, 48-51; 271, 34-40.
 SOWERS A.E., LIEBER M.R. (1986) Electropore diameters, lifetimes, numbers and locations in individual erythrocyte ghosts. FEBS Lett., 205, 179-184.
 XIAN X., KOBAYASHI M. (1993) Effect of corona discharge on the termination of diapause in silkworm egg. J. Sericult. Sci. Japan, 62(2), 175-177.

ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'ECLOSION ARTIFICIELLE DES OEUF DE VERS A SOIE PAR DECHARGE ELECTRIQUE EN COURONNE

YANG M.-G.¹, XU X.-Z.², CHEN J.-S.², YE S.-J.² & YE Y.-Q.²

1. Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029, R.P. Chine.
2. Department of Physics, East China Normal University, Shanghai, 200062, R.P. Chine.

Des oeufs de vers à soie 20 heures après l'oviposition et des oeufs de 50 heures après stockage à 5 °C pendant 58 jours ont été soumis à une décharge électrique à effet de couronne à l'aide d'un nouvel appareil. Le taux d'éclosion obtenu et les paramètres d'élevage ont été comparés avec ceux obtenus chez des oeufs activés par traitement conventionnel à l'acide et par traitement à l'acide après réfrigération en laboratoire. Les résultats indiquent que les oeufs traités avec des niveaux optimaux de décharge électrique donnent une éclosion artificielle satisfaisante et que l'élevage des oeufs issus de ce traitement est similaire à celui des oeufs traités à l'acide. Ceci montre que l'activation par décharge électrique en couronne peut remplacer le traitement à l'acide chlorhydrique et qu'elle a un bon potentiel d'application, en particulier car elle permet d'éliminer la pollution environnementale par l'acide chlorhydrique, de diminuer les coûts de production et de réduire les frais de main-d'oeuvre.

INTRODUCTION

L'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie est importante car elle permet d'obtenir de jeunes vers à soie (larves) à tout moment lors des saisons d'élevage. En général, pour l'éclosion artificielle, on préfère utiliser le traitement par immersion dans l'acide chlorhydrique bien qu'il y ait de nombreuses autres techniques d'éclosion comme l'éclosion par immersion dans l'eau chaude, la stimulation électrique, la friction, la modification de la pression de l'air, l'immersion dans différents types d'acide et l'hibernation artificielle. Dans le sud de la Chine, seule l'immersion dans l'eau chaude est utilisée pour les races polyvoltines. Hoshino (1914) et Hori (1927) ont obtenu un taux d'éclosion supérieur à 90 % par stimulation électrique. Les larves étant trop faibles, cette méthode n'a toutefois pas pu être mise en pratique. Xian et Kobayashi (1993) ont utilisé une technique de décharge électrique à effet de couronne pour stimuler des oeufs diapausants âgés d'environ 20 heures après l'oviposition et ont obtenu un taux d'éclosion très élevé. Ceci a relancé la perspective d'une nouvelle application dans l'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie.

Depuis 1994, une série de tests a été réalisée sur l'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie par décharge électrique en couronne. Des résultats prometteurs ont été obtenus.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels :

Les échantillons expérimentaux sont des oeufs diapausants. Certains étaient âgés de 20 jours après l'oviposition au printemps en 1994 et les autres étaient des oeufs réfrigérés stockés à 5 °C pendant 58 jours dans les 50 heures après l'oviposition. Les oeufs âgés de 20 heures sont issus de tétrahybrides 8605 · 8615 × 8618 · 8608 et du croisement réciproque ; le nombre impair représente une souche chinoise et le nombre pair une souche japonaise. Un hybride est appelé C1 lorsque la race

maternelle est chinoise et J1 lorsque la race maternelle est japonaise. Le deuxième type de souche testée est issu du trihybride C2 8605 × 8618 · 8608 et de son croisement réciproque, J2. Nous avons sélectionné des polyhybrides car le nombre d'oeufs issus de papillons polyhybrides est plus élevé que celui d'une souche pure.

2. Appareil utilisé pour la décharge électrique à effet de couronne :

L'appareil est composé d'un circuit d'alimentation en courant continu à haute tension, d'une cathode en forme de peigne et d'une anode en plaque. Le phénomène de décharge électrique en couronne se produit lorsque le circuit d'alimentation en courant continu est branché à ces deux électrodes (pôles). La haute tension est fournie par la méthode du potentiel électrique couplé. Les tensions de cette alimentation sont de 4 kV, 8 kV et 12 kV. Le degré de densité des aiguilles de la cathode peut être modifié et la distance entre les deux électrodes peut être réglée. La surface effective, mesurée de manière empirique, est approximativement de 84 cm².

3. Conditions expérimentales et méthode de mesure :

Les paramètres pour la décharge électrique sont les suivants : valeur de la tension en courant continu : 12 kV ; longueur des aiguilles : 10 mm ; distance entre les aiguilles : 10 mm ; distance entre les deux électrodes : 20 mm. Les durées de la décharge pour les oeufs âgés de 20 heures sont de 0', 1', 2,5', 5', 10' et 20' et celles utilisées pour les oeufs réfrigérés sont de 0', 5', 10' et 20' ; 0' représente l'échantillon témoin, c'est-à-dire traité par immersion dans l'acide. Les conditions pour les oeufs âgés de 20 heures sont : densité de l'acide chlorhydrique (SG) : 1,075 ; température (T) : 46 °C ; durée d'immersion (t) : 5,0'-5,5' ; les conditions pour les oeufs réfrigérés sont : SG : 1,095 ; T : 48 °C ; t : 6'-6,5'.

Chaque échantillon est issu d'un même lot d'oeufs et chaque lot a été subdivisé en quatre ou six groupes égaux pour les différents traitements afin d'éviter les différences entre échantillons individuels et pour éliminer l'écart d'échantillonnage. Trois sous-groupes pour les oeufs âgés de 20 heures et quatre sous-groupes pour les oeufs réfrigérés ont été conservés pour analyse statistique.

Pour comparer l'effet de polarité dû à l'utilisation en cathode soit de l'électrode en forme de peigne, soit de l'anode en plaque, nous avons sélectionné un lot d'oeufs âgés de 20 heures et l'avons divisé en six groupes égaux. Trois d'entre eux ont été utilisés pour le test de polarité normale et les trois autres pour la polarité opposée ; la durée de la stimulation est de 1', de 2,5' ou de 5'.

Chaque échantillon a été incubé dans les conditions habituelles. Pour comparer l'effet de la stimulation par décharge électrique avec celui de l'immersion dans l'acide, les données recueillies portent sur les jours d'incubation, le taux d'éclosion après un jour, le taux d'éclosion pratique (2 jours), le taux d'éclosion général (7 jours), le taux d'oeufs bleus, le taux d'oeufs non bleus et le taux d'oeufs morts.

4. Résultats de l'élevage en laboratoire :

4.1. Comparaison de la croissance et du développement des larves du premier et du deuxième âge :

Les larves écloses après un jour issues des quatre groupes d'échantillons réfrigérés, dont deux ont été soumis à la stimulation par décharge électrique en couronne et les deux autres au traitement par immersion dans l'acide, ont été élevées suivant les méthodes standard dans des boîtes en aluminium jusqu'au début du troisième âge. Les données suivantes ont été recueillies : durée du développement du premier et du deuxième âge, poids des larves à la mue et taux de mue tardive. Les taux de mue tardive chez tous les groupes ont été étudiés après la mue de la plupart des larves des groupes traités à l'acide et des filets ont été jetés simultanément sur tous les groupes pour prélever les larves à mue tardive.

4.2. Comparaison de l'élevage à tous les âges :

Pour obtenir les résultats de l'élevage, quatre lots d'oeufs ont été utilisés pour les hybrides triples normaux et réciproques. Après stockage au froid pendant 58 jours, deux de ces lots ont été stimulés par décharge électrique en couronne pendant 10' et les deux autres ont été traités à l'acide chlorhydrique. Toutes les larves ont été élevées jusqu'à la montée et au filage des cocons. Les données

concernent : la durée du cinquième âge, la durée de tous les âges, le rendement en cocons pour 10 000 larves, le poids de la coque pour 10 000 larves, le taux de filage, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse.

RESULTATS ET ANALYSE

1. Effet de la stimulation de l'éclosion artificielle par décharge électrique en couronne sur les oeufs âgés de 20 heures :

La durée d'incubation est de 10 jours pour les groupes témoins et pour les groupes traités C1 et J1. Les résultats de l'éclosion sont présentés dans le tableau I.

Les données du tableau I montrent que le taux d'éclosion après un jour, le taux d'éclosion pratique, le taux d'éclosion général et le taux d'oeufs bleus sont maximaux pour la stimulation de 1' et légèrement supérieurs à ceux du témoin, devant les groupes traités pendant 2,5' et 10' chez lesquels les taux d'éclosion et les taux d'oeufs bleus sont approximativement identiques à ceux obtenus chez le témoin. Le taux d'éclosion après un jour et le taux d'éclosion pratique pour les groupes traités pendant 5' sont inférieurs de 12 à 17 % à ceux obtenus chez le témoin ; le taux d'éclosion général et le taux d'oeufs bleus sont également inférieurs d'environ 6 %. Ceci est principalement dû au fait qu'environ 10 % sont des oeufs non bleus. Le groupe donnant les valeurs minimales est le groupe traité pendant 20', chez lequel environ 49 à 56 % des oeufs sont bleus et éclos et plus de 40 % des oeufs sont morts. Ces résultats indiquent que les hybrides maternels chinois sont plus sensibles à la stimulation par décharge électrique en couronne. Une stimulation de 1' à 2,5' suffit pour provoquer l'éclosion et produire un effet presque égal à celui du traitement à l'acide.

Le tableau I indique également que les effets de la stimulation sont différents chez J1 et C1. Les taux d'éclosion pour les groupes d'échantillons traités pendant 1' et 2,5' chez J1 sont inférieurs à ceux obtenus chez le témoin et environ 8 % des oeufs sont bleus. Les effets sur l'éclosion des groupes d'échantillons traités pendant 5' et 20' sont supérieurs à ceux obtenus chez le témoin. Ceci suggère que les hybrides maternels japonais ne sont pas très sensibles à la stimulation par décharge électrique en couronne, il est donc nécessaire d'utiliser une tension supérieure pour lever la diapause et favoriser la croissance et le développement. Ce résultat coïncide avec les résultats obtenus pour le traitement à l'acide.

La conclusion de cette étude est que la période de développement appropriée des oeufs et la tension optimale de la stimulation par décharge électrique en couronne pour les variétés de vers à soie sont très importantes pour l'éclosion. De plus, le taux d'éclosion et les paramètres d'élevage sont potentiellement équivalents ou supérieurs à ceux obtenus par la méthode de l'immersion dans l'acide.

2. Effet de la stimulation de l'éclosion par décharge électrique en couronne sur les oeufs stockés au froid :

La durée d'incubation des groupes stimulés et des groupes témoins est de 9 jours pour la variété C2 et de 10 jours pour la variété J2. Tous les oeufs ont été stockés au froid pendant environ 58 jours. Les résultats de l'éclosion sont présentés dans le tableau II.

Ces résultats montrent que les taux d'éclosion après un jour chez les groupes stimulés sont très élevés, entre 82 et 93 %, bien que légèrement inférieurs à ceux obtenus chez le témoin. En particulier, chez le groupe stimulé pendant 5' les taux d'éclosion diminuent d'environ 10 %. Les taux d'éclosion pratique et général et le taux d'oeufs bleus sont pratiquement identiques entre les groupes traités et les groupes stimulés ; en outre, il n'y a aucun oeuf non bleu. Ces résultats indiquent que, lorsque la période de réfrigération est plus longue, le développement de l'embryon ne diffère pas entre les groupes stimulés par décharge électrique en couronne et les groupes traités à l'acide. Les taux d'oeufs morts présentent de légères fluctuations entre les différents groupes mais sont faibles dans tous les cas.

Par rapport aux résultats précédents, les taux d'oeufs morts sont très élevés (environ 40 %) pour les tétrahybrides maternels chinois stimulés pendant 20' et très faibles pour les oeufs conservés au froid ; parallèlement, les taux d'éclosion de ces derniers sont élevés. Il est possible que ces résultats contradictoires soient dus au degré de diapause des oeufs. Le degré de diapause de ces oeufs, qui ont

été stockés au froid environ 50 heures après l'oviposition, est plus élevé que celui des oeufs âgés de 20 heures : c'est pourquoi ils peuvent supporter une décharge électrique plus forte.

Ces données conduisent à penser que l'éclosion provoquée par une décharge électrique appropriée chez les oeufs réfrigérés destinés à l'élevage d'automne est pratiquement identique à celle obtenue par traitement à l'acide.

3. Comparaison des effets entre les stimulations négative et positive par décharge électrique en couronne:

Normalement, dans le cas d'une décharge électrique en couronne « négative », l'électrode en forme de peigne est la cathode et l'électrode en plaque est utilisée comme anode. Si l'on inverse la position des électrodes, la décharge électrique est dite « positive ». Afin de comparer l'effet de la stimulation par décharge électrique négative sur l'éclosion avec celui obtenu avec une décharge électrique positive, nous avons réalisé une série d'expériences dont les résultats sont présentés dans le tableau III.

Pour les deux différentes variétés, le taux d'éclosion après un jour et le taux d'éclosion pratique des groupes exposés pendant 1', 2,5' et 5' à une décharge électrique négative sont manifestement plus élevés que ceux obtenus par décharge électrique positive : le taux d'éclosion général et le taux d'oeufs bleus sont également supérieurs à ceux obtenus par décharge négative, à l'exception de quelques échantillons. Pour ce qui concerne le taux d'oeufs non bleus, l'effet obtenu avec la décharge électrique positive est supérieur à celui obtenu avec la décharge électrique négative. Il apparaît donc que l'effet d'éclosion obtenu avec la stimulation par décharge électrique négative est supérieur à celui obtenu avec la stimulation par décharge électrique positive.

Selon nos connaissances de l'électricité statique, lorsque la décharge électrique est négative, les particules en déplacement sont les électrons, qui sont libérés à partir de l'électrode négative (aiguilles en forme de peigne) et se déplacent en direction de l'anode. La plupart de ces particules qui entrent en collision avec les oeufs de vers à soie pendant leur déplacement ont un niveau d'énergie élevé. En situation positive, les particules en déplacement sont des particules d'air ionisées, de sorte que les oeufs de vers à soie sont bombardés par un courant d'ions à déplacement rapide. Le volume et la masse des ions étant supérieurs à ceux des électrons, leur capacité de pénétration est plus faible et l'effet de stimulation est donc inférieur à celui obtenu avec les électrons. Etant donné qu'un nombre plus faible d'oeufs diapausants sont activés, le taux d'éclosion est inférieur.

4. Résultats de l'élevage des vers à soie éclos artificiellement par décharge électrique en couronne:

4.1. Comparaison des résultats de la croissance et du développement pour les larves du premier et du deuxième âge :

Les données concernant la croissance et le développement des larves du premier et du deuxième âge chez les hybrides triples C2 et J2 sont présentées dans le tableau IV. Les données montrant les expériences répétées (deux croisements normaux et les deux réciproques) sont indiquées par l'analyse de variance pour le poids des larves en mue et le taux de mue tardive dans le tableau IV.

A la lecture du tableau IV, on note que la durée du développement ne présente aucune différence entre les groupes traités par décharge électrique en couronne et les groupes témoins. Le poids des larves en mue chez les hybrides C2 traités par décharge électrique en couronne est légèrement plus lourd que celui obtenu chez les témoins : on observe un résultat inverse chez les hybrides J2. La comparaison des hybrides normaux avec leur réciproque montre que le poids des hybrides réciproques de J2 est supérieur à celui du croisement normal C2. L'analyse de variance pour le poids des larves en mue dans le tableau V révèle que la valeur F pour les larves du premier et du deuxième âge issues des groupes exposés à la décharge électrique en couronne n'atteint pas un seuil significatif ; cependant, la valeur F pour les larves du premier âge chez les groupes répétés est significative. Ceci montre qu'il y a un effet maternel. Les parents femelles J2 étant des hybrides de croisements de souches japonaise, leurs oeufs sont plus grands et leur poids larvaire à l'éclosion plus élevé, ce qui explique que le poids des larves du premier âge chez J2 est plus élevé que celui des larves C2. L'effet maternel diminuant graduellement avec l'âge des larves, l'amplitude de l'augmentation du poids larvaire entre J2 et C2

diminue également avec l'âge larvaire. La valeur F à partir des larves du deuxième âge n'atteint donc pas un niveau significatif.

Les taux de mue tardive chez tous les groupes traités sont inférieurs à ceux obtenus chez les témoins, ce qui indique que la mue est uniforme pour les groupes exposés à une décharge électrique en couronne et les groupes traités par immersion dans l'acide. D'après les données du tableau IV, la performance des groupes exposés à une décharge électrique en couronne tend à être meilleure que celle du témoin mais la valeur F n'est pas significative (Tableau V). Ceci montre qu'il n'y a pas de différence pour ce qui concerne l'uniformité du développement chez les larves du premier et du deuxième âge entre les groupes exposés à une décharge électrique en couronne et les groupes témoins.

4.2. Comparaison des résultats d'élevage :

Les données concernant l'élevage des hybrides C2 et J2 à tous les âges des groupes exposés à une décharge électrique en couronne et ceux traités par immersion dans l'acide sont présentées dans le tableau VI. Le tableau VII donne l'analyse de variance pour quatre répétitions de données, dont deux concernent les hybrides triples normaux et les deux autres les hybrides réciproques.

La durée totale du stade larvaire et la durée du cinquième âge pour les groupes exposés à une décharge électrique en couronne et ceux traités par immersion dans l'acide sont présentées dans les tableaux VI et VII. Le rendement en cocons et le poids de la coque pour 10 000 larves du quatrième âge chez les groupes exposés à une décharge électrique en couronne de l'hybride C2 sont inférieurs de 4 à 6 % à ceux obtenus chez les groupes traités par immersion dans l'acide ; cependant on obtient les résultats inverses pour l'hybride J2, c'est-à-dire supérieurs d'environ 11 %. La valeur moyenne du groupe exposé à une décharge électrique en couronne est supérieure d'environ 2 à 5 % à celle du témoin. L'analyse de variance (Tableau VII) indique que la valeur F pour les groupes exposés à une décharge est significative, ce qui signifie qu'il n'y a en fait aucune différence entre les deux groupes pour ces paramètres.

Le taux de filage chez les groupes exposés à une décharge électrique en couronne de l'hybride C2 est inférieur d'environ 3 % à celui obtenu chez les groupes traités par immersion dans l'acide mais supérieur d'environ 8 % à celui obtenu chez l'hybride réciproque J2. La valeur moyenne des groupes exposés à une décharge électrique en couronne pour les deux hybrides est supérieure de près de 2,5 % à celle des groupes traités par immersion dans l'acide mais la valeur F de l'analyse de variance n'est pas significative.

Les valeurs, données ou caractères mesurant la qualité du cocon, le poids du cocon et le poids de la coque sont plus élevés chez les groupes exposés à une décharge électrique en couronne que chez le témoin, avec des résultats supérieurs respectivement d'environ 3,5 et 2,5 %. Bien que l'augmentation des tailles ne soit pas très importante, la tendance est à peu près la même chez les différents échantillons répétés ; c'est pourquoi la valeur F de l'analyse de variance n'atteint pas un niveau très significatif. Le fait que l'augmentation du poids du cocon chez les groupes exposés à une décharge électrique en couronne soit supérieure à celle du poids de la coque explique que la richesse soyeuse soit plus faible chez les groupes exposés à une décharge électrique en couronne que chez le témoin. Néanmoins, cette valeur présentant des fluctuations entre les différentes répétitions expérimentales, la valeur F n'atteint pas un niveau significatif.

A la lecture de ces résultats, nous pouvons penser qu'il n'y a pas de différence pour ce qui concerne la croissance et le développement ou le taux de survie des larves ou pour ce qui concerne la quantité et la qualité des cocons entre les groupes exposés à une décharge électrique en couronne et les groupes traités à l'acide. Il apparaît donc que l'utilisation de la technique de décharge électrique en couronne au lieu de la méthode par immersion dans l'acide pour faire éclore les oeufs artificiellement n'a pas d'effets négatifs sur l'élevage des vers à soie.

DISCUSSION

L'éclosion artificielle des oeufs diapausants par décharge électrique en couronne est une voie nouvelle de recherche pour les années 1990. Si cette technique peut être confirmée, améliorée et appliquée à l'échelle commerciale, elle pourrait entraîner une révolution dans l'éclosion artificielle des oeufs de vers à soie car elle permettrait d'éliminer le risque de pollution de l'environnement par

l'acide chlorhydrique, d'améliorer la santé des techniciens, de simplifier le processus de production et de réduire la main-d'oeuvre et les coûts généraux de production. On pense également que cette technique pourra servir pour de mettre en place un système d'éclosion permettant l'éclosion des oeufs diapausants à n'importe quelle époque de l'année.

On sait que la tension électrique, la longueur des aiguilles, la distance entre les aiguilles, la distance entre les électrodes et la durée peuvent affecter les résultats du traitement de stimulation par décharge électrique. Les données présentées ici ont été recueillies dans des conditions déterminées de voltage, de longueur d'aiguilles, de distance entre les aiguilles et de distance entre les électrodes, la durée de décharge électrique en couronne étant le seul paramètre variable. Une étude approfondie de la variation de ces paramètres est en projet visant à déterminer les conditions optimales d'éclosion.

Pour ce qui concerne le mécanisme d'éclosion, Sowers et Lieber (1986) ont suggéré que des orifices temporaires pénétrant dans les membranes plasmiques des cellules animales peuvent apparaître sous l'action d'un champ électrique à forte puissance. Nous pensons donc que le flux rapide d'électrons au cours de la décharge électrique en couronne ouvre des orifices temporaires qui pénètrent la membrane séreuse ou la membrane du vitellus des oeufs diapausants ; ceci pourrait permettre à des matériaux de passer librement à travers les membranes et entraîner des modifications importantes à l'intérieur de l'oeuf. De plus, l'énergie des électrons en déplacement pourrait donner lieu à des modifications de la structure et de la configuration des macromolécules, affectant les mouvements des cellules et des organes ainsi que l'activité enzymatique et déclenchant le processus du développement.

STUDIES ON HETEROSIS AND HETEROBELTIOSIS IN THE TASAR SILKWORM, *ANTHRAEA MYLITTA* D.

A.A. SIDDIQUI*

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

*Relative heterosis (over mid-parent) and heterobeltiosis (over better parent) for eight yield components, i.e., oviposition, hatching percentage, larval weight, larval duration, effective rate of rearing, cocoon weight, cocoon shell weight and absolute silk yield, were estimated in 24 crosses derived by crossing 8 female and 3 male parents of the tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Thirteen hybrids exhibited heterobeltiosis for absolute silk yield, effective rate of rearing and cocoon weight. In 12 hybrids, heterobeltiosis was observed for cocoon shell weight. Heterobeltiosis was also observed in 10, 9, 8 and 7 hybrids respectively for larval weight, oviposition, larval duration and hatching percentage. Maximum heterosis and heterobeltiosis were observed in the cross S₁₇ × N₅ (114.74% and 108.1%) for absolute silk yield. Heterobeltiosis can be used as a criterion in future breeding programmes.*

Keywords: *Antheraea mylitta* D., heterosis, heterobeltiosis, mid-parent, better parent, progeny.

INTRODUCTION

A knowledge of the extent and magnitude of heterosis helps in the choice of the best crosses for selection in the advanced generations to isolate superior segregates. Previous studies (Jolly *et al.*, 1969; Bardaiyar *et al.*, 1975; Sengupta *et al.*, 1987) on heterosis in the tasar silkworm, *A. mylitta* D., were confined to small cross combinations. The present investigation was therefore undertaken by crossing 8 female and 3 male parents in a line × tester design to determine the potential of heterosis in several crosses on various commercial characters.

MATERIALS AND METHODS

Eight different female parents, namely, GE₁, GE₂, GF₃, N₁, N₂, L₈, S₄ and S₁₇, and three male parents, i.e., N₅, Raily and RS, of *A. mylitta* D. and their 24 hybrids were reared in a randomised block design with four replications during the commercial crop 1988-89 at the Central Tasar Research and Training Institute, Nagri Farm, Ranchi. The number of larvae brushed in one disease-free laying was considered as one replication. Observations in respect of absolute silk yield, oviposition, hatching percentage, larval duration and effective rate of rearing were recorded separately for individual layings whereas larval weight, cocoon weight and cocoon shell weight were recorded considering 50 randomly selected cocoons (25 females and 25 males) in each replication. Heterosis and heterobeltiosis were computed over mid- and better parents, following the method of Kempthorne (1957). Heterosis and heterobeltiosis in percentage were calculated following the equations given below:

$$\text{Heterosis over mid parent (MP)} = \frac{\bar{F}_1 - \bar{MP}}{\bar{MP}} \times 100; \quad \text{Heterosis over better parent (BP)} = \frac{\bar{F}_1 - \bar{BP}}{\bar{BP}} \times 100$$

* Present address: P-3, Basic Seed Farm Majra - 248 171, Dehradun, India.

where,

$\bar{F}_1$ = Mean of F_1 generation

$\bar{MP}$ = mean of the two parental values

$\bar{BP}$ = mean of the better parent value

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance indicated significant differences for all the characters among the progenies. The progeny means of each character are presented in Table I and estimates of heterosis over better parent is depicted in Table III.

Absolute silk yield:

Heterosis over the mid-parent for the absolute silk yield ranged from -45.41 to +114.74 and from -53.08 to +108.19% over the better parent. Only 12 of the 24 hybrids showed positive and significant heterosis over the mid-parent and only 6 over the better parent. Of the 3 males two, namely, RS and N_5 , appeared to be very good combiners in seven and six crosses out of the 8 cross combinations in which these two were involved as the male parent (Table II).

Oviposition:

For oviposition, heterosis over the mid-parent ranged from -17.96 to +30.99% and from -23.59 to +20.83% over the better parent. Only one male parent, i.e., RS, was found to be a very good combiner in all eight crosses. Eight and 5 hybrids out of the 24 hybrid combinations exhibited positive and significant heterosis over the mid- and better parent, respectively.

Hatching:

For the hatching percentage, heterosis ranged from -25.82 to +38.27% over the mid-parent and from -37.32 to +25.65% over the better parent. Out of the 24 hybrids, 8 hybrids over the mid-parent and 5 hybrids over the better parent showed positive and significant heterosis. Maximum heterosis over the mid-parent and better parent were 38.27% and 25.65%, respectively, for cross $GE_2 \times N_5$. The parents N_5 and RS were found to be better combiners.

Larval weight:

For the larval weight, heterosis ranged from -6.52 to +8.77% over the mid-parent and from -8.56 to +6.63% over the better parent. Only 8 crosses showed positive and significant heterosis over the mid-parent and 5 crosses over the better parent. Maximum heterosis over the mid-parent and better parent was shown by $GE_2 \times RS$ (8.77%) and $N_2 \times N_5$ (6.63%), respectively.

Larval duration:

A shorter larval duration, or early maturity, is a beneficial character in tasar culture, hence heterosis has been calculated for shorter larval duration. Heterosis ranged from +13.6 to -12.93% over the mid-parent and +11.81 to -18.99% over the better parent. The cross $N_1 \times N_5$ exhibited the highest negative and significant heterosis over mid- and better parents, respectively. The F_1 population or the cross showed minimum larval duration and, thereby, matured early.

Effective rate of rearing:

For the effective rate of rearing, heterosis ranged from -46.43 to +77.55% over the mid-parent and -53.61 to +63.43 over the better parent. Heterobeltiosis was observed in 10 hybrids. The average heterosis was found to be over the mid-parent 30.48% and 24.25% over the better parent. Only 12 and 10 hybrids showed a positive and significant heterosis over mid- and better parent, respectively. The maximum heterosis was found in the hybrid $S_{17} \times N_5$ both over mid- and better parents (77.55 and 63.43%).

Table I. Means of parents and their hybrids for eight characters.

Tableau I. Moyennes des parents et de leurs hybrides pour huit caractères.

Progeny	Fecundity (no.)	Hatching (%)	Larval weight (g)	Larval duration (days)	Effective rate of rearing (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Absolute silk yield (g)
<i>Descendants</i>	<i>Fécondité (nombre)</i>	<i>Éclosion (%)</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>	<i>Taux effectif d'élevage (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Rendement absolu en soie (g)</i>
Lines / Lignées								
GE ₁	209.00	69.86	37.53	33.00	39.79	12.88	1.99	129.30
GE ₂	270.00	66.61	39.28	32.75	43.07	13.79	1.99	155.76
GF ₃	390.00	58.40	35.70	30.75	44.98	13.53	2.08	195.92
N ₁	273.00	59.14	35.41	39.50	44.17	12.36	1.81	129.09
N ₂	286.00	57.31	36.66	34.00	59.61	12.55	1.99	191.21
L ₈	307.00	53.09	35.68	35.00	38.60	13.42	2.10	114.90
S ₄	292.75	62.95	37.35	34.00	57.33	13.59	2.07	205.95
S ₁₇	364.5	58.60	37.67	32.50	35.26	12.87	1.92	147.29
Testers / Mâles								
N ₈	290.75	62.99	36.42	34.00	41.93	12.26	1.90	138.32
Railly	331.75	71.43	37.46	34.00	53.14	12.91	2.02	244.54
RS	234.00	83.88	37.32	31.75	48.87	13.45	2.10	203.77
Hybrids / Hybrides								
GE ₁ × N ₈	307.50	65.59	35.25	33.25	46.90	13.12	2.01	145.87
GE ₁ × Railly	273.25	75.98	36.47	32.75	42.45	12.74	1.89	158.94
GE ₁ × RS	270.00	52.58	39.28	33.75	72.16	13.13	1.96	201.48
GE ₂ × N ₈	272.50	89.59	37.01	35.50	58.55	13.40	1.97	289.08
GE ₂ × Railly	314.00	58.41	37.32	32.00	48.64	13.36	2.09	186.54
GE ₂ × RS	282.75	64.36	41.66	34.00	57.53	12.64	1.98	214.29
GF ₃ × N ₈	400.50	49.28	36.96	35.25	42.82	12.79	2.06	167.02
GF ₃ × Railly	350.00	58.29	35.78	34.00	26.77	13.69	2.21	120.22
GF ₃ × RS	302.25	78.26	34.13	35.50	44.74	12.98	2.01	208.64
N ₁ × N ₈	321.75	45.30	36.42	32.00	63.20	12.68	1.92	178.50
N ₁ × RS	266.50	75.16	38.18	32.50	58.67	13.72	2.20	255.16
N ₂ × N ₈	271.25	69.87	38.83	34.25	44.75	13.75	2.16	178.10
N ₂ × Railly	253.50	61.74	37.77	35.25	63.17	13.54	2.21	259.64
N ₂ × RS	304.75	64.38	34.54	33.50	42.92	12.55	2.07	180.69
L ₈ × N ₈	250.75	65.94	36.42	31.00	55.43	12.79	1.92	185.76
L ₈ × Railly	282.00	72.94	34.98	35.00	28.81	13.76	2.01	116.81
L ₈ × RS	301.75	60.31	36.00	32.75	56.40	13.55	2.16	203.07
S ₄ × N ₈	293.25	61.56	39.21	34.25	26.59	13.16	2.02	96.64
S ₄ × Railly	294.00	55.99	38.10	33.00	45.67	12.91	1.01	148.72
S ₄ × RS	299.75	65.68	35.24	32.50	57.45	14.06	2.26	297.21
S ₁₇ × N ₈	304.00	75.84	38.18	33.25	68.53	13.19	2.03	306.65
S ₁₇ × Railly	286.75	67.75	38.89	34.00	44.69	13.40	2.14	143.66
S ₁₇ × RS	301.75	71.49	37.50	34.75	56.58	13.45	2.01	228.93
Mean / Moyenne	281.61	65.36	37.04	33.65	49.30	13.17	2.04	188.25
CD at 5%	10.50	3.66	1.48	1.48	3.98	0.79	0.39	8.71

Cocoon weight:

A positive and significant heterosis was recorded in 13 crosses over mid-parent and in 5 crosses over the better parent for the cocoon weight. Heterosis ranged from -7.21 to +10.82% over the mid-parent and -8.34 to 9.56% over the better parent. The heterosis over the mid-parent and the better parent was maximum in the cross $N_2 \times N_5$, being 10.82% and 9.56%, respectively.

Table II. Estimates of the degree of heterosis (%) over the mid-parent for eight characters.**Tableau II. Estimation du degré d'hétérosis (%) par rapport au parent moyen pour huit caractères.**

Hybrids	Fecundity	Hatching	Larval weight	Larval duration	Effective rate of rearing	Cocoon weight	Cocoon shell weight	Absolute silk yield
<i>Hybrides</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Écllosion</i>	<i>Poids larvaire</i>	<i>Durée larvaire</i>	<i>Taux effectif d'élevage</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Rendement absolu en soie</i>
GE ₁ × N ₅	+23.06**	-1.25	-4.66	-0.75	+14.78*	+4.41*	+3.15	+9.02
GE ₁ × Raily	+1.06	+7.56*	-2.74	-2.24	-8.65	-1.19	-5.68	-15.24
GE × RS	+21.90**	-31.60	+4.95*	+4.25	+62.76**	-0.28	-4.27	+20.99*
GE ₂ × N ₅	-2.94	+38.27**	-2.22	+6.37*	+37.76**	+2.89*	+1.16	+96.60**
GE ₂ × Raily	+4.23	-15.37	-2.75	-4.12*	+1.12	+0.10	+4.24	-6.80
GE ₂ × RS	+12.04	-14.46	+8.77**	+5.43**	+25.14**	-7.21	-3.24	+19.21*
GF ₃ × N ₅	+17.62*	-18.81	+2.50*	+8.88**	-1.46	-0.80	+3.46	-0.06
GF ₃ × Raily	-3.05	-10.21	-2.20	+5.02**	-45.44	+3.55*	+7.76**	-45.41
GF ₃ × RS	-3.16	+10.01*	-6.52	+13.60**	-4.66	-3.82	-3.71	-4.40
N ₁ × N ₅	+13.99**	-25.82	+1.40	-12.93**	+46.82**	+3.00*	+3.78*	+33.51**
N ₁ × Raily	-14.70	+18.07*	-1.91	-11.56**	+33.45**	+2.36*	+8.25**	+40.07**
N ₁ × RS	+4.97	+5.10	+5.00**	-8.77*	+26.13*	+6.36**	+12.53**	+53.32**
N ₂ × N ₅	-5.95	+16.16*	+6.27**	+0.74	-11.87	+10.04**	+11.01**	8.09
N ₂ × Raily	-17.96	-4.08	+1.93	+3.68*	+12.10*	+6.36**	+10.22**	+19.17*
N ₂ × RS	+30.94**	-8.80	-0.61	+1.90	-20.88	-3.49	-1.10	-8.51
L ₈ × N ₅	-16.10	+13.61*	+1.03	-10.14**	+37.64**	-0.39	-3.63	+46.72**
L ₈ × Raily	-11.70	+17.15*	-4.34	+1.45	-37.20	+4.48*	-2.19	-35.01
L ₈ × RS	+11.55*	-11.94	-1.37	-1.87	+28.95**	+0.81	+3.04	+27.45**
S ₄ × N ₅	+0.51	-2.24	+6.32**	+0.74	-46.43	+1.82	+1.77	-43.85
S ₄ × Raily	-5.84	-16.67	+1.84	-2.94	-17.31	-2.60	-1.47	-33.98
S ₄ × RS	+13.31	-10.54	-5.62	-1.14	+8.19	+4.02*	+8.34**	+45.08**
S ₁₇ × N ₅	-7.21	+24.76**	+3.06*	+0.00	+77.55**	+4.94**	+6.22	+114.74**
S ₁₇ × Raily	-17.63	+4.21	+3.53*	+2.26	+1.10	+3.95*	+8.57**	-26.68
S ₁₇ × RS	+0.84	+0.35	+0.01	+8.17	+34.50**	+2.19*	+0.00	+30.42**

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

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

Cocoon shell weight:

Heterosis for cocoon shell weight ranged from -5.68 to +12.53 over the mid-parent and -6.78 to +9.43% over the better parent. The maximum heterosis was found in the cross $N_1 \times RS$ (12.58%) over the mid-parent and in the cross $N_2 \times Raily$ (9.43%) over the better parent. Raily was found to be a better combiner as a male parent for this trait.

The extent of heterosis was measured in two ways, i.e., over mid-parent and better parent values, in the present investigation for absolute silk yield and its components. The higher percentage of crosses showing heterosis over the mid-parent for absolute silk yield, effective rate of rearing, cocoon weight and cocoon shell weight revealed that the majority of the cross combinations had heterosis in the desired direction but the percentage of heterotic crosses over the better parent was less than 50% for all characters except absolute silk yield. Falconer (1964) reported that the progeny of wide crosses are often less fit and unproductive than their parents. Consequently, crosses showing heterosis over the better parent were few.

Table III. Estimates of the degree of heterosis (%) over the better parent.

Tableau III. Estimation du degré d'hétérosis (%) par rapport au meilleur parent.

Hybrids	Absolute silk yield	Fecundity	Hatching	Larval weight	Larval duration	Effective rate of rearing	Cocoon weight	Cocoon shell weight
Hybrides	Rendement absolu en soie	Fécondité	Éclosion	Poids larvaire	Durée larvaire	Taux effectif d'élevage	Poids du cocon	Poids de la coque
GE ₁ × N ₅	-5.46	+5.76	-6.11	-6.08	-2.21	+11.85*	+1.86	+1.00
GE ₁ × Raily	-35.21	-17.63	+6.37*	-2.82	-3.68	-20.12	-1.34	-6.20
GE ₁ × RS	-1.12	+15.38**	-37.32	+4.68*	+1.27	+47.64**	-2.42	-6.78
GE ₂ × N ₅	85.59**	-6.28	+25.65**	-5.78	+4.41*	+35.94**	-2.83	-1.00
GE ₂ × Raily	-23.72	-5.35	-18.22	-4.99	-5.88*	-8.46	+3.48*	+3.60*
GE ₂ × RS	5.17	+20.83**	-23.27	+6.06*	+3.82*	+17.71**	-8.34	-5.83
GE ₃ × N ₅	-14.75	+2.69	-21.76	+1.49	+3.68*	-4.80	-5.47	-0.96
GE ₃ × Raily	-50.84	-10.26	-18.40	-4.50	±0.00	-49.63	+1.18	+6.25**
GE ₃ × RS	2.39	-2.25	-6.70	-8.56	+11.81**	-8.46	-4.06	-4.28
N ₁ × N ₅	29.06**	+10.66*	-28.08	+0.00	-18.99**	+43.08**	2.59	+1.32
N ₁ × Raily	7.01	-22.16	+7.92*	-4.60	-17.72**	+5.97	+0.15	+2.61
N ₁ × RS	25.22**	+13.89**	-10.40	+2.30	-17.72**	+20.05**	+2.03	+4.76**
N ₂ × N ₅	6.86	-6.71	+10.93*	+6.63*	+0.74	-24.93	+9.56**	+8.54**
N ₂ × Raily	6.17	-23.59	-13.56	+0.83	+3.68	+5.97	+4.88**	+9.43**
N ₂ × RS	-11.33	+19.14**	-23.25	-7.45	-1.47	-28.99	-6.71	-1.66
L ₈ × N ₅	34.30**	-18.32	+4.69	±0.00	-11.42**	+32.18**	-4.69	-8.57
L ₈ × Raily	-52.23	-15.00	+2.11	-6.62	±0.00	-45.79	+2.53	-0.49
L ₈ × RS	-0.34	-1.71	-28.10	-3.54	-6.43**	+15.40*	+0.71	+2.85
S ₄ × N ₅	-53.08	+0.17	-2.27	+4.98*	+0.74	-53.61	-3.16	-2.42
S ₄ × Raily	-39.19	-11.38	-21.62	+1.69	-2.94	-20.34	-5.00	-2.90
S ₄ × RS	-44.31**	+2.39	-21.70	-5.65	-4.41*	+0.21	+3.46*	+7.37**
S ₁₇ × N ₅	108.19**	-16.60	+20.41**	+1.35	-2.21	+63.43**	+2.49	+5.73**
S ₁₇ × Raily	-41.26	-21.33	-5.15	+3.24*	±0.00	-15.91	+3.76*	+6.08**
S ₁₇ × RS	12.35	-17.21	-14.77	-0.45	+6.92**	+15.77**	+0.00	-4.28

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

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

Previous studies on heterosis carried out in small crosses with *A. mylitta* by Jolly *et al.* (1969) and Bardaiyar *et al.* (1975) did not reveal any encouraging heterosis. However, Sengupta *et al.* (1987) reported appreciable heterosis in different commercial characters; The present studies also indicate a

sufficient potential heterosis for all the characters (Table IV). The difference in heterosis might be due to several reasons, such as genetic diversity of the parent used, favourable conditions and leaf quality in the experiment and non-allelic interaction which can either increase or decrease the expression of heterosis. However, in the present investigation, considerable heterosis in certain hybrids for different characters over the mid-parent and better parent gives sufficient indication that both dominance and epistasis were involved in such cases. Fonseca and Patterson (1968) emphasised that, in the utilisation of heterosis in commercial crops, only the vigour in the excess of that of the better parent, i.e., heterobeltiosis, is of significance. The crosses $S_{17} \times N_5$, $GE_2 \times N_5$, $S_4 \times RS$ and $L_8 \times N_5$ can be exploited for obtaining potential heterosis for absolute silk yield as these crosses expressed heterosis over the better parent (heterobeltiosis) since absolute silk yield is multiplicative of its various components.

Table IV. Maximum magnitude of heterosis of the promising hybrids for eight characters.

Tableau IV. Amplitude maximale de l'hétérosis chez les hybrides prometteurs pour huit caractères.

Character	Cross	Cross expressed highest value		Number of significant crosses expressed heterobeltiosis
		over mid-parent	over better parent	
Caractère	Croisement	Valeur maximale du croisement		Nombre de croisements exprimant une hétérobeltiosis
		par rapport au parent moyen	par rapport au meilleur parent	
Absolute silk yield <i>Rendement en soie</i>	$S_{17} \times N_5$	114.74**	108.19**	6
Fecundity <i>Fécondité</i>	$N_2 \times RS$	30.99**	19.14**	5
Hatching percentage <i>Taux d'éclosion</i>	$GE_2 \times RS$	12.04*	20.83**	5
	$GE_2 \times N_5$	38.27**	25.65**	5
Larval weight <i>Poids larvaire</i>	$GE_2 \times RS$	8.77**	6.06**	5
	$N_2 \times N_5$	6.27**	6.63**	
Larval duration / <i>Durée larvaire</i>	$N_1 \times N_5$	-12.93**	-18.99**	4
Effective rate of rearing <i>Taux effectif d'élevage</i>	$S_{17} \times N_5$	77.55**	63.43*	10
Cocoon weight / <i>Poids du cocon</i>	$N_2 \times N_5$	10.84**	9.56**	5
Cocoon shell weight <i>Poids de la coque</i>	$N_1 \times RS$	12.53**	4.76*	8
	$N_2 \times Raily$	10.22**	9.43**	

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

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

REFERENCES

BARDAIYAR V.N., JOLLY M.S., BENCHAMIN K.V., SINHA B.R.R.Pd. (1975) Heterosis in relation to single-, three-way and double crosses in *Antheraea mylitta* D. Indian J. Seric., 15, 3-8.

- FALCONER D.S. (1964) Introduction to Quantitative Genetics. p. 262, Oliver and Boyd, Edinburgh, London.
- FONSECA S., PATTERSON F.L. (1968) Hybrid vigour in seven parent diallel crosses in common winter wheat. *Crop Sci.*, 6, 382-383.
- JOLLY M.S., BARDAIYAR V.N., NARASIMHANNA M.N., RAJDAN D.L. (1969) Diallel cross analysis of quantitative characters of four races of Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. *Indian J. Seric.*, of, 25-33.
- KEMPTHORNE O. (1957) An Introduction to Genetical Statistics. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- SENGUPTA A.K., SIDDIQUI A.A., DASMOHAPATRA D.P., AJIT KUMAR, SENGUPTA K. (1987) Studies on the potentials of heterosis in tropical tasar, *Antheraea mylitta* D. *Sericologia*, 27(3), 519-524.

ETUDE SUR L'HÉTÉROSIS ET L'HÉTÉROBELTIOSIS CHEZ LE VER À SOIE TASAR, *ANTHRAEA MYLITTA* D.

A.A. SIDDIQUI*

Central Tassar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi - 835 303, Bihar, Inde.

*On a estimé l'hétérosis relative (par rapport au parent moyen) et l'hétérobeliosis (hétérosis par rapport au meilleur parent) pour huit composants du rendement, à savoir l'oviposition, le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire, la durée larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon, le poids de la coque et le rendement absolu en soie, chez 24 croisements issus de huit parents femelles et de trois parents mâles chez le ver à soie tassar tropical *Antheraea mylitta* D. Treize hybrides donnent une hétérobeliosis positive pour le rendement absolu en soie, le taux effectif d'élevage et le poids du cocon. Douze hybrides présentent une hétérobeliosis positive pour le poids de la coque. L'hétérobeliosis a également été observée chez dix hybrides pour le poids larvaire, neuf hybrides pour l'oviposition, huit hybrides pour la durée larvaire et sept hybrides pour le pourcentage d'éclosion. L'hétérosis et l'hétérobeliosis sont maximales (114,74 % et 108,1 %) chez le croisement S₁₇ × N₅ pour le rendement absolu en soie. L'hétérobeliosis peut être utilisée comme critère dans les programmes de sélection.*

INTRODUCTION

La connaissance de l'étendue et de l'amplitude de l'hétérosis permet de choisir les meilleurs croisements afin de sélectionner des ségrégues supérieurs aux générations suivantes. Les études réalisées sur l'hétérosis chez le ver à soie tassar *A. mylitta* D. (Jolly et coll., 1969 ; Bardaiyar et coll., 1975 ; Sengupta et coll., 1987) se limitent à un nombre faible de combinaisons de croisements. Cette étude, qui porte sur le croisement de huit parents femelles avec trois parents mâles selon une configuration lignée × race de référence, a donc été réalisée afin de déterminer le potentiel d'hétérosis pour divers caractères commerciaux chez plusieurs croisements.

MATERIELS ET METHODES

Huit parents femelles (GE₁, GE₂, N₁, N₂, L₈, S₄ et S₁₇) et trois parents mâles (N₅, Raily et RS) d'*A. mylitta* D. et leurs 24 hybrides ont été élevés selon la méthode des blocs aléatoires en quatre répétitions au cours de la période d'élevage commercial 1988-89 à la ferme de Nagri du *Central Tassar Research and Training Institute* (Ranchi, Inde). Chaque répétition est composée du nombre de larves levées pour une ponte saine. Les observations concernant le rendement absolu en soie, l'oviposition, le pourcentage d'éclosion, la durée larvaire et le taux effectif d'élevage ont été notées individuellement pour chaque ponte tandis que les observations sur le poids larvaire, le poids du cocon et le poids de la coque ont enregistré à partir de 50 cocons prélevés au hasard (25 femelles et 25 mâles) dans chaque répétition. L'hétérosis et l'hétérobeliosis ont été calculées par rapport au parent moyen et au meilleur parent suivant la méthode de Kempthorne (1957). L'hétérosis et l'hétérobeliosis ont été calculées en pourcentage selon les équations suivantes :

$$\begin{array}{l} \text{Hétérosis par rapport au parent moyen (MP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{MP}}{\overline{MP}} \times 100 ; \quad \text{Hétérosis par rapport au meilleur parent (BP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{BP}}{\overline{BP}} \times 100 \end{array}$$

* Adresse actuelle : P-3, Basic Seed Farm, Majra - 248 171, Dehradun, Inde.

$\overline{F_1}$ = moyenne de la génération F1

$\overline{MP}$ = moyenne des deux valeurs parentales

$\overline{BP}$ = moyenne des valeurs du meilleur parent

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse de variance fait apparaître une différence significative entre les descendants pour tous les caractères étudiés. Les moyennes des descendants obtenues pour chaque caractère sont présentées dans le tableau I et l'hétérosis estimée par rapport au meilleur parent est présentée dans le tableau III.

Rendement absolu en soie :

L'hétérosis pour le rendement absolu en soie varie de -45,41 à +114,74 % par rapport au parent moyen et de -53,08 à +108,19 % par rapport au meilleur parent. Seulement 14 des 24 hybrides présentent une hétérosis positive et significative par rapport au parent moyen et 6 hybrides présentent une hétérosis positive par rapport au meilleur parent. Deux des trois mâles, c'est-à-dire RS et N₅, se révèlent être de bons combineurs pour sept et six croisements respectivement parmi les huit croisements dans lesquels ils sont utilisés comme parents mâles (Tableau II).

Oviposition :

Pour ce qui concerne l'oviposition, l'hétérosis varie de -17,96 à +30,99 % par rapport au parent moyen et de -23,59 à 20,83 % par rapport au meilleur parent. Un seul mâle, RS, est un excellent combineur pour les huit croisements. Sur les 24 combinaisons, huit hybrides présentent une hétérosis positive et significative par rapport au parent moyen et cinq hybrides présentent une hétérosis positive et significative par rapport au meilleur parent.

Pourcentage d'éclosion :

Pour ce qui concerne le pourcentage d'éclosion, l'hétérosis varie de -25,82 à +38,27 % par rapport au parent moyen et de -37,32 à 25,65 % par rapport au meilleur parent. Sur les 24 combinaisons, 8 hybrides présentent une hétérosis positive et significative par rapport au parent moyen et 5 hybrides présentent une hétérosis positive et significative par rapport au meilleur parent. Le croisement GE₂ × N₅ donne l'hétérosis maximale par rapport au parent moyen (38,27 %) et au meilleur parent (25,65 %). Les parents N₅ et RS sont de meilleurs combineurs.

Poids larvaire :

Pour ce qui concerne le poids larvaire, l'hétérosis varie de -6,52 à +8,77 % par rapport au parent moyen et de -8,56 à +6,63 % par rapport au meilleur parent. Seulement 8 croisements présentent une hétérosis positive et significative par rapport au parent moyen et 5 croisements par rapport au meilleur parent. Les croisements GE₂ × RS et N₂₁ × N₅ donnent l'hétérosis maximale de 8,77 % par rapport au parent moyen et de 6,63 % par rapport au meilleur parent.

Durée larvaire :

Une durée larvaire courte, ou maturité précoce, étant un caractère recherché pour l'élevage tassar, l'hétérosis a été calculée en fonction de la brièveté de la durée larvaire. L'hétérosis varie de +13,6 à -12,93 % par rapport au parent moyen et de +11,81 à -18,99 % par rapport au meilleur parent. Le croisement N₁ × N₅ présentent une hétérosis négative maximale et significative par rapport au parent moyen et au meilleur parent. La population F₁ ou le croisement présentant une durée larvaire minimale arrive à maturité rapidement.

Taux effectif d'élevage :

Pour ce qui concerne le taux effectif d'élevage, l'hétérosis varie de -46,43 à +77,55 % par rapport au parent moyen et de -53,61 à +63,43 par rapport au meilleur parent. Dix hybrides présentent une hétérobeltiosis. L'hétérosis moyenne est de 30,48 % par rapport au parent moyen et de 24,25 % par rapport au meilleur parent. Douze hybrides présentent une hétérosis positive et significative par

rapport au parent moyen et 10 hybrides par rapport au meilleur parent. L'hybride S₁₇ donne l'hétérosis maximale par rapport au parent moyen (77,55 %) et au meilleur parent (63,43 %).

Poids du cocon :

Pour le poids du cocon, l'hétérosis est positive et significative chez treize croisements par rapport au parent moyen et chez cinq croisement par rapport au meilleur parent. L'hétérosis varie de -7,21 à +10,82 % par rapport au parent moyen et de -8,34 à +9,56 % par rapport au meilleur parent. Le croisement N₂ × N₅ donne l'hétérosis maximale par rapport au parent moyen (10,82 %) et au meilleur parent (9,56 %).

Poids de la coque :

L'hétérosis pour le poids de la coque varie de -5,68 à +12,53 % par rapport au parent moyen et de -6,78 à +9,43 % par rapport au meilleur parent. L'hétérosis est maximale chez le croisement N₁ × RS par rapport au parent moyen (12,58 %) et chez le croisement N₂ × Raily par rapport au meilleur parent (9,43 %). Raily est un combineur supérieur pour ce caractère.

Dans cette étude, l'amplitude de l'hétérosis pour le rendement en soie et ses composants a été calculée de deux façons : par rapport aux valeurs obtenues pour le parent moyen et à celles obtenues pour le meilleur parent. Le fait qu'un pourcentage plus élevé de croisements présente une hétérosis positive par rapport au parent moyen pour le rendement absolu en soie, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et le poids de la coque révèle que la majorité des combinaisons ont une hétérosis dans la direction souhaitée ; cependant le pourcentage de croisements présentant une hétérosis positive par rapport au meilleur parent est inférieur à 50 % pour tous les caractères considérés à l'exception du rendement absolu en soie. Falconer (1964) a observé que les descendants de croisements larges sont souvent moins performants et moins productifs que leurs parents. Ceci explique que peu de croisements présentent une hétérosis par rapport au meilleur parent.

Des études réalisées pour un faible nombre de croisements chez *A. mylitta* par Jolly et coll. (1969) et Bardaiyar et coll. (1975) n'ont révélé aucune hétérosis encourageante. Cependant, Sengupta et coll. (1987) ont observé une hétérosis appréciable pour plusieurs caractères commerciaux. Cette étude fait également apparaître une hétérosis potentielle suffisante pour tous les caractères (Tableau IV). La différence d'hétérosis peut être due à plusieurs facteurs comme la diversité génétique des parents utilisés, des conditions favorables, la qualité des feuilles utilisées dans les expériences ainsi que l'interaction non allélomorphe qui peut entraîner une diminution ou une augmentation de l'expression de l'hétérosis. Cependant, dans cette étude, l'hétérosis considérable obtenue pour différents caractères par rapport au parent moyen et au meilleur parent chez certains hybrides montre clairement que la dominance et l'épistasie sont impliquées dans ces cas. Fonseca et Patterson (1968) ont souligné que seule la vigueur dépassant celle du meilleur parent, c'est-à-dire l'hétérobeltiosis, est considérée comme importante dans le cadre d'une exploitation commerciale de l'hétérosis. Les croisements S₁₇ × N₅, GE₂ × N₅, S₄ × RS et L₈ × N₅ peuvent être exploités pour obtenir une hétérosis potentielle pour le rendement en soie car ces croisements expriment une hétérosis positive par rapport au meilleur parent (hétérobeltiosis) pour ce caractère, qui est multiplicatif de ses différents composants.

LEAF NUTRITIVE QUALITY ASSOCIATED WITH MATURITY LEVELS IN FOURTEEN IMPORTANT VARIETIES OF MULBERRY (*MORUS* SPP.)

U.D. BONGALE, CHALUVACHARI, R.S. MALLIKARJUNAPPA, B.V. NARAHARI RAO,
M.N. ANANTHARAMAN & S.B. DANDIN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI), Thalaghattapura,
Kanakapura Road, Bangalore - 560 062, India.

*Fourteen selected mulberry varieties belonging to *Morus indica* L., *M. alba* L. and *M. multicaulis* P. (all diploids) maintained in the Mulberry Germplasm at the Institute's campus were studied with respect to leaf moisture, protein, sugar and chlorophyll contents for 4 harvests during February 1991 to December 1992. Observations were recorded in respect of different maturity levels (tender, medium, mature and overmature leaves) and growth periods (30, 45, 60, 75, 90 and 120 days). Faster rates of depletion of leaf moisture, sugar and protein contents at 75 days to 90 days growth periods were recorded in general among the varieties. Differential patterns of leaf quality variations among the varieties studied were of special interest. The three exotic varieties (Acc. No. 79, English Black and Kosen) recorded lower rates of nutrient depletion over the growth periods studied. Significance of observations in the context of the need for selection of superior varieties is discussed.*

Keywords: Mulberry, *Morus*, leaf quality, silkworm nutrition, feed value.

INTRODUCTION

Leaf quality differences among the varieties and maturity levels, and depletion of leaf nutritive quality over the growth periods are of special importance in mulberry (*Morus* sp. of the family Moraceae) in view of its feed value for the monophagous silkworm, *Bombyx mori* L. It is an important parameter used for evaluation of genotypes aimed at selection of superior varieties for rearing performance (Narayanan *et al.*, 1967; Krishnaswami *et al.*, 1970a, 1970b; Gabriel and Rapsuas, 1976; Shikata *et al.*, 1980; Askari and Sharan, 1982; Machii and Katagiri, 1990; Das *et al.*, 1993). Leaf quality often implies mainly the leaf moisture content, thereby ignoring other nutritive components. The majority of available reports on this subject do not cover variabilities of specific components in mulberry varieties at different maturity levels responsible for differential performances of silkworm cocoon crops (Rangaswami *et al.*, 1976; Fotadar *et al.*, 1989; Sinha *et al.*, 1993). The present study was undertaken in view of this lacuna in the available information.

MATERIALS AND METHODS

The fourteen Germplasm varieties selected for the present study include traditional local varieties (Mysore Local and Mother Graft), improved popular varieties (M-5 and Berhampore S-1), improved high-yielding varieties (S-54 S-36, DD, RFS-135, RFS-175 and Berhampore-763), and temperate exotic varieties (English Black, Acc. No. 79, KNG and Kosen). The varieties under study (Table I) are diploids and belong to *M. indica* L. (Sl Nos. 1 to 10), *M. alba* L. (Sl Nos. 11, 12 and 13) and *M. multicaulis* P. (Sl No. 14). These varieties were maintained uniformly in a single batch at the

Table I. Details of the mulberry germplasm bank varieties selected for the study.

Tableau I. Description des variétés de mûrier issues de la banque génétique sélectionnées pour cette étude.

Sl no.	Mulberry varieties	Acc. no.	Ploidy levels	Mulberry species	Origin
N° de série	Variétés de mûrier	N° de référence	Niveaux de ploïdie	Espèce de mûrier	Origine
01	Mysore Local	07	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Karnataka (traditional cultivar) (cultivar traditionnel)
02	Mother Graft	22	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Delhi (collection)
03	Grafton mère Kanva 2 (M5)	01	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Karnataka (OPH selection from M. Local) (sélectionné à partir de Mysore local)
04	Berhampore-S1	17	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	West Bengal (popular selected variety) Bengale occidentale (variété populaire sélectionnée)
05	S-54	12	Diploid <i>Diploïde</i>	Mutant of S-1 <i>Mutant de S-1</i> <i>M. indica</i> L.	Evolved at CSRTI Mysore Isolé au CSRTI de Mysore
06	S-36	10	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Evolved at CSRTI Mysore Isolé au CSRTI de Mysore
07	DD (Viswa)	04	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Dehradun (collection)
08	RFS-135	13	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Evolved at CSRTI Mysore Isolé au CSRTI de Mysore
09	RFS-175	14	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Evolved at CSRTI Mysore Isolé au CSRTI de Mysore
10	Berhampore-763	124	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. indica</i> L.	Evolved at CSRTI Mysore Isolé au CSRTI de Mysore
11	English Black	65	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. alba</i> L.	France (collection)
12	Acc. No. 79 (Masamidoria)	79	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. alba</i> L.	Japan (collection) Japon
13	KNG	81	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. alba</i> L.	Japan (collection) Japon
14	Kosen	64	Diploid <i>Diploïde</i>	<i>M. multicaulis</i> P.	Japan (collection) Japon

Institute's campus located at 12°57' N latitude and 77°31' E longitude and an altitude of 839 meters above MSL (Anonymous, 1973). Annual mean maximum and minimum temperatures were 27.4 °C and 19.5 °C during 1991, and 27.8 °C and 18.8 °C during 1992, annual precipitation recorded was 1,440 mm and 936.8 mm during 1991 and 1992. Plants were maintained at a spacing of 90 × 105 cm under irrigated conditions with 20 tonnes farmyard manure/ha/year applied during August. Fertiliser dosages of 60:60:60 kg/ha NPK as complex and 60 kg N/ha as urea were applied for the harvests commencing from August and February, respectively. The soil was of red sandy loam type with pH 7.8, EC 0.21 mmhos/cm, OC 0.65%, Kjeldahl N 0.19%, P 10 kg/acre and K 113 kg/acre. An annual two-harvest schedule was followed by giving basal pruning at an interval of six months each with a crown height of 45 cm from the ground level. Leaf samples were drawn from five randomly selected plants in each of the varieties at identified growth periods and maturity levels representing tender-I.

tender-2, medium, mature, overmature-1 and overmature-2 leaves at 30, 45, 60, 75, 90 and 120 days after pruning, respectively. Among these maturity levels, tender-2, medium and mature leaves represented young age (40-50 d), fourth instar (55 to 60 d) and fifth instar (65 to 75 d) larval feeding normally followed, and overmature-1 represented fifth instar feeding for delayed brushings; tender-1 and overmature-2 stages were included for comparison. The leaf samples thus collected were processed, preserved and used in triplicate for the analysis of soluble protein (Lowry *et al.*, 1951), total sugar (Dubios *et al.*, 1956), and total chlorophyll (Arnon, 1949) contents; parallel samples were used for recording the leaf moisture content. Data were recorded for four harvests (from February 1991 to December 1992), statistically analysed and presented as pooled data of four harvests. The four harvests covered two harvests each for season I and season II (representing spring and autumn for the harvests commencing with the basal pruning during February and August, respectively).

RESULTS

Leaf moisture content (Table II):

The varieties under study exhibited significant differences in respect of all the growth periods and maturity levels except, however, at overmature-2 stage. Maximum values of leaf moisture contents were recorded in tender leaves (74.9 to 80.3%) compared to other growth periods and maturity levels in respect of all varieties (71.6 to 75.5%, 69.7 to 74.7%, 68.3 to 74.1% and 68.0 to 73.4% representing medium, mature, overmature-1 and overmature-2, respectively). Acc. No. 79 (exotic variety), which recorded significantly higher values of leaf moisture contents in respect of all the growth periods and maturity levels (with a few exceptions), differed distinctly from the rest of the varieties. Similarly, Kosen and English Black (both exotic), and S-36, DD, RFS-135, RFS-175 and S-54 (improved high-yielding varieties) also recorded significantly higher values of leaf moisture contents from tender-1 to overmature-1 leaves, while the Mysore Local, Mother Graft and M-5 varieties recorded significantly lower values of leaf moisture (75.4 to 68.1%, 75.7 to 68.8%, 76.4 to 69.6%, respectively) at all the maturity levels and growth periods. In general, all the varieties under study recorded maximum leaf moisture contents at tender leaf stages, which gradually declined with increasing maturity levels and advancement of growth. Season I and season II exhibited significant differences in respect of all the samples (except for medium and overmature-2 leaves). Season II recorded significantly higher values of leaf moisture contents at early growth periods (tender and mature leaves), while at the later stages (overmature leaves) season I recorded significantly higher values of leaf moisture contents.

Leaf protein content (Table II)

Maximum values of leaf protein contents were recorded in tender-2 leaves (45-d growth), which gradually declined with increasing growth periods and maturity levels (23.6 to 28.3% and 14.4 to 15.7% in tender-2 and overmature-2 leaves, respectively) in respect of all the varieties. Average rates of depletion of protein content from tender-2 leaves to medium, mature and overmature-1 leaves were recorded as 17%, 34% and 40%, respectively. The lowest rates of protein depletion were recorded in Acc. No. 79 (9%, 23% and 33% in respect of medium, mature and overmature-1 leaves, respectively) compared to the rest of the varieties (11-31%, 29-40%, 37-43% representing medium, mature and overmature-1 leaves, respectively). Other exotic varieties, i.e., Kosen, English Black and KNG also recorded lower values of protein depletion (12 to 13% at medium and 29 to 37% at mature leaves). The highest values (40 and 47% at mature and overmature-1) of protein depletion were recorded in RFS-175, while S-36 and DD recorded the highest values of protein depletion at medium leaf stage (31% and 26%, respectively). Season I and season II also exhibited significant differences in respect of all growth periods and maturity levels (except tender-2 and medium). Season I recorded significantly higher values of protein contents over season II (24% compared to 22.9%) in respect of tender-1 leaves, while the reverse was true in the case of medium and overmature leaves.

Table II. Varietal differences of leaf moisture content (%) at different growth stages and maturity levels (pooled for four harvests).

Tableau II. Différences variétales de la teneur en eau de la feuille (%) en fonction des stades de croissance et des degrés de maturité (données groupées pour quatre récoltes).

Growth periods Maturity levels	30 days Tender 1	45 days Tender 2	60 days Medium	75 days Mature	90 days Overmature 1	120 days Overmature 2
<i>Période de croissance Degrés de maturité</i>	<i>30 jours Tendre 1</i>	<i>45 jours Tendre 2</i>	<i>60 jours Intermédiaire</i>	<i>75 jours Mature</i>	<i>90 jours Sénescence 1</i>	<i>120 jours Sénescence 2</i>
Varieties / Variétés						
M. Local	75.4	75.4	71.7	69.7	68.5	68.1
M. Graft / Greffon mère	75.7	74.9	72.2	72.1	71.1	68.8
M-5	76.4	76.1	73.0	72.1	70.8	69.6
S-1	77.2	77.3	71.6	70.3	70.9	70.0
S-54	77.8	77.7	74.2	72.1	72.4	72.0
S-36	77.3	78.1	75.5	73.5	74.1	72.7
DD	78.2	77.8	74.3	74.1	73.6	72.9
RFS-135	77.9	77.5	73.8	73.9	72.9	72.0
RFS-175	77.3	76.7	73.6	72.9	73.1	71.6
Berhampore 763	77.1	76.3	71.8	72.1	70.6	69.8
English Black	77.6	76.9	73.8	74.7	70.8	71.3
Acc. No. 79	80.3	80.0	75.2	74.6	73.6	73.4
KNG	77.8	79.9	72.1	72.1	68.3	68.0
Kosen	77.7	77.9	74.6	73.9	70.9	72.1
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	HS	HS	HS	NS
CD at 5%	0.42	1.97	2.02	2.10	3.08	-
CD at 1%	0.57	2.65	2.70	2.82	4.13	-
Seasons / Saisons						
Season I / Saison I	76.5	75.9	73.7	72.1	72.4	72.4
Season II / Saison II	78.4	78.7	73.1	73.2	70.9	66.9
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	NS	S	S	NS
CD at 5%	0.67	0.97	-	0.90	1.37	-
CD at 1%	0.93	1.35	-	1.26	1.91	-

HS: Significant at 1% / *Significatif à 1 %*. NS: Not significant / *Non significatif*. S: Significant at 5% / *Significatif à 5 %*.

Leaf sugar content (Table IV):

Maximum values of leaf sugar contents were recorded in tender-2 leaves, which gradually decreased at varying degrees among the varieties in respect of increasing maturity levels and growth periods (11.9 to 14.6% and 5.7 to 9.5% at tender-2 and overmature-2 leaves, respectively). The KNG and S-54 varieties recorded the highest and lowest values of leaf sugar contents in respect of the majority of growth periods and maturity levels under study. Average rates of depletion of sugar

Table III. Varietal differences of protein content (%) at different growth stages and maturity levels (pooled for four harvests).

Tableau III. Différences variétales du contenu en protéines (%) en fonction des stades de croissance et des degrés de maturité (données groupées pour quatre récoltes).

Growth periods Maturity levels	30 days Tender 1	45 days Tender 2	60 days Medium	75 days Mature	90 days Overmature 1	120 days Overmature 2
<i>Période de croissance Degrés de maturité</i>	<i>30 jours Tendre 1</i>	<i>45 jours Tendre 2</i>	<i>60 jours Intermédiaire</i>	<i>75 jours Mature</i>	<i>90 jours Sénescence 1</i>	<i>120 jours Sénescence 2</i>
Varieties / Variétés						
M. Local	22.4	26.5	20.6 (22)	16.9 (36)	15.9 (40)	15.7
M. Graft / Greffon mère	22.3	25.7	20.0 (11)	16.2 (37)	14.7 (43)	14.4
M-5	22.5	25.7	20.3 (21)	16.3 (37)	15.5 (40)	15.6
S-1	23.4	26.3	20.7 (21)	17.3 (34)	16.2 (39)	14.8
S-54	23.4	26.2	20.7 (21)	17.2 (34)	16.4 (37)	15.3
S-36	22.3	27.2	18.8 (31)	17.3 (37)	15.5 (42)	14.5
DD	21.9	26.4	19.6 (26)	17.1 (35)	15.9 (40)	14.6
RFS-135	22.0	26.8	21.4 (20)	16.9 (37)	16.2 (40)	14.4
RFS-175	23.8	28.3	22.7 (20)	17.1 (40)	14.9 (47)	14.5
Berhampore 763	25.4	26.3	23.5 (11)	16.9 (36)	14.7 (43)	15.7
English Black	21.8	25.2	21.8 (13)	16.3 (35)	14.5 (42)	14.6
Acc. No. 79	26.0	23.6	21.4 (09)	18.2 (23)	15.9 (33)	15.3
KNB	27.4	26.2	23.2 (12)	18.2 (37)	15.2 (43)	15.7
Kosen	23.4	27.3	22.6 (13)	18.5 (29)	15.4 (41)	14.5
Average depletion <i>Déplétion moyenne</i>			(17)	(34)	(40)	
F test / Test F						
CD at 5%	0.67	0.56	0.51	0.56	0.47	0.48
CD at 1%	0.88	0.73	0.68	0.73	0.62	0.64
Seasons / Saisons						
Season I / Saison I	24.0	26.3	20.3	19.3	15.2	13.9
Season II / Saison II	22.9	26.3	22.2	19.2	15.7	16.1
F test / Test F						
CD at 5%	0.24	-	0.20	-	0.17	0.19
CD at 1%	0.25	-	0.21	-	0.18	0.22

HS: Significant at 1% / *Significatif à 1 %* **NS:** Not significant / *Non significatif*.

Figures in parentheses are the per cent depletion rates on 45 days as a base.

Les chiffres entre parenthèse correspondent aux pourcentages de déplétion sur la base de 45 jours.

contents from tender-2 leaves to medium, mature and overmature-1 leaves were recorded as 10%, 30% and 36%, respectively. The lowest values of sugar depletion were recorded with Berhampore-763 (1%), followed by RFS-135 and DD (3% at medium leaf) and highest values of sugar depletion were recorded with S-1 (21%) and Mysore Local (17%) varieties. The exotic varieties, i.e., Acc. No. 79,

English Black and KNG, and improved high-yielding varieties, DD, RFS-135, RFS-175, Berhampore-763, recorded lower values of sugar depletion. The two seasons also exhibited significant differences in respect of all growth periods and maturity levels. Season I recorded significantly higher values of sugar contents over season II in respect of tender-1, mature and overmature leaves, while the reverse was true in respect of tender-2 and medium leaves.

Table IV. Varietal differences of sugar content (%) at different growth stages and maturity levels (pooled for four harvests).

Tableau IV. Différences variétales de la teneur en sucres (%) en fonction des stades de croissance et des degrés de maturité (données groupées pour quatre récoltes).

Growth periods Maturity levels	30 days Tender 1	45 days Tender 2	60 days Medium	75 days Mature	90 days Overmature 1	120 days Overmature 2
<i>Période de croissance</i>	<i>30 jours</i>	<i>45 jours</i>	<i>60 jours</i>	<i>75 jours</i>	<i>90 jours</i>	<i>120 jours</i>
<i>Degrés de maturité</i>	<i>Tendre 1</i>	<i>Tendre 2</i>	<i>Intermédiaire</i>	<i>Mature</i>	<i>Sénescence 1</i>	<i>Sénescence 2</i>
Varieties / Variétés						
M. Local	12.3	14.6	12.0 (17)	8.5 (41)	8.5 (41)	7.1
M. Graft / Greffon mère	11.2	13.5	11.7 (14)	9.6 (30)	8.3 (39)	7.6
M-5	12.7	14.4	12.5 (13)	9.0 (37)	8.4 (41)	5.7
S-1	12.0	13.4	11.2 (21)	8.4 (40)	8.3 (41)	8.0
S-54	9.7	11.9	12.1 (+2)	8.1 (32)	6.4 (42)	5.9
S-36	10.9	13.3	11.7 (12)	8.7 (35)	8.0 (39)	5.8
DD	10.9	12.7	12.3 (3)	9.1 (28)	7.9 (38)	6.4
RFS-135	11.6	12.9	12.6 (3)	8.9 (30)	8.5 (34)	7.6
RFS-175	11.3	13.1	12.2 (6)	8.9 (31)	8.7 (33)	6.5
Berhampore 763	11.9	13.1	13.0 (0.6)	10.8 (17)	9.3 (34)	8.6
English Black	11.2	12.7	12.1 (8)	9.7 (26)	9.3 (29)	8.1
Acc. No. 79	8.8	12.3	11.5 (7)	9.5 (22)	9.1 (25)	7.8
KNG	13.2	13.8	12.3 (11)	11.0 (20)	9.7 (29)	9.5
Kosen	11.2	13.9	11.9 (14)	9.3 (33)	9.4 (32)	6.4
Average depletion <i>Déplétion moyenne</i>			(10)	(30)	(36)	
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	HS (10)	HS (30)	HS (35)	HS
CD at 5%	0.30	0.39	0.28	0.24	0.25	0.23
CD at 1%	0.39	0.52	0.36	0.31	0.33	0.30
Seasons / Saisons						
Season I / Saison I	12.2	12.6	11.3	10.7	10.4	8.6
Season II / Saison II	10.6	13.9	12.8	7.8	6.8	5.7
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	HS	HS	HS	HS
CD at 5%	0.12	0.15	0.10	0.08	0.09	0.08
CD at 1%	0.13	0.16	0.11	0.09	0.10	0.09

HS: Significant at 1% / Significatif à 1 %.

Figures in parentheses are the per cent depletion rates on 45 days as a base.

Les chiffres entre parenthèse correspondent aux pourcentages de déplétion sur la base de 45 jours.

Total chlorophyll (mg/g) (Table V):

The highest values of leaf chlorophyll contents were recorded in medium leaves (2.32 to 3.36 mg/g), which declined gradually with increased growth periods and maturity levels, however, with a few exceptions. The varieties RFS-135 and Berhampore-763 recorded the highest values of total chlorophyll contents in tender-2 leaves, and S-54, Acc. No. 79 and Kosen varieties recorded the maximum values of total chlorophyll contents at mature leaves. Average values of reduction of leaf chlorophyll contents from medium to mature, overmature-1 and overmature-2 leaves was recorded as 14%, 32% and 46%, respectively. Among the varieties, the maximum reduction was recorded with M-5, S-1 and RFS-135 (23% each at mature leaf), while the minimum reduction was recorded with KNG (2%) followed by Mother Graft (5%). In contrast to these observations, the varieties S-54, Berhampore-763, Acc. No. 79 and Kosen recorded 1%, 5%, 15% and 14% increase, respectively, in the chlorophyll contents at mature over medium leaves.

DISCUSSION

The maximum values of leaf moisture, protein and sugar contents were recorded with tender leaves (at 30 and 45 days' growth periods), which gradually depleted at varied degrees with increasing maturity levels among the varieties. This is in accordance with the reports of Nakajima (1975), Rangaswami *et al.* (1976), Sreedhara *et al.* (1988), Sinha *et al.* (1993), Chaluvachari and Bongale (1994). Importance of leaf moisture contents in relation to the performances of silkworm growth has been emphasised by Parpiev (1968), Narayanaprakash *et al.* (1985) and Paul *et al.* (1992) who observed that the decrease in water contents in feed affected different energetic parameters. They also reported that assimilation of food converted into body tissue decreased with decreasing moisture contents. It has been reported previously (Bongale and Chaluvachari, 1995) that M. Local variety, which recorded the lowest values of leaf moisture contents and moisture retention rates, was associated with poor moulting ratios and lowest values of larval weight. On the other hand, Acc. No. 79 and Kosen (both exotic) varieties had higher values of leaf moisture contents and leaf moisture retention and recorded higher values of moulting ratios and larval weight. Friend (1958) and Waldbauer (1968) also highlighted the importance of dietary moisture content and reported that phytophagous insects required high water intake for normal development and feeding of larvae with wilted foliage produced adverse effects. In the present study, Acc. No. 79, Kosen and English Black (all exotic of temperate origin) and S-36, DD, RFS-135, RFS-175 and S-54 (indigenous high-yielding varieties of tropical origin) recorded consistently higher values of leaf moisture contents throughout the growth periods and maturity levels, while the varieties M. Local, M. Graft and M-5 recorded significantly lower values of leaf moisture contents. Acc. No. 79, which recorded the lowest values of protein depletion (9 to 33%) and lower values of sugar depletion (7 to 25%) from medium to overmature-1 leaves (taking tender-2 leaves as a base), was consistently associated with highest values of leaf moisture contents (80.3 to 73.4% from tender-1 and overmature-2 leaves) compared to the rest of the varieties, this was of special significance in respect of its superiority over the indigenous varieties (Chaluvachari and Bongale, 1995). The other two exotic varieties (KNG and English Black) also recorded lower values of sugar depletion at all the growth periods and maturity levels and lower values of protein depletion at medium leaves compared to the other varieties. It has also been recorded (Chaluvachari and Bongale, 1996) that, among different nutritive parameters, the leaf moisture content, moisture retention, sugar and protein contents, in addition to sugar:protein ratios were of special significance with respect to the larval weight and moulting ratios of young age larvae. Rangaswami *et al.* (1976) reported that crude protein, moisture and reducing, non-reducing and total sugars were greater in tender leaves, followed by mature and bottom leaves, while mineral contents increased with increased maturity. Similar observations were also reported by Nakajima (1931), Iwanari and Ohno (1969), Fotadar *et al.* (1989), Liaw *et al.* (1991) and Sinha *et al.* (1993). While evaluating diploid and triploid mulberry varieties, Sikdar (1993) suggested to use high-quality leaves of triploid varieties for silkworm rearing.

The maximum values of sugar contents in younger leaves (tender) in the present study are also in accordance with the work of Satoh (1983). Varied levels of sugar depletion among the varieties at

Table V. Varietal differences of total chlorophyll content (mg/g) at different growth stages and maturity levels (pooled for four harvests).

Tableau V. Différences variétales du contenu en chlorophylle totale (mg/g) en fonction des stades de croissance et des niveaux de maturité (données groupées pour quatre récoltes).

Growth periods Maturity levels	30 days Tender 1	45 days Tender 2	60 days Medium	75 days Mature	90 days Overmature 1	120 days Overmature 2
<i>Période de croissance Niveaux de maturité</i>	<i>30 jours Tendre 1</i>	<i>45 jours Tendre 2</i>	<i>60 jours Intermédiaire</i>	<i>75 jours Mature</i>	<i>90 jours Sénescence 1</i>	<i>120 jours Sénescence 2</i>
Varieties / Variétés						
M. Local	2.46	2.12	2.51	2.22 (11)	1.71 (31)	1.40 (44)
M. Graft / Greffon mère	2.66	2.63	3.01	2.85 (5)	2.18 (27)	1.48 (50)
M-5	2.40	2.38	2.99	2.29 (23)	2.16 (17)	1.52 (49)
S-1	2.89	2.59	3.36	2.58 (23)	2.30 (31)	1.66 (50)
S-54	2.61	2.25	2.73	2.77 (+1)	2.27 (16)	1.42 (47)
S-36	2.27	2.12	2.62	2.23 (15)	2.16 (17)	1.47 (43)
DD	2.41	2.33	2.66	2.33 (12)	2.05 (22)	1.52 (42)
RFS-135	2.22	2.50	2.39	1.84 (23)	1.77 (25)	1.53 (35)
RFS-175	2.18	2.14	2.32	1.99 (14)	1.63 (29)	1.35 (41)
Berhampore 763	2.66	3.25	3.09	3.25 (+5)	1.46 (52)	1.86 (39)
English Black	2.43	2.52	2.89	2.53 (12)	2.15 (25)	1.62 (43)
Acc. No. 79	2.32	2.20	2.42	2.85 (+15)	1.75 (38)	1.49 (47)
KNK	2.51	2.21	2.78	2.72 (2)	1.34 (51)	1.23 (55)
Kosen	2.15	2.58	2.39	2.78 (+14)	1.41 (49)	1.25 (55)
Average depletion <i>Déplétion moyenne</i>				(14)	(32)	(46)
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	HS	HS (14)	HS (32)	HS (46)
CD at 5%	0.057	0.057	0.076	0.104	0.050	0.040
CD at 1%	0.076	0.074	0.101	0.137	0.065	0.052
Seasons / Saisons						
Season I / Saison I	2.65	2.51	2.77	1.82	1.68	2.02
Season II / Saison II	2.23	2.26	2.63	3.21	2.08	0.95
<i>F test / Test F</i>	HS	HS	S	HS	HS	HS
CD at 5%	0.06	0.05	0.36	0.11	0.04	0.04
CD at 1%	0.07	0.06	0.37	0.12	0.05	0.05

HS: Significant at 1% / *Significatif à 1 %*, **S:** Significant at 5% / *Significatif à 5 %*.

Figures in parentheses are the per cent depletion rates with 60 days as a base.

Les chiffres entre parenthèse correspondent aux pourcentages de déplétion sur la base de 60 jours.

different maturity levels in the present study could be attributed to genotypic characters of the varieties. The leaf chlorophyll content is indicative of the photosynthetic efficiency of the plant system. The maximum values of chlorophyll contents were recorded with medium leaves and thereafter reduced at varied degrees among the varieties at increasing growth periods and maturity levels. Sreedhara *et al.* (1988) reported that there was an increase in chlorophyll contents at a slow rate up to 18 days, which further increased at arithmetic rate up to the 42nd day and subsequently decreased at the rate of 1% per day. The varieties S-54, Berhampore-763, Acc. No. 79 and Kosen recorded consistent increases in the chlorophyll contents even up to 75 days' growth period in the present study, possibly owing to slow maturity rates indicative of their superiority over other varieties with faster rates of leaf maturity.

The importance of the leaf protein content in relation to silkworm growth and cocoon crop performances was also emphasised by Fukuda *et al.* (1959) and Li and Sano (1984). Chaluvachari and Bongale (1994) reported that the S-41 variety with higher protein and lower sugar contents gave higher larval weight and lower moulting ratios. In another report, Bongale and Chaluvachari (1993) evaluated four mulberry varieties, i.e., M-5, DD, S-54 and TG; lower values of total and soluble protein and chlorophyll contents in DD variety were associated with poor rearing performance compared to other varieties, the TG variety with the highest protein and sugar contents of the leaf recorded the highest shell ratio. Horie (1980) suggested that optimum levels of dietary protein of 20-25% are required for better silkworm growth and cocoon crop performances. In the present study, optimum levels of protein (20.0 to 28.3%) were recorded at tender-1 to medium leaves (30 and 60 days' growth stages, respectively) while the later growth periods (75 days to 120 days) recorded lower values of protein contents (14.5 to 16.9%). These varied levels of nutrients in the leaf may influence the cocoon crop performances in farmers' fields which are known to exhibit greater variabilities especially with respect to different agro-climatic regions in Karnataka (Bongale *et al.*, 1993) as also in Andhra Pradesh (Rupa *et al.*, 1993).

Silkworm growth and cocoon crop performances vis-à-vis feeding of mulberry leaves of different maturity levels were studied by Sudo *et al.* (1981), Askari and Sharan (1982), Krishnaswami *et al.* (1970a), who observed that upper-order tender leaves were superior to middle- and lower-order leaves. Iwanari and Ohno (1969) reported that feeding with upper-order leaves containing 14% sugar and 26.5% protein was most effective on larval growth compared with the diets containing other leaves at different leaf orders. In the present study also, the maximum values of sugar contents were recorded with top-order leaves (11.9-14.6% among the varieties in tender-2 leaves) and thereafter a gradual reduction of sugar contents at varied levels among the varieties with increasing maturity levels and growth stages (mature to overmature-2 leaves which recorded 11% to 5.7%, respectively).

It could be concluded that the levels of nutrient depletion among different mulberry genotypes varied at different maturity levels. The leaf moisture, protein and sugar contents were highest in tender leaves, which declined with advancement of growth periods and increased maturity levels. The exotic varieties (Acc. No. 79, English Black and Kosen) of temperate origin recorded lower rates of nutrient depletion over the growth periods studied, indicating their superiority in leaf quality. Among the other varieties (of tropical origin), improved high-yielding varieties (DD, RFS-135 and RFS-175) were in general comparable to the exotic varieties studied. The traditional and popular indigenous varieties (Mysore Local, Mother Graft and M-5) were inferior with respect to the above characters. Such variations might help in selection of improved varieties. This could also be one of the important criteria for identifying specific growth phases and maturity levels of superior leaf quality for brushing programmes in respect of different varieties.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks are due to the colleagues at the KSSRD for help and support in carrying out this work.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1973) Gazetteer of India, Karnataka State, Bangalore District. Publ. Govt. of Karnataka. Editor: K. Abishankar.
- ARNON D.N. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 15.
- ASKARI S., SHARAN R.K. (1982) Studies on the effect of feeding leaves of varying maturity on the developmental stages of *Bombyx mori* L. J. Adv. Zool., 3(2), 90-94.
- BONGALE U.D., CHALUVACHARI (1993) Evaluation of four mulberry varieties by leaf biochemical analysis and bioassay with *Bombyx mori* L. J. Indian Bot. Soc., 72, 59-62.
- BONGALE U.D., CHALUVACHARI (1995) Evaluation of eight mulberry germplasm varieties by leaf biochemical and bioassay moulting studies. Sericologia, 35(1), 83-94.
- BONGALE U.D., CHALUVACHARI, LINGAIAH, RAO B.V.N., MALLIKARJUNAPPA R.S. (1993) Leaf quality evaluation of mulberry gardens in Karnataka. Trends in Life Sciences (India), 8(1), 33-37.
- CHALUVACHARI, BONGALE U.D. (1994) Leaf quality evaluation of selected mulberry genotypes by biochemical and bio-assay studies. Proc. 4th All India Conference Soc. Cytologists and Cytogenetics, India. Proc. Conf. on Cytol. and Genet., 4, 121-124.
- CHALUVACHARI, BONGALE U.D. (1995) Evaluation of leaf quality of some germplasm genotypes of mulberry through chemical analysis and bioassay with silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 34(2), 127-132.
- CHALUVACHARI, BONGALE U.D. (1996) Bioassay moulting response of silkworm, *Bombyx mori* L., in relation to leaf nutritive constituents in mulberry (*Morus* spp.) genotypes. Indian J. Seric., 35(2), 160-162.
- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GUPTA Y.K., GHOSH A., DATTA R.K. (1993) Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and spacings on the growth, yield and nutritional quality of mulberry under rainfed conditions. Indian J. Seric., 32(2), 201-207.
- DUBIOS M.K., GILLER K.A., HAMILTON K., RELERS P.A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Annal. Chem., 28, 350-356.
- FOTADAR R.K., AHSAN M.N., DHAR K.L., BHAKUNI B.S. (1989) Evaluation and utilization of genetic variability in mulberry. Indian J. Seric., 28(2), 150-158.
- FRIEND W.G. (1958) Nutritional requirements of phytophagous insects. Ann. Rev. Entomol., 3, 57-73.
- FUKUDA T., SUDO M., MATUDA M., HAYASHI T., KUROSE T., HORIUHI Y., FLORRIN M. (1959) Formation of silk protein during the growth of the silkworm larvae, *Bombyx mori* L. In Proc. 4th Intern. Cong. Biochem., 12, 90-112.
- GABRIEL B.P., RAPSUAS H.R. (1976) The growth and development of *Bombyx mori* L. at different leaf maturity and variety of mulberry. Philippine Agric., 60(314), 139-146.
- HORIE Y. (1980) Recent advances in sericulture. Ann. Rev. Entomol., 25, 49-71.
- IWANARI Y., OHNO Y. (1969) Rearing experiments of silkworms on the artificial diets composed mainly of the mulberry leaf powder harvested on the late autumnal and thereafter season. J. Sericult. Sci. Japan, 38(4), 307-315.
- KRISHNASWAMI S., AHSAN M., SRIHARAN T.P. (1970a) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Part-2. Quality differences due to leaf maturity. Indian J. Seric., 9(1), 11-25.
- KRISHNASWAMI S., NOAMANI M.K.R., AHSAN M. (1970b) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Part-1. Quality differences due to varieties. Indian J. Seric., 9(1), 1-10.
- LI R., SANO Q. (1984) The relationship between quality of mulberry leaves and some economic characters during the later larval stage. Sci. Seric. (Canye Kexue), 10(4), 197-201.
- LIAN G.J., HSIEH F.K., CHO Y.I. (1991) Effectiveness of artificial diets prepared from different varieties and maturity of mulberry leaves on development of silkworm, *Bombyx mori* L. Chinese J. Entomol., 11(3), 260-263.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MACHII H., KATAGIRI K. (1990) Varietal differences in food value of mulberry leaves with special reference to production efficiency of cocoon shell. J. Sericult. Sci. Japan, 59(1), 34-42.
- NAKAJIMA S. (1931) Changes of the chemical and physical properties in mulberry leaves in relation to their age and meaning from silkworm nutritive point of view. Bull. Nagano Sericult. Exp. Sta., 14, 1-125.
- NAKAJIMA S. (1975) Chemical components and quality of mulberry leaves. In Textbook of Tropical Sericulture. Japan Overseas Co-operation Volunteers, Tokyo, Japan.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K., SITARAM IYENGAR M.N. (1967) Preliminary observations on the effects of feeding leaves of varying maturity on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 1(2), 109-113.
- NARAYANAPRAKASH R., PERIASAMY K., RADHAKRISHNAN (1985) Effect of dietary water content on food utilization and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Indian J. Seric., 24(1), 12-17.
- PARPIEV B.A. (1968) Water metabolism in silkworm fed with a different mulberry strain changing diet. Shelk, 39, 15-17.
- PAUL D.C., SUBBA RAO G., DEB D.C. (1992) Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of *Bombyx mori* and concomitant larval duration. J. Insect Physiol., 38(3), 229-235.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., JOLLY M.S. (1976) Manual on Sericulture. Vol. I — Mulberry Cultivation. Agricultural Services Bull., 15, FAO, Rome, 150 pp.
- RUPA T.R., SESHAGIRI RAO M., SRINIVASA REDDY K. (1993) Nutrient content of mulberry (*Morus alba* L.) leaves as influenced by soil properties. Indian J. Seric., 32(2), 225-227.
- SATOH M. (1983) Studies on the dry matter production in mulberry tree with special reference to change in physiological activity of leaves retained after harvest and their contribution to regrowth. Bull. Sericult. Exp. Sta., 28(3), 488-498.
- SHIKATA M., LIAW G.J., SANUSI A.K. (1980) Feeding and growth of newly hatched silkworm larvae reared on diets containing leaf powder from different mulberry races of south-east Asia. J. Sericult. Sci. Japan, 49(3), 239-240.
- SIKDAR A.K. (1993) Chemo- and bioassay of high yielding triploids and diploids of mulberry (*Morus* spp.) Indian J. Seric., 32(2), 169-174.
- SINHA U.S.P., SINHA A.K., SRIVASTAVA P.P., BRAHMACHARI B.N. (1993) Variation of chemical constituents in relation to maturity of leaves in mulberry varieties S₁ and K₂ under the agro-climatic conditions of Ranchi district. Indian J. Seric., 32(2), 196-200.
- SREEDHARA V.M., SHANTAKUMARI M., BORAI AH G. (1988) Preliminary studies on the changes in the levels of protein, sugar, chlorophyll and moisture content in the developed leaves of mulberry, *Morus indica*. Proc. Intern. Cong. Tropical Sericulture Practices. Central Silk Board, Feb. 18-23, pp. 35-38.
- SUDO M., SOH Y., OKAJIMA T. (1981) The relation between the leaf quality at different leaf orders. Silkworm growth and quality. J. Sericult. Sci. Japan, 50(4), 306-310.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Advance Insect Physiol., 5, 229-288.

ASSOCIATION DE LA QUALITE NUTRITIVE DES FEUILLES AVEC LES DEGRES DE MATURITE CHEZ QUATORZE VARIETES IMPORTANTES DE MURIER (*MORUS*)

U.D. BONGALE, CHALUVACHARI, R.S. MALLIKARJUNAPPA, B.V. NARAHARI RAO,
M.N. ANANTHARAMAN & S.B. DANDIN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI), Thalaghattapura,
Kanakapura Road, Bangalore - 560 062, Inde.

*Quatorze variétés de mûrier sélectionnées appartenant à *Morus indica* L., *M. alba* L. et *M. multicaulis* P. (toutes diploïdes) conservées à la banque génétique de mûriers sur le campus de l'Institut ont été étudiées afin de déterminer leurs teneurs foliaires en eau, en protéines, en sucres et en chlorophylle sur quatre récoltes couvrant la période de février 1991 à décembre 1992. Les observations ont été relevées en fonction des différents degrés de maturité des feuilles (feuilles tendres, moyennes, mûres et sénescentes) et des périodes de croissance (30, 45, 60, 75, 90 et 120 jours). Toutes les variétés présentent un taux de diminution plus rapide des teneurs en eau, en sucres et en protéines pour les périodes de croissance de 75 à 90 jours. Les variations de la qualité des feuilles entre les variétés étudiées donnent des différences de profil intéressantes. Les trois variétés exotiques (Acc. No. 79, English Black et Kosen) présentent des taux plus faibles de diminution des éléments nutritifs pour les périodes de croissance considérées. La signification des observations est discutée dans le cadre de la sélection de variétés supérieures.*

INTRODUCTION

Les différences de qualité des feuilles entre les variétés et entre les degrés de maturité des feuilles et la diminution de la valeur nutritive des feuilles en fonction des périodes de croissance ont une importance particulière chez le mûrier (*Morus* de la famille des Moraceae), source alimentaire du ver à soie monophage *Bombyx mori* L. Il s'agit d'un paramètre important utilisé pour évaluer les génotypes destinés à la sélection de variétés supérieures afin d'améliorer les performances d'élevage (Narayanan et coll., 1967 ; Krishnaswami et coll., 1970a, 1970b ; Gabriel et Rapsuas, 1976 ; Shikata et coll., 1980 ; Askari et Sharan, 1982 ; Machi et Katagiri, 1990 ; Das et coll., 1993). Par qualité des feuilles, on entend généralement surtout la teneur en eau et on ne tient pas compte des autres composants nutritifs. La majorité des publications sur ce sujet ne concernent pas la variabilité des composants spécifiques chez les variétés de mûrier à différents degrés de maturité, composants responsables des différences de performances au niveau des récoltes de cocons (Rangaswami et coll., 1976 ; Fotadar et coll., 1989 ; Sinha et coll., 1993). Cette étude a été réalisée afin de combler cette lacune.

MATERIELS ET METHODES

Les quatorze variétés de la banque génétique sélectionnées pour cette étude comprennent des variétés locales traditionnelles (Mysore Local et greffon mère), des variétés améliorées couramment utilisées (M-5 et Berhampore S-1), des variétés performantes améliorées (S-54, S-36, DD, RFS-135, RFS-175 et Berhampore-763) et des variétés exotiques tempérées (English Black, Acc. No. 79, KNG et Kosen). Les variétés étudiées (Tableau I) sont diploïdes et appartiennent à *M. indica* L. (n° 1 à 10), *M. alba* L. (n° 11, 12 et 13) et *M. multicaulis* P. (n° 14). Ces variétés ont été maintenues de manière identique sur un même lot au campus de l'Institut situé à 12°57' latitude N et 77°33' longitude E et à

une altitude de 839 m (Anonyme, 1973). Les températures annuelles moyennes maximales et minimales étaient de 27.4 °C et 19.5 °C en 1991 et 27.8 °C et 18.8 °C en 1992. Les précipitations annuelles étaient de 1 440 mm en 1991 et 936.8 mm en 1992. Les plants ont été maintenus à un espacement de 90 × 105 cm en terrain irrigué avec 20 tonnes de fumier de ferme/ha/an appliquées au mois d'août. Les dosages d'engrais de 60:60:60 kg/ha NPK sous forme complexe et 60 kg N/ha sous forme d'urée ont été appliqués pour les récoltes commençant respectivement en août et en février. Le sol est de type sablonneux gras rouge, pH 7.8, CE 0.21 mmhos/cm, CO 0.65 %, Kjeldhal N 0.19 %, P 10 kg/acre et K 113 kg/acre. On a suivi un plan de récolte bisannuel avec une taille basale à six mois d'intervalle pour une hauteur de couronne de 45 cm au-dessus du sol. Les échantillons de feuilles ont été prélevés sur cinq plants sélectionnés au hasard pour chacune des variétés à des périodes de croissance et des degrés de maturité déterminés correspondant aux stades de maturité suivants : feuille tendre 1, feuille tendre 2, feuille intermédiaire, feuille mature, feuille sénescence 1 et feuille sénescence 2 respectivement à 30, 45, 60, 75, 90 et 120 jours après la taille. Parmi les degrés de maturité, les feuilles des stades tendre 2, intermédiaire et mature sont utilisées respectivement pour le nourrissage des jeunes larves (40 à 50 jours), du quatrième âge (55 à 60 jours) et du cinquième âge (65 à 75 jours), les feuilles du stade sénescence 1 correspondent au nourrissage des larves du cinquième âge dont la levée a été retardée : les stades feuille tendre 1 et feuille sénescence 2 ont été inclus pour permettre les comparaisons. Les échantillons de feuilles ainsi prélevés ont été traités, conservés et soumis en trois répétitions à l'analyse des teneurs en protéines solubles (Lowry et coll., 1951), en sueres totaux (Dubios et coll., 1956) et en chlorophylle totale (Arnon, 1949) : des échantillons ont été utilisés parallèlement pour enregistrer la teneur en eau. Les données ont été enregistrées pour quatre récoltes (de février 1991 à décembre 1992), analysées statistiquement et regroupées en données consolidées de quatre récoltes. Les quatre récoltes couvrent deux récoltes chacune pour la saison I et la saison II (représentant le printemps et l'automne pour les récoltes commençant avec une taille basale respectivement en février et en août).

RESULTATS

Teneur en eau des feuilles (Tableau II) :

Les variétés étudiées présentent des différences significatives pour toutes les périodes de croissance et les degrés de maturité considérés, à l'exception du stade feuille sénescence 2. Quelle que soit la variété, les valeurs de la teneur en eau sont maximales chez les feuilles tendres (74.9 à 80.3 %) par rapport aux autres périodes de croissance et aux autres degrés de maturité (71.6 à 75.5 % pour le stade feuille intermédiaire, 69.7 à 74.7 % pour le stade feuille mature, 68.3 à 74.1 % pour le stade feuille sénescence 1 et 68.0 à 73.4 % pour le stade feuille sénescence 2). La variété Acc. N° 79 (variété exotique), qui présente des valeurs nettement supérieures pour la teneur en eau pour toutes les périodes de croissance et tous les degrés de maturité (à quelques exceptions près), diffère de manière significative par rapport aux autres variétés. De même, Kosen et English Black (variétés exotiques) et S-36, DD, RFS-135, RFS-175 et S-54 (variétés performantes améliorées) présentent des valeurs nettement supérieures pour la teneur en eau aux degrés de maturité feuille tendre 1 à feuille sénescence 2 tandis que les variétés Mysore Local, greffon mère et M-5 donnent des valeurs nettement inférieures (respectivement 75.4 à 68.1 %, 75.7 à 68.8 %, 76.4 à 69.6 %) pour tous les degrés de maturité et toutes les périodes de croissance. De façon générale, toutes les variétés étudiées présentent une teneur en eau maximale au stade feuille tendre, la teneur en eau diminue progressivement aux stades de maturité et de croissance ultérieurs. La saison I et la saison II présentent des différences significatives pour tous les échantillons (excepté les stades feuille intermédiaire et feuille sénescence 2). La saison II enregistre des valeurs nettement supérieures pour la teneur en eau aux premiers stades de croissance (stade feuille tendre à stade feuille sénescence) tandis que la saison II enregistre des valeurs nettement supérieures aux derniers stades (feuille sénescence).

Teneur en protéines des feuilles (Tableau III) :

La teneur en protéines des feuilles est maximale au stade feuille tendre 2 (45 jours de croissance) puis elle diminue progressivement aux stades de croissance et de maturité suivants (23.6 à 28.3 pour le stade feuille tendre 2 et 14.4 à 15.7 % pour le stade feuille sénescence 2), quelle que soit la variété

considérée. Les taux moyens de déplétion de la teneur en eau du stade feuille tendre 2 aux stades feuille intermédiaire, feuille mature et feuille sénescence 1 sont respectivement de 17 %, 34, % et 40 %. La variété Acc. N° 79 donne les taux de déplétion les plus faibles (9 %, 23 % et 33 % respectivement pour les stades feuille intermédiaire, feuille mature et feuille sénescence 1) par rapport aux autres variétés (11 à 31, 29 à 40 % et 37 à 43 % respectivement pour les stades feuille intermédiaire, feuille mature et feuille sénescence). Les autres variétés exotiques (Kosen, English Black et KNG) présentent également des taux faibles de déplétion de la teneur en eau (12 à 13 % au stade feuille intermédiaire et 29 à 37 % au stade feuille mature). Les taux de déplétion des protéines sont maximaux (40 et 47 % aux stades feuille mature et feuille sénescence 1) chez RFS-175, tandis que S-36 et DD donnent les taux de déplétion les plus élevés au stade feuille intermédiaire (respectivement 31 % et 26 %). La saison I et la saison II présentent également des différences significatives pour toutes les périodes de croissance et tous les degrés de maturité (sauf pour les stades feuille tendre 2 et feuille intermédiaire). La saison I présente des teneurs en protéines nettement supérieures à celles obtenues pour la saison II (24 % contre 22,9 %) au stade feuille tendre 1 tandis que la saison II donne des valeurs supérieures pour la teneur en protéines aux stades feuille intermédiaire et feuille sénescence.

Teneur en sucres des feuilles (Tableau IV) :

La teneur foliaire en sucres est maximale au stade feuille tendre 2 : elle diminue ensuite progressivement dans des proportions variables suivant les variétés aux stades de maturité et de croissance suivants (11,9 à 14,6 % et 5,7 à 9,5 % respectivement aux stades feuille tendre 2 et feuille sénescence 2). Les variétés KNG et S-54 donnent respectivement les teneurs en eau maximale et minimale pour toutes les périodes de croissance et tous les degrés de maturité considérés. Les taux moyens de déplétion de la teneur en sucres du stade feuille tendre 2 aux stades feuille intermédiaire, feuille mature et feuille sénescence 1 sont respectivement de 10 %, 30 % et 36 %. Les taux de déplétion des sucres sont minimaux chez Berhampore-763 (1 %), devant RFS-135 et DD (3 % au stade feuille intermédiaire) et maximaux chez S-1 (21 %) et Mysore Local (17 %). Les variétés exotiques (Acc. N° 79, English Black et KNG) et les variétés performantes améliorées (DD, RFS-135, RFS-175, Berhampore-763) donnent les taux de déplétion les plus faibles. Les deux saisons donnent également des différences significatives entre les périodes de croissance et les degrés de maturité. La saison I présente des valeurs nettement supérieures à celles obtenues pour la saison II pour ce qui concerne les stades feuille tendre 1, feuille mature et feuille sénescence tandis que la saison II présente des valeurs supérieures pour les stades feuille tendre 2 et feuille intermédiaire.

Chlorophylle totale (Tableau V) :

La teneur foliaire en chlorophylle est maximale au stade feuille intermédiaire (2,32 à 3,36 mg/g) puis diminue progressivement aux stades de croissance et de maturité suivants, à quelques exceptions près. Les variétés RFS-135 et Berhampore-763 donnent les teneurs maximales en chlorophylle au stade feuille tendre 2 : les variétés S-54, Acc. N° 79 et Kosen donnent les teneurs maximales au stade feuille mature. Les valeurs moyennes de la diminution de la teneur foliaire en chlorophylle du stade feuille intermédiaire aux stades feuille sénescence 1 et feuille sénescence 2 sont respectivement de 14 %, 32 % et 46 %. Parmi les variétés, la diminution est maximale chez M-5, S-1 et RFS-135 (23 % au stade feuille mature) et minimale chez KNG (2 %), devant le greffon mère (5 %). A l'inverse, les variétés S-54, Berhampore 763, Acc. N° 79 et Kosen présentent respectivement une augmentation de la teneur en chlorophylle de 1 %, 5 %, 15 % et 14 % au stade feuille mature par rapport au stade feuille intermédiaire.

DISCUSSION

Les teneurs foliaires en eau, en protéines et en sucres sont maximales au stade feuille tendre (à 30 et 45 jours de croissance) et diminuent progressivement aux stades de maturité suivants de manière plus ou moins marquée chez les différentes variétés. Ce résultat est conforme aux observations de Nakajima (1975), Rangaswami et coll. (1976), Sreedhara et coll. (1988), Sinha et coll. (1993), Chaluvachari et Bongale (1994). L'importance de la teneur foliaire en eau dans les performances de croissance du ver à soie a été mise en évidence par Parpiev (1968), Narayanaprakash et coll. (1985)

et Paul et coll. (1992) qui ont observé que la diminution de la teneur en eau de la nourriture affectait les différents paramètres énergétiques. Ils ont également observé que l'assimilation de la nourriture convertie en tissu décroît à mesure que les teneurs en eau diminuent. Il a été précédemment observé (Bongale et Chaluvachari, 1995) que la variété M. Local, qui donne les teneurs en eau et les taux de rétention d'eau les plus faibles, est associée avec des rapports de mue médiocres et le poids larvaire le plus faible. Par ailleurs, les variétés Acc. N° 79 et Kosen (variétés exotiques) donnent des valeurs supérieures pour la teneur en eau et le taux de rétention d'eau et enregistrent des valeurs plus élevées pour le rapport de mue et le poids larvaire. Friend (1958) et Waldbauer (1968) ont également souligné l'importance de la teneur en eau des aliments et ont observé qu'un apport élevé en eau était nécessaire chez les insectes phytophages pour assurer un développement normal et que le nourrissage des larves avec des feuilles flétries avait des effets négatifs. Dans cette étude, Acc. N° 79, Kosen et English Black (variétés exotiques d'origine tempérée) et S-36, DD, RFS-135, RFS-175 et S-54 (variétés indigènes améliorées d'origine tropicale) donnent systématiquement des valeurs supérieures pour la teneur en eau à tous les stades de croissance et de maturité tandis que les variétés M. Local, greffon mère et M-5 donnent des valeurs nettement inférieures pour ce même paramètre. Acc. N° 79, qui présente le taux le plus faible de déplétion de la teneur en protéines (9 à 33 %) et en sucres (7 à 25 %) du stade feuille tendre au stade feuille sénescence 1 (en prenant le stade feuille tendre 2 comme base), est systématiquement associé avec des valeurs maximales pour la teneur en eau (entre 80,3 et 73,4 % du stade feuille tendre 1 au stade feuille sénescence 2) par rapport aux autres variétés : ceci indique clairement la supériorité de cette variété sur les variétés indigènes (Chaluvachari et Bongale, 1995). Les deux autres variétés exotiques (KNG et English Black) donnent également un taux de déplétion inférieur de la teneur en sucres à tous les stades de croissance et de maturité et un taux de déplétion inférieur de la teneur en protéines au stade feuille intermédiaire par rapport aux autres variétés. Chaluvachari et Bongale (1996) ont également observé que, parmi les différents paramètres nutritifs, outre le rapport sucres:protéines, la teneur en eau, le taux de rétention d'eau, les teneurs en sucres et en protéines ont une importance particulière pour ce qui concerne le poids larvaire et le rapport de mue des jeunes larves. Rangaswami et coll. (1976) ont observé que les teneurs en protéines brutes, en eau, en sucres réducteurs et en sucres totaux étaient plus élevées chez les feuilles tendres que chez les feuilles matures et les feuilles basales tandis que la teneur en minéraux augmentait avec l'âge de la feuille. Des observations similaires ont été faites par Nakajima (1931), Iwanari et Ohno (1969), Fotadar et coll. (1989), Liaw et coll. (1991) et Sinha et coll. (1993). Dans une évaluation de variétés de mûrier diploïdes et triploïdes, Sikdar (1993) a proposé d'utiliser des feuilles de grande qualité de variétés triploïdes pour l'élevage du ver à soie.

Les valeurs maximales de la teneur en sucres dans les jeunes feuilles (stade feuille tendre) obtenues dans cette étude sont également conformes aux observations de Satoh (1983). La variation du taux de déplétion de la teneur en sucres entre les variétés et entre les degrés de maturité obtenue dans cette étude pourrait être attribuée à des caractères génotypiques de ces variétés. La teneur foliaire en chlorophylle est une indication de l'efficacité de photosynthèse du système de la plante. La teneur en chlorophylle est maximale au stade feuille intermédiaire puis diminue dans des proportions variables aux stades de croissance et de maturité suivants. Sreedhara et coll. (1988) ont observé que la teneur en chlorophylle augmentait lentement jusqu'au 18^e jour puis à un taux arithmétique jusqu'au 42^e jour et diminuait ensuite à raison de 1 % par jour. L'augmentation régulière de la teneur en chlorophylle jusqu'à 75 jours de croissance chez les variétés S-54, Berhampore-763, Acc. N° 79 et Kosen observée dans cette étude pourrait être due à un faible taux de maturité indiquant leur supériorité par rapport aux autres variétés, chez lesquelles le taux de maturité foliaire est plus rapide.

L'importance de la teneur foliaire en protéines dans la croissance du ver à soie et les performances des récoltes de cocons a également été soulignée par Fukuda et coll. (1959) et Li et Sano (1984). Chaluvachari et Bongale (1994) ont observé que la variété S-41, qui présente une teneur supérieure en protéines et une teneur plus faible en sucres, donne un poids larvaire plus élevé et un rapport de mue plus faible. Dans une autre étude, Bongale et Chaluvachari (1993) ont évalué quatre variétés de mûrier (M-5, DD, S-54 et TG) : les valeurs inférieures des teneurs en protéines totales et solubles et en chlorophylle chez la variété DD sont associées avec une performance d'élevage médiocre par rapport aux autres variétés et la teneur foliaire maximale en protéines et en sucres chez la variété TG est associée avec la richesse soyeuse maximale. Horie (1980) a suggéré que les taux optimaux de

protéines alimentaires sont de 20 à 25 % pour assurer une bonne croissance des vers à soie et des performances de récoltes de cocons satisfaisantes. Dans cette étude, les taux optimaux de protéines (20,0 à 28,3 %) sont enregistrés entre les stades feuille tendre 1 et feuille intermédiaire (respectivement 30 et 60 jours de croissance) tandis que les autres périodes de croissance (75 à 120 jours) donnent des valeurs inférieures pour la teneur en protéines (14,5 à 16,9 %). Ces variations de la teneur en éléments nutritifs de la feuille pourraient influencer les performances de récolte chez les fermiers dont on sait qu'elles sont fortement variables principalement en raison des différences agro-climatiques dans le Karnataka (Bongale et coll., 1993) et dans l'Andhra Pradesh (Rupa et coll., 1993).

La croissance des vers à soie et les performances de récoltes de cocons vis-à-vis des feuilles de mûrier en fonction de différents stades de maturité ont été étudiées par Sudo et coll. (1981), Askari et Sharan (1982) et Krishnaswami et coll. (1970a), qui ont observé que les feuilles tendres du niveau supérieur étaient plus performantes que les feuilles du niveau intermédiaire et du niveau inférieur. Iwanari et Ohno (1969) ont observé que le nourrissage avec des feuilles du niveau supérieur contenant 14 % de sucres et 26,5 % de protéines était plus efficace sur le plan de la croissance larvaire que le nourrissage avec des feuilles appartenant à d'autres niveaux. Dans cette étude également, la teneur en sucre est maximale chez les feuilles du niveau supérieur (11,9 à 14,6 %, selon la variété, au stade feuille tendre 2) puis diminue progressivement dans des proportions variables aux stades de maturité et de croissance suivants (stades feuille mature à feuille sénescence 2 donnant respectivement 11 % à 5,7 %).

On peut en conclure que le taux de déplétion des éléments nutritifs chez les différents génotypes de mûrier varie en fonction du niveau de maturité. La teneur en eau, en protéines et en sucres est maximale chez les feuilles tendres puis diminue à mesure que les périodes de croissance et les niveaux de maturité augmentent. Les variétés exotiques (Acc. N° 79, English Black et Kosen) d'origine tempérée enregistrent des taux de déplétion des éléments nutritifs plus faibles pour les stades de croissance considérés, ce qui indique leur supériorité pour ce qui concerne la qualité de la feuille. Parmi les autres variétés (d'origine tropicale), les variétés performantes améliorées (DD, RFS-135 et RFS-175) donnent en général des résultats comparables à ceux obtenus avec les variétés exotiques. Les variétés traditionnelles courantes d'origine indigène (Mysore Local, greffon mère et M-5) sont inférieures pour ce qui concerne ces caractères. Ce type de variations pourrait faciliter la sélection de variétés améliorées et pourrait également constituer un critère important permettant d'identifier des phases de croissance et des degrés de maturité spécifiques de qualité de la feuille afin de planifier la levée en fonction des variétés.

STUDIES ON THE PHOTOSYNTHETIC $^{14}\text{CO}_2$ FIXATION: OCCURRENCE OF THE C_4 PHOTOSYNTHETIC SYNDROME IN MULBERRY (*MORUS* SPP.)

C. DAS, B.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, Murshidabad,
West Bengal, India.

The photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation capacity in fifteen indigenous, evolved and exotic mulberry (*Morus alba* L.) varieties was studied using radioactively labelled $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. The apparent photosynthesis was found to be significantly higher in the triploid cultivars Tr-10, S-1635 and C-1730 than in S-799, C-763, S-54 and Kanva-2, considered as high-yielding cultivars. A positive correlation in their photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation rate with the chlorophyll content was observed, except in S-1 (Mandalaya) which showed a considerably high photosynthetic efficiency. Goshwerami, among the exotic varieties, showed greater apparent photosynthesis. A greater amount of ^{14}C incorporation was registered in malic and aspartic acids, the four-carbon compounds in triploid cultivars. The ratio of C_3/C_4 compound was also below unity, indicating the dominance of C_4 -dicarboxylic acid compounds. Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) was more active in the triploid varieties than ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39), which strongly suggests the possibility of occurrence of a more 'efficient' C_4 -photosynthetic syndrome in mulberry genotypes, which may be utilised profitably for screening 'efficient' cultivars for future breeding programmes.

Keywords: Chlorophyll, photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation, C_3/C_4 ratio, malate, aspartate, PEP carboxylase, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, mulberry genotype.

INTRODUCTION

The yield of a crop is the cumulative consequence of various physiological as well as biochemical processes, e.g., CO_2 assimilation, translocation of photoassimilates, mineral uptake, differentiation and development. Recent research on crop physiology suggests that total biomass production and the yield of different crops depend primarily on photosynthetic CO_2 assimilation (Menon and Srivastava, 1984; Venkatarami *et al.*, 1987). About 90% of the dry weight of higher plants is derived from CO_2 assimilated by photosynthesis (Zelitch, 1982). Crop or canopy photosynthesis (average photosynthetic rate, i.e., $\text{Pn} \times \text{total leaf area}$) is considered as the basis of total biomass production (Swain *et al.*, 1986). Biological yield, which is derived from total biomass production in any green plant — either grain or forage crop, is influenced by the rate of apparent photosynthesis of the plants (Loomis and Williams, 1969; Austin, 1989). Chakraborty (1993) while investigating with some mulberry (*Morus alba* L.) cultivars also correlated the photosynthetic activity with the yield.

A careful survey of the literature reveals that the plant kingdom has been broadly classified into two major groups depending on their efficiency to fix photosynthetic CO_2 fixation, i.e., C_3 and C_4 plants (Downton, 1975; Raghavendra and Das, 1978).

It is well documented that plants having the C_4 photosynthetic syndrome (where the first photosynthetic product is oxaloacetic acid which is quickly converted to malic acid, a four-carbon compound) are superior to C_3 plants (the first photosynthetic product is 3-phosphoglyceric acid, a three-carbon compound) with respect to adaptation to adverse climatic conditions (drought, salinity, light, thermal stress, etc.). They are efficient in absorbing more CO_2 from the external atmosphere, capable to use water efficiently under limited water supply and have greater rates of net photosynthesis

at day temperature (30-35 °C). Translocation rates, which are often correlated with photosynthetic rates that ultimately govern the yield potential of the crop, are also rapid in C4 plants (Bhagsari and Brown, 1976). They are 'efficient' in utilising more of nitrogen under field conditions (Monson, 1989; Brown, 1978). Since a positive correlation has been established between yield and the above physiological parameters of the plants and since mulberry leaves act as a site of photosynthesis and contribute maximum towards total dry matter accumulation, an attempt was made from the present investigation to examine the possibility of having photosynthetically 'efficient' and productive genotypes of mulberry (*Morus alba* L.).

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

Fifteen varieties of mulberry (*Morus alba* L.) were chosen for the experiments. The plants were grown in the experimental fields of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, under controlled conditions in the well-manured plots. Five leaf discs were taken from the middle portion of the seventh unfolded leaf (from the tip of the main shoot) to study the $^{14}\text{CO}_2$ fixation using the radioactively labelled method $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ of Sen and Leopold (1956). The leaf sections were taken inside a photosynthetic chamber (1200 ml capacity) which was emerged in a water bath, the temperature of which was maintained at 20 °C. The leaf sections were exposed to light (10,000 lux). $^{14}\text{CO}_2$ was generated from $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (100 μCi ; sp. act. 45 $\mu\text{Ci}/\text{millimole}$) with lactic acid in a glass bottle outside the chamber and the gas was introduced inside the chamber.

The concentration of CO_2 inside the chamber was 0.05% (V/V). The leaf tissues were exposed for 15 seconds to $^{14}\text{CO}_2$. After photosynthesis, the unused $^{14}\text{CO}_2$ was trapped in a train of alkali jars (containing saturated NaOH). After photosynthesis, a portion of the green tissues was fixed in 70% boiling alcohol and fractionated as alcohol-soluble and alcohol-insoluble fractions. The alcohol-soluble fraction was vacuum-evaporated and analysed for different photosynthetic products. For determination of total $^{14}\text{CO}_2$ fixation, the leaves after drying (80 °C) were powdered and counted on a GM counter in saturation thickness.

Paper chromatography and autoradiography:

The extract was chromatographed two dimensionally on a Whatman No. 1 filter paper with water-saturated phenol as the first and butanol:acetic acid:water (4:1:1 V/V/V) as the second solvent. The radioactive areas were located as black spots by exposure of the chromatograms to a Tndu X-ray film, eluted with warm water. The elute was dried and counted in a stainless steel planchet with a windowless gas flow counter. The spots were identified using Rf values of the authentic samples.

Extraction and estimation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) and phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase:

The methods of Bjorkman and Gauhl (1969) were followed for the isolation of these two photosynthetic enzymes, using $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

RuBP carboxylase was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and gel filtration following the method of Chakraborty and Saha (1982).

Assay of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39):

The assay buffer contained 0.1 M tris HCl and 5.5 mmole MgCl_2 at pH 8.2. The reaction mixture contained 0.3 ml of 20 mmole $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (100,000 CPM) and 0.1 ml H_2O . Reaction was started by adding 0.2 ml of the enzyme to the reaction mixture and incubated at 25 °C and 0.4 ml aliquots were withdrawn after 1 min., added to the planchet and counted in the GM Counter.

Assay of phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31):

The incubation medium containing 1 ml of 40 mmole tris HCl, buffer 0.1 ml of 10 mmole Mg_2SO_4 , 0.1 ml of 10 mm $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, 5 mg of malic dehydrogenase and 0.2 ml of 1 mg. ml^{-1} NADH was taken in a spectrophotometer cuvette. The reference contained only 0.2 ml of glass distilled water

instead of NADH. The reaction was started by adding 0.1 ml of 4 mmole PEP (phosphoenolpyruvate) to both cuvettes and the change of optical density at 340 nm was recorded.

Estimation of protein:

The protein content of the enzyme extract was determined as per the method described by Lowry *et al.* (1951). Enzyme activity was expressed in terms of cpm (counts per minute) $^{14}\text{CO}_2$ fixed per mg of soluble protein.

RESULTS

Total chlorophyll content and Chl *a*:Chl *b* ratio in relation to $^{14}\text{CO}_2$ fixation:

The total chlorophyll, Chl *a*, Chl *b* and Chl *a*:Chl *b* ratio of different cultivars are presented in Table I. The chlorophyll was found to vary in quality and quantity in the different cultivars. The high-yielding varieties (S-1635, BC₂59, Tr-10, China White, S-54 and Goshierami) were surprisingly richer in total chlorophyll. The triploid cultivars (Tr-10, S-1635 and C-1730) showed the same or more Chl *a*, Chl *b* and total chlorophyll than the other cultivars. Goshierami contained more total chlorophyll and a higher Chl *a*:Chl *b* ratio than the other two temperate varieties, i.e., Kosen and Ichinose (Table I). Chl *a* and total chlorophyll are advantageous since Chl *a* is the most important

Table I. Variation in chlorophyll content in different cultivars of mulberry (*Morus* spp.).

Tableau I. Variation de la teneur en chlorophylle chez différents cultivars de mûrier (*Morus*).

Mulberry cultivar	Chlorophyll content (mg.g ⁻¹ fresh tissue)			Chl <i>a</i> :Chl <i>b</i> ratio
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Total Chl	
Cultivar de mûrier	Teneur en chlorophylle (mg/g de tissu frais)			Rapport Chl <i>a</i> :Chl <i>b</i>
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl totale	
Kajli	1.306	0.422	1.728	3.095
Bombay local	1.361	0.418	1.779	3.256
S-1	2.788	0.780	3.568	3.575
S-799	3.127	0.932	4.059	3.355
C-763	2.478	0.717	3.196	3.458
S-54	3.590	1.010	4.600	3.554
Tr-10	3.846	1.028	4.874	3.742
S-1635	3.588	0.948	4.536	3.785
C-1730	4.052	1.190	5.242	3.405
BC ₂ 59	4.142	1.103	5.245	3.755
China White	3.923	1.129	5.152	3.475
Kosen	3.099	0.932	4.031	3.325
Kanva-2	2.952	0.907	3.859	3.255
Goshierami	4.067	1.160	5.227	3.506
Ichinose	3.298	1.055	4.353	3.126

Chlorophyll was extracted from the seventh leaf. Each value is the mean of five determinants.

La chlorophylle a été extraite à partir de la septième feuille. Chaque valeur correspond à la moyenne de cinq déterminations.

pigment in photosynthesis. The incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ in the high-yielding cultivars, i.e., Tr-10, S-1635, C-1730, China White, Goshierami and Ichinose, was much higher than in the low yielders, Kajli and Bombay local, irrespective of the basis of dry tissue, total chlorophyll and unit leaf area. Interestingly, although S-799, S-54, Kosen and the most efficient cultivar, Kanva-2, contained more chlorophyll and a greater Chl *a*:Chl *b* ratio, the $^{14}\text{CO}_2$ incorporation was found to be comparatively less (Tables I and II).

Table II. Photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ incorporation in the leaf tissues of mulberry cultivars (*Morus* spp.) and ^{14}C activities in alcohol-soluble (AS) and alcohol-insoluble (AIS) fractions.

*Tableau II. Incorporation par photosynthèse de $^{14}\text{CO}_2$ dans les tissus foliaires de cultivars de mûrier (*Morus*) et activités ^{14}C dans des fractions solubles (AS) et insolubles (AIS) dans l'alcool.*

Mulberry cultivars <i>Cultivars de mûrier</i>	CPM $\times 10^{-3}$					
	per mg dry tissue	per mg total chlorophyll	per cm ² leaf area	AS	AIS	AS:AIS ratio
	<i>par mg tissu sec</i>	<i>par mg chlorophylle totale</i>	<i>par cm² de surface foliaire</i>	<i>AS</i>	<i>AIS</i>	<i>Rapport AS:AIS</i>
Kajli	50.63	62.64	64.42	25.64	22.49	1.14
Bombay local	66.52	74.64	74.66	32.72	31.16	1.05
S-1	121.64	115.63	154.81	75.65	47.57	1.59
S-799	76.59	73.65	79.29	22.70	14.74	1.54
C-763	80.45	87.50	86.93	29.45	18.17	1.62
S-54	76.47	82.50	81.86	24.40	15.64	1.56
Tr-10	138.28	128.64	175.99	75.65	40.62	1.89
S-1635	144.68	130.75	184.14	82.45	47.11	1.75
C-1730	92.26	95.32	105.43	35.70	21.63	1.65
BC259	84.45	92.64	82.02	27.50	18.58	1.48
China White	100.99	102.95	128.52	55.37	52.23	1.06
Kosen	70.75	82.45	84.58	20.75	16.60	1.25
Kanva-2	86.74	82.75	82.20	21.75	14.03	1.55
Goshierami	158.86	121.55	202.18	57.84	83.82	0.69
Ichinose	99.77	95.75	126.97	39.79	36.50	1.09

Each value is the mean of five determinants / Chaque valeur correspond à la moyenne de cinq déterminations.

Incorporation of ^{14}C in different photosynthetic products:

Greater incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ in alcohol-soluble fractions in the high-yielding cultivars was observed. However, preferential accumulation of ^{14}C was observed in the alcohol-soluble fraction in all the cultivars studied. High-yielding cultivars showed more ^{14}C accumulation in the alcohol-soluble fraction than the low-yielding cultivars (Kajli and Bombay local). Surprisingly, China White (1.06), Goshierami (0.69) and Ichinose (1.09) showed less incorporation of ^{14}C in the alcohol-soluble fraction.

Chromatographic resolution of the alcohol-soluble fractions revealed significant differences in the labelling pattern of ^{14}C among the cultivars. Among sugars, sucrose was the most abundantly labelled compound, followed by glucose and fructose. However, comparatively lower ^{14}C

Table III. Incorporation of ^{14}C into different photosynthetic products of the developing leaf (seventh) after 15 seconds of photosynthesis in $^{14}\text{CO}_2$.

Tableau III. Incorporation de ^{14}C dans différents produits de photosynthèse chez une feuille en cours de développement (septième feuille) après 15 secondes de photosynthèse dans du $^{14}\text{CO}_2$.

Mulberry cultivar	Carbohydrates			PGA + PEP	Amino acids					Organic acids			Ratio of C_3/C_4 compound
	Sucrose	Glucose	Fructose		Glycine + serine	Alanine	Glutamic acid	Aspartic acid	Tyrosine	Malate	Citrate	Succinate	
Cultivar de mûrier	Hydrates de carbone			PGA + PEP	Acides aminés					Acides organiques			Taux de composés C_3/C_4
	Saccharose	Glucose	Fructose		Glycine + sérine	Alanine	Acide glutamique	Acide aspartique	Tyrosine	Malate	Citrate	Succinate	
Kajli	3,674	976	584	126	429	79	136	384	46	242	249	384	1.01
Bombay local	6,632	1,202	1,016	387	317	108	145	296	136	349	406	426	1.25
S-1	6,789	1,235	1,078	329	328	124	129	267	78	328	326	387	1.31
S-799	6,716	948	842	427	414	145	244	364	108	145	328	328	1.93
C-763	7,926	1,367	1,026	397	456	165	215	317	172	329	416	496	1.57
S-54	5,678	1,567	1,264	484	402	135	245	394	163	384	425	586	1.31
Tr-10	7,848	1,268	1,342	387	472	164	136	642	148	684	428	486	0.76
S-1635	8,264	1,478	1,364	324	306	136	149	528	172	596	364	389	0.67
C-1730	6,842	1,626	1,002	346	384	156	256	564	172	564	328	402	0.78
BC ₂ 59	7,864	1,348	1,267	264	425	145	136	378	184	426	364	402	1.03
China White	7,216	987	842	328	316	179	216	426	145	478	376	426	0.91
Kosen	6,678	1,067	1,064	424	302	135	245	304	143	325	405	506	1.36
Kanva-2	5,846	1,264	936	456	326	104	316	264	284	302	420	269	1.56
Goshoerami	7,268	1,269	1,208	528	386	145	240	326	160	328	456	498	1.61
Ichinose	6,947	947	1,026	328	297	98	268	209	156	145	384	259	2.04

Each value is the mean of five determinants / Chaque valeur correspond à la moyenne de cinq déterminations.

C_3 compounds are: phosphoglyceric acid (PGA), phosphoenolpyruvic acid (PEP), glycine + serine and alanine / Les composés C_3 sont : l'acide phosphoglycérique (PGA), l'acide phosphoenolpyruvique (PEP), la glycine + sérine et l'alanine.

C_4 compounds are: aspartic acid and malic acid (malate) / Les composés C_4 sont : l'acide aspartique et l'acide malique (malate).

incorporation in sucrose, glucose and fructose was recorded in the Tr-10, S-1635 and C-1730 cultivars. Amino acids, e.g., aspartate (C₄ compound), alanine, glycine + serine, glutamate and tyrosine, were preferentially labelled over organic acids. Among organic acids, malate is a major recipient of ¹⁴C activity as compared to succinate and citrate in the triploids Tr-10, C-1730 and S-1635, whereas phosphoglyceric acid (PGA) and phosphoenolpyruvate (PEP) showed less incorporation than the other high-yielding cultivars. The triploid cultivars Tr-10, S-1635 and C-1730 registered a lower value of C₃/C₄ compound ranging from 0.68 to 0.78, whereas BC₂59 (1.04) and China White (0.91) showed closer to unity.

RuBP and PEP carboxylase activities:

The activities of these two carboxylating enzymes directly involved in ¹⁴CO₂ incorporation during photosynthesis of both high- and low-yielding cultivars were compared (per mg protein) with that of pea (a typical C₃ plant) and maize (a typical C₄ plant). RuBP carboxylase activity, or activities, in general was (were) always lower than that of PEP carboxylase enzyme (Table IV).

Table IV. Changes in the level of two photosynthetic enzymes isolated from the seventh leaf (from the tip) of five mulberry cultivars.

Tableau IV. Variation du taux de deux enzymes de photosynthèse isolées à partir de la septième feuille (depuis l'extrémité) de cinq cultivars de mûrier.

Mulberry cultivars	C ₃ /C ₄ ratio	CPM.mg ⁻¹ protein		PEP carboxylase/RuBP carboxylase ratio
		RuBP carboxylase	PEP carboxylase	
Cultivars de mûrier	Rapport C ₃ /C ₄	CPM/mg de protéine		Rapport PEP carboxylase/RuBP carboxylase
		RuBP carboxylase	PEP carboxylase	
Kajli	1.0127	19.75	130.50	6.607
Tr-10	0.7434	59.35	733.80	12.364
S-1635	0.6832	65.75	736.50	11.201
BC ₂ 59	1.0373	24.50	134.50	5.489
S-799	1.9390	15.50	20.50	1.322
Pea (C ₃ plant) / Pois (plante C ₃)		977.43	678.34	0.694
Maize (C ₄ plant) / Maïs (plante C ₄)		4.34	79.64	18.346

Each value is the mean of three determinants / Chaque valeur correspond à la moyenne de trois déterminations.

The ratio of PEP carboxylase/RuBP carboxylase was found to be greater in the high-yielding cultivars (S-1635, Tr-10), intermediate in BC₂59 and S-799, whereas a smaller value was obtained in the low-yielding cultivar Kajli. A triploid Tr-10 showed the highest ratio (12.364) among the five cultivars tested. The activities were intermediate between that of pea and maize. It is evident that the ratios were negatively correlated with the ratios of C₃/C₄ compounds.

DISCUSSION

While reviewing our experimental results to establish a correlation of some physiological parameters with the yield potential of mulberry genotypes, it was observed that the greater the chlorophyll content, the higher will be the efficiency of CO_2 fixation. Approximately 90% of the dry weight of the plant is derived from the CO_2 assimilated through photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation with the help of solar energy trapped by chlorophyll molecules. Therefore, an increase in the photosynthetic rate with a higher chlorophyll content has a positive correlation and can be beneficial for plant productivity (Zelitch, 1982, 1992; Das and Reddy, 1988). The chlorophyll content and Chl *a*:Chl *b* ratio, which are considered as a primary index of photosynthetic efficiency, were always higher in the high-yielding cultivars, indicating that these varieties are capable in harvesting the solar energy efficiently.

Analysis of alcohol-soluble products under short-term photosynthesis for 15 seconds under exposure of $^{14}\text{CO}_2$ indicates that the mulberry plant is basically a C_3 plant because, when C_3/C_4 are estimated, the phosphoglyceric acid and phosphoenolpyruvic acid are preferentially levelled in the majority of the cultivars. S-799, C-763, Kanva-2, S-1 (Mandalaya), Bombay local and Kajli do show the C_3 photosynthetic behaviour. Some of the temperate varieties, i.e., Kosen, Goshorami, Ichinose, do possess the C_3 type of photosynthesis. China White had the lowest C_3/C_4 ratio. But, among the triploid varieties, Tr-10, S-1635 and C-1730 had relatively high levels of malic and aspartic acids, indicating a reduction in the ratio of C_3/C_4 compounds which is suggestive of the C_4 nature of the triploid cultivars and they are malate former since malate is the major recipient of radioactivity. It is further strengthened by the presence of more malic and aspartic acids, the two C_4 compounds. The C_4 nature of the photosynthetic syndrome of some exotic mulberry varieties was also reported by Chakraborty (1993) who observed that malic and aspartic acids were predominantly labelled under exposure of $^{14}\text{CO}_2$ under short-term experiment. The accumulation of more malic and aspartic acids in order to generate 'efficient' C_4 photosynthetic behaviour was also reported in some selected plant genotypes of agricultural importance (Upadhyay and Karadge, 1991; Bravdo and Pallas, 1982; Rajmane and Karadge, 1986; Hatch *et al.*, 1975).

RuBP carboxylase, which accounts for 50% of leaf proteins (having an unusually higher molecular weight), has often been proclaimed to be the principal limiting factor in the photosynthetic productivity of higher plants. A positive correlation of bioproductivity to the photosynthetic capacity and leaf PEP carboxylase activity has been established in higher plants grown in field conditions (Brown and Bouton, 1993; Gifford, 1974; Puckridge, 1971; Dey *et al.*, 1989; Dey *et al.*, 1990). Genetic variation in the content of RuBP carboxylase and PEP carboxylase activities has been reported by Garret (1978) and Chakraborty and Saha (1988).

The level of PEP carboxylase activities is generally higher in triploid cultivars, e.g., Tr-10, S-1635 (Table IV) as compared to Kajli and S-799 which possess a greater C_3/C_4 ratio, suggesting that triploid cultivars are more efficient in harvested in the sun; this is further evidenced from the greater incorporation of ^{14}C activities per gram of dry matter, total chlorophyll and unit leaf area. The greater activity of PEP carboxylase further establishes the C_4 nature of photosynthesis in the triploid cultivars. Garret (1978) also reported that higher ploidy level enhanced the K_m value of PEP carboxylase in tetraploid rye, which indicates that the plants of higher ploidy level are more 'efficient' in recycling $^{14}\text{CO}_2$ through their leaf tissues.

Thus, efficient utilisation of $^{14}\text{CO}_2$ for photosynthesis, dominance of four-carbon malate and aspartate as revealed from the C_3/C_4 ratio and greater PEP carboxylase activity as compared to ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in the triploid cultivars clearly shows the occurrence of the C_4 photosynthetic syndrome. These characters have a positive correlation with greater biomass production in environments characterised by high temperature, high irradiance, periodic water shortage or low mineral nutrient supply (Brown and Bouton, 1993). The findings recorded above suggest that *Morus* sp. is basically a C_3 plant and one cause that determines the yield of the cultivars is the high 'efficient' utilisation of $^{14}\text{CO}_2$ during photosynthesis. The present study establishes strong positive correlation between the photosynthetic nature of leaves and the yield potential of the crop. If this is confirmed with a large number of cultivars, it may be a useful index for choosing 'efficient' strains with a greater photosynthetic capacity in future breeding programmes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their deep sense of gratitude to Prof. S.P. Sen, FNA, Department of Botany, Kalyani University, for providing laboratory facilities to work in the Radio-Tracer Laboratory and to Dr K. Sengupta, former Director, CSR & TI, Berhampore, for his keen interest for the investigation. They are thankful to Sri Somnath Adhya, SRA, Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, for helping in operating the PCL computer.

REFERENCES

- ARNON D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- AUSTIN R.B. (1989) Genetic variation in photosynthesis. *Rev. J. Agric. Sci., Cambridge*, 112, 287-294.
- BROWN R.H. (1978) A difference in N-use efficiency in C₃ and C₄ plants and its implications in adaptation and evolution. *Crop Science*, 18, 93-98.
- BRAVDO B., PALLAS J.F. Jr (1982) Photosynthesis, photorespiration and RuBP case/oxygenase activity in selected plant genotypes. *Photosynthetica*, 16, 36-42.
- BROWN R.H., BOUTON J.H. (1993) Physiology and genetics of interspecific hybrids between photosynthetic types. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 44, 435-456.
- BJORKMAN O., GAUHL F. (1969) Carboxy dismutase activity in plants with and without β -carboxylation photosynthesis. *Planta*, 88, 197.
- BHAGSARI A.S., BROWN R.H. (1976) Photosynthesis in peanut (*Arachis*) genotypes. *Peanut Science*, 3, 1-5.
- CHAKRABORTY S. (1993) Photosynthetic ¹⁴CO₂ incorporation in some exotic varieties of mulberry (*Morus* spp.). *Geobios*, 20, 200-205.
- CHAKRABORTY S., SAHA S.P. (1982) Photosynthetic behaviour of some high and low yielding cultivars of rice. *Plant Physiol. and Biochemistry*, 9, 119-129.
- DOWNTON W.J.S. (1975) The occurrence of C₄-photosynthesis among plants. *Photosynthetica*, 9, 96-105.
- DAS V.S.R., REDDY A.R. (1988) Photosynthetic productivity in field crop — A review. *Plant Physiol. and Biochem.*, 15, 1-17.
- DEY S.K., SINGH V.P., SWAIN P., MURTY K.S. (1989) Path coefficient of different leaf characters on photosynthetic rate in rice. *Indian J. Plant Physiol.*, 32, 244-246.
- DEY S.K., SINGH V.P., MURTY K.S. (1990) Selection for high photosynthetic productivity and yield in rice. *Indian J. Plant Physiol.*, 33, 256-258.
- GARRETT M.K. (1978) Control of photorespiration at RuBP carboxylase/oxygenase level in rye grass cultivars. *Nature*, 274, 913-915.
- GIFFORD R.M. (1974) A comparison of potential photosynthetic productivity and yield of plant species with differing photosynthetic metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1, 107-117.
- HATCH M.D., KAGAWA T., CRAIG S. (1975) Subdivision of C₄ pathway species based on differing C₄ acid decarboxylating systems and ultra-structural features. *Aust. J. Plant Physiol.*, 2, 111-115.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.I., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-273.
- LOOMIS R.S., WILLIAMS W.A. (1969) Productivity and the morphology of the crop stand patterns with leaves. *In* *Physiological Aspects of Crop Yield*. Ed. J.D. Eton, F.A. Haskin, C.Y. Sullivan and C.H.M. Venbavel. ASA & CSSA Madison, Wisconsin, pp. 27-47.
- MONSON R.K. (1989) The relative contribution of photorespiration and improved water and nitrogen use efficiencies to the advantages of C₃-C₄ intermediate photosynthesis in *Flaveria*. *Oecologia*, 80, 215-221.
- MENON K.K.G., SRIVASTAVA H.C. (1984) Increasing plant productivity through improved photosynthesis. *Proc. Ind. Nat. Acad. Sci. (Plant Science)*, 93, 359-378.
- PUCKRIDGE D.W. (1971) Photosynthesis of wheat under field conditions. III. Seasonal trends in carbon dioxide uptake of crop communities. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 1-9.

- RAJMANE N.A., KARADGE B.A. (1986) Photosynthesis and photorespiration in winged beans (*Psodocarpus tetragonoloba* L.) grown under saline condition. *Photosynthetica*, 20, 139-145.
- RAGHAVENDRA A.S., DAS V.S.R. (1978) The occurrence of C₄-photosynthesis: A supplementary list of C₄ plants reported during late 1974-mid 1977. *Photosynthetica*, 12, 200-208.
- SWAIN P., PATTANAIK R.K., NAYAK S.K., MURTY K.S. (1986) Relationship between photosynthetic rate, growth components and yield in elite rice varieties. *J. Nuclear Agric. Biol.*, 15, 18-22.
- SEN S.P., LEOPOLD A.C. (1956) The influence of light and darkness on carbon dioxide fixation. *Plant Physiol.*, 31, 323-329.
- UPADHYAY A.B., KARADGE B.A. (1991) Photosynthesis in *Trianthema monogyna* during leaf development. *Indian J. Plant Physiol.*, 34, 178-185.
- VENKATARAMI S., SRIVASTAVA H.C., MENON K.K.G. (1987) Effect of mixtalol on physiological aspects of plant growth. *Plant Physiol. and Biochem.*, 14, 28-35.
- ZELITCH T. (1982) The close relationship between net photosynthesis and crop yield. *Bioscience*, 32, 796-802.
- ZELITCH T. (1992) Control of plant productivity by regulation of photorespiration. *Bioscience*, 42, 510-515.

ETUDES SUR LA FIXATION DU $^{14}\text{CO}_2$ PAR PHOTOSYNTHESE : PRESENCE DU SYNDROME DE PHOTOSYNTHESE C_4 CHEZ LE MURIER (*MORUS*)

C. DAS, B.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

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

*On a étudié la capacité de fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par photosynthèse chez quinze variétés de mûrier (*Morus alba* L.) indigènes, supérieures et exotiques à l'aide de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ marqué par radioactivité. La photosynthèse apparente est nettement plus élevée chez les cultivars triploïdes Tr-10, S-1635 et C-1730 que chez les cultivars S-799, C-763, S-54 et Kanva-2, qui sont considérés comme des cultivars performants. On observe une corrélation positive entre le taux de fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par photosynthèse et la teneur en chlorophylle, sauf chez S-1 (Mandalaya) qui présente une efficacité de photosynthèse extrêmement élevée. Parmi les variétés exotiques, Goshorami présente une photosynthèse apparente supérieure. On observe une quantité plus importante d'incorporation de ^{14}C dans les acides malique et aspartique, composés à quatre carbones, chez les cultivars triploïdes. Le rapport des composés C_3/C_4 est également inférieur à l'unité, ce qui dénote une dominance des composés d'acide C_4 -dicarboxylique. La phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) est plus active chez les variétés triploïdes que la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39), ce qui semble indiquer l'existence d'un syndrome de photosynthèse C_4 plus « efficace » chez les génotypes de mûrier qui pourrait être utilisé pour isoler les cultivars « efficaces » dans des programmes de sélection.*

INTRODUCTION

Le rendement d'une culture est la conséquence cumulée de divers processus physiologiques et biochimiques comme l'assimilation de CO_2 , la translocation des photoassimilats, l'absorption de minéraux, la différenciation et le développement. Des travaux récents sur la physiologie de certaines cultures indiquent que la production totale de biomasse et le rendement dépendent principalement de l'assimilation de CO_2 par photosynthèse (Menon et Srivastava, 1984 ; Venkatarami et coll., 1987). Environ 90% du poids sec des plantes supérieures sont dérivés de CO_2 assimilé par photosynthèse (Zetlich, 1982). La photosynthèse d'une culture ou d'une canopée (taux de photosynthèse moyen, c'est-à-dire $\text{Pn} \times$ surface foliaire totale) est considérée comme la base de la production totale de biomasse (Swain et coll., 1986). Le rendement biologique, qui est dérivé de la production totale de biomasse chez toutes les plantes vertes, que ce soit les cultures céréalières ou fourragères, est influencé par le taux apparent de photosynthèse de la plante (Loomis et Williams, 1969 ; Austin, 1989). Au cours d'une étude sur certains cultivars de mûrier (*Morus alba* L.), Chakraborty (1993) a établi une corrélation entre l'efficacité de photosynthèse et le rendement.

La lecture de la documentation révèle que le règne végétal est réparti en deux catégories principales en fonction de leur capacité à fixer le CO_2 par photosynthèse : les plantes C_3 et les plantes C_4 (Downton, 1975 ; Raghavendra et Das, 1978).

Il est admis que les plantes présentant le syndrome de photosynthèse C_4 (chez lesquelles le premier produit de la photosynthèse est l'acide oxaloacétique, converti rapidement en acide malique, un composé à quatre carbones) sont supérieures aux plantes C_3 (dont le premier produit de photosynthèse est l'acide 3-phosphoglycérique, un composé à trois carbones) pour ce qui concerne l'adaptation aux conditions climatiques défavorables (sécheresse, salinité, lumière, stress thermique, etc.). Elles peuvent absorber davantage de CO_2 dans l'atmosphère externe, elles sont capables

d'utiliser l'eau de manière efficace lorsque les réserves d'eau sont limitées et ont un taux supérieur de photosynthèse nette à température diurne (30-35 °C). Les taux de translocation, qui sont souvent corrélés avec les taux de photosynthèse gouvernant le potentiel de rendement d'une culture, sont également rapides chez les plantes C₄ (Bhagsari et Brown, 1976). Elles utilisent l'azote de manière efficace en milieu naturel (Monson, 1989 ; Brown, 1978). Partant du principe qu'une corrélation positive a été établie entre le rendement et ces paramètres physiologiques et que les feuilles de mûrier servent de site de photosynthèse et contribuent de façon maximale à l'accumulation de matière sèche totale, nous avons entrepris cette étude afin d'examiner la possibilité de l'existence de génotypes de mûrier (*Morus alba* L.) « efficaces » sur le plan de la photosynthèse et productifs.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal :

Quinze variétés de mûrier (*Morus alba* L.) ont été sélectionnées pour cette expérience. Les plants ont été cultivés dans la plantation expérimentale du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore en conditions régulées dans des parcelles précédemment fumées. Cinq morceaux de feuilles ont été prélevés sur la partie médiane de la septième feuille déployée (à partir du sommet de la tige principale) afin d'étudier la fixation du ¹⁴CO₂ suivant la méthode du NaH¹⁴CO₃ marqué par radioactivité de Sen et Leopold (1956). Les coupes de feuilles ont été transférées en chambre de photosynthèse (capacité de 1 200 ml) immergée dans un bain d'eau à 20 °C. Les coupes foliaires ont été exposées à la lumière (10 000 lux). Le ¹⁴CO₂ a été obtenu à partir de NaH¹⁴CO₃ (100 µCi; activité spécifique 45 µCi/millimole) mélangé à de l'acide lactique dans une bouteille en verre à l'extérieur de la chambre, puis le gaz a été introduit dans la chambre.

La concentration en CO₂ à l'intérieur de la chambre est de 0,05 % (V/V). Les tissus foliaires ont été exposés au ¹⁴CO₂ pendant 15 secondes. Après photosynthèse, le ¹⁴CO₂ a été capturé dans une série d'alcali (contenant du NaOH saturé). Après photosynthèse, les tissus verts ont été fixés dans de l'alcool bouillant à 70 % et divisés en deux fractions, l'une soluble et l'autre insoluble dans l'alcool. La fraction soluble a été évaporée sous vide et analysée afin de déterminer les différents produits de la photosynthèse. Pour la détermination de la fixation de ¹⁴CO₂ total, les feuilles séchées (à 80 °C) ont été pulvérisées et comptées sur un compteur GM sous épaisseur de saturation.

Chromatographie sur papier et autoradiographie :

L'extrait a été soumis à une chromatographie bidimensionnelle sur un papier filtre Whatman n° 1 avec du phénol saturé d'eau comme premier solvant et un mélange acide butanol:acide acétique:eau (4:1:1 V/V/V) comme deuxième solvant. Les zones radioactives ont été repérées sous la forme de taches noires par exposition des chromatogrammes sur un film rayons X Tndu, puis éluées dans l'eau chaude. L'éluat a été séché et compté sur une planchette en acier inoxydable à l'aide d'un compteur à circulation de gaz sans fenêtre. Les taches ont été identifiées d'après les valeurs R_f d'échantillons témoins.

Extraction et estimation de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (Rubisco) et de la phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase :

On a suivi les méthodes de Bjorkman et Gauhl (1969) pour isoler ces deux enzymes de photosynthèse en utilisant du NaH¹⁴CO₃.

La RuBP carboxylase a été purifiée par précipitation dans du (NH₄)₂SO₄ et par filtration sur gel selon le protocole de Chakraborty et Saha (1982).

Dosage de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) :

Le tampon de dosage contient 0,1 M tris HCl et 5,5 mmole MgCl₂, pH 8,2. Le mélange réactionnel contient 0,3 ml de 20 mmole NaH¹⁴CO₃ (100 000 CPM) et 0,1 ml H₂O. La réaction a été déclenchée en ajoutant au mélange réactionnel 0,2 ml d'enzyme incubée à 25 °C ; après 1 minute, 0,4 ml d'aliquotes ont été retirés et déposés sur la planchette puis comptés sur le compteur GM.

Dosage de la phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) :

Le milieu d'incubation, qui contient 1 ml de tampon tris HCl 40 mM, un tampon 0,1 ml de $MgSO_4$ 10 mM, 0,1 ml $NaH^{14}CO_3$ 10 mM, 5 mg de déshydrogénase malique et 0,2 ml de NADH à 1 mg/ml, a été déposé dans une cuvette de spectrophotomètre. Le mélange de référence contient uniquement 0,2 ml d'eau distillée au lieu de NADH. La réaction a été déclenchée en ajoutant 0,1 ml PEP (phosphoenolpyruvate) 4 mM aux deux cuvettes et la variation de la densité optique à 340 nm a été enregistrée.

Estimation des protéines :

La teneur en protéines de l'extrait enzymatique a été déterminée suivant la méthode de Lowry et coll. (1951). L'activité enzymatique a été exprimée en termes de CPM (coups par minute) $^{14}CO_2$ fixé par mg de protéines solubles.

RESULTATS

Teneur en chlorophylle totale et rapport Chl *a*:Chl *b* en fonction de la fixation du $^{14}CO_2$:

Les teneurs en chlorophylle totale, en Chl *a* et en Chl *b* ainsi que le rapport Chl *a*:Chl *b* chez les différents cultivars sont présentés dans le tableau I. La teneur et la qualité de la chlorophylle varient en fonction du cultivar. Les variétés performantes (S-1635, BC259, Tr-10, China White, S-54 et Goshocrami) sont nettement plus riches en chlorophylle totale. Les cultivars triploïdes (Tr-10, S-1635 et C-1730) présentent une teneur identique ou supérieure en Chl *a*, en Chl *b* et en chlorophylle totale à celle des autres cultivars. Goshocrami contient davantage de chlorophylle totale et présente un rapport Chl *a*:Chl *b* plus élevé que les deux autres variétés tempérées, Kosen et Ichinose (Tableau I). La Chl *a* et la chlorophylle totale sont des paramètres utiles car la Chl *a* est le pigment le plus important pour la photosynthèse. L'incorporation de $^{14}CO_2$ est beaucoup plus élevée dans les cultivars performants comme Tr-10, S-1635, C-1730, China White, Goshocrami et Ichinose que dans les cultivars à faible rendement Kajli et Bombay Local, quelle que soit la base retenue : tissu sec, teneur en chlorophylle totale ou unité de surface foliaire. Il est intéressant de noter que, bien que S-799, S-54, Kosen et le cultivar le plus efficace Kanva 2 aient une teneur supérieure en chlorophylle et un rapport Chl *a*:Chl *b* plus élevé, l'incorporation du $^{14}CO_2$ dans ces cultivars est comparativement faible (Tableaux I et II).

Incorporation de ^{14}C dans les différents produits de la photosynthèse :

L'incorporation de $^{14}CO_2$ dans les fractions solubles dans l'alcool est plus élevée chez les cultivars performants. Cependant, on observe une accumulation préférentielle de ^{14}C dans la fraction soluble dans l'alcool chez tous les cultivars étudiés. Les cultivars performants présentent une accumulation plus importante de ^{14}C dans la fraction soluble dans l'alcool que les cultivars à faible rendement (Kajli et Bombay Local). En revanche, China White (1,06), Goshocrami (0,69) et Ichinose (1,09) présentent une incorporation plus faible de ^{14}C dans la fraction soluble.

La résolution chromatographique des fractions solubles dans l'alcool fait apparaître des différences significatives du profil de marquage du ^{14}C entre les cultivars. Parmi les différents sucres, le saccharose est le composé le plus abondamment marqué, devant le glucose et le fructose. Cependant, on enregistre une incorporation comparativement plus faible de ^{14}C dans le saccharose, le glucose et le fructose chez les cultivars Tr-10, S-1635 et C-1730. Les acides aminés comme l'aspartate (composé C₄), l'alanine, la glycine + sérine, le glutamate et la tyrosine sont marqués de manière préférentielle par rapport aux acides organiques. Parmi les acides organiques, le malate reçoit davantage d'activité ^{14}C que le succinate et le citrate chez les triploïdes Tr-10, C-1730 et S-1635 tandis que l'acide phosphoglycérique (PGA) et le phosphoenolpyruvate présentent une incorporation plus faible que chez les autres cultivars performants. Les cultivars triploïdes (Tr-10, S-1635, C-1730) donnent une valeur plus faible du rapport C₃/C₄ situé entre 0,68 et 0,78 tandis que BC259 (1,04) et China White (0,91) présentent des valeurs proches de l'unité.

Activités de la RuBP carboxylase et de la PEP carboxylase :

Les activités de ces deux enzymes impliquées directement dans l'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ au cours de la photosynthèse chez les cultivars à faible et à haut rendement ont été comparées entre elles (par mg de protéines) et avec celle du pois (plante de type C₃) et du maïs (plante de type C₄). L'activité (ou les activités) de la RuBP carboxylase est (sont) toujours inférieure(s) à celle(s) de la PEP carboxylase (Tableau IV).

Le rapport PEP carboxylase/RuBP carboxylase est élevé chez les cultivars performants (S-1635, Tr-10), intermédiaire chez BC259 et S-799 et faible chez le cultivar à faible rendement Kajli. Sur les cinq cultivars testés, le triploïde Tr-10 présente le rapport maximal (12,364). Les activités sont intermédiaires par rapport à celles observées chez le pois et le maïs. Il apparaît clairement que les rapports sont négativement corrélés avec ceux des composés C₃/C₄.

DISCUSSION

En réalisant la synthèse de nos résultats expérimentaux afin d'établir la corrélation éventuelle entre certains paramètres physiologiques et le potentiel de rendement des génotypes de murier, nous avons observé que l'efficacité de fixation du CO₂ est d'autant plus forte que la teneur en chlorophylle est élevée. Environ 90% du poids sec de la plante sont dérivés du CO₂ assimilé par fixation par photosynthèse du $^{14}\text{CO}_2$ qui utilise l'énergie solaire capturée par les molécules de chlorophylle. L'augmentation du taux de photosynthèse est donc positivement corrélée avec une teneur élevée en chlorophylle et peut favoriser la productivité de la plante (Zelitch, 1982, 1992 ; Das et Reddy, 1988). La teneur en chlorophylle et le rapport de Chl *a*:Chl *b*, qui sont considérés comme des indices primaires de l'efficacité de la photosynthèse, sont toujours plus élevés chez les cultivars performants, ce qui indique que ces variétés utilisent l'énergie solaire de manière efficace.

L'analyse des produits solubles dans l'alcool exposés à une photosynthèse de courte durée (15 secondes sous $^{14}\text{CO}_2$) indique que le murier est une plante de type C₃ car l'estimation des composés C₃/C₄ montre que l'acide phosphoglycérique et l'acide phosphoenolpyruvique tendent à être nivelés chez la plupart des cultivars. S-799, C-763, Kanva-2, S-1 (Mandalaya), Bombay Local et Kajli présentent effectivement une photosynthèse de type C₃. Certaines des variétés tempérées (Kosen, Goshocrami, Ichinose) présentent également une photosynthèse de type C₃. China White donne le rapport C₃/C₄ le plus faible. Pour ce qui concerne les variétés triploïdes, Tr-10, S-1635 et C-1730 ont des teneurs en acides malique et aspartique relativement élevées, ce qui indique une diminution du rapport des composés C₃/C₄. Ceci suggère que ces cultivars sont de nature C₄ et qu'ils produisent du malate, le malate étant le principal récepteur de la radioactivité. Ceci est également corroboré par la présence d'une plus grande quantité d'acide malique et d'acide aspartique, deux composés C₄. La nature C₄ de la photosynthèse chez certaines variétés exotiques de murier a également été établie par Chakraborty (1993) qui a observé que les acides malique et aspartique sont marqués de manière dominante après exposition au $^{14}\text{CO}_2$ dans une expérience de courte durée. Le fait que l'accumulation d'acide malique et d'acide aspartique en quantités plus importantes permet de générer une photosynthèse de type C₄ plus efficace a également été observé chez des génotypes de plantes d'intérêt économique (Upadhyay et Karadge, 1991 ; Bravdo et Pallas, 1982 ; Rajmane et Karadge, 1986 ; Hatch et coll., 1975).

La RuBP carboxylase, qui contribue pour 50 % aux protéines foliaires (de poids moléculaire exceptionnellement élevé), est souvent considérée comme le facteur principal de limitation de la productivité de la photosynthèse chez les plantes supérieures. Une corrélation positive entre la bioproduktivité, la capacité de photosynthèse et l'activité PEP carboxylase des feuilles a été établie chez les plantes supérieures cultivées sur le terrain (Brown et Bouton, 1993 ; Gifford, 1974 ; Puckridge, 1971 ; Dey et coll., 1989, 1990). Garrett (1978) et Chakraborty et Saha (1988) ont observé des variations génétiques pour ce qui concerne le degré d'activité de la RuBP carboxylase et de la PEP carboxylase.

Le niveau d'activité de la PEP carboxylase est généralement plus élevé chez les cultivars triploïdes (par exemple Tr-10 et S-1635) (Tableau IV) que chez Kajli et S-799 qui présentent un rapport C₃/C₄ plus élevé. Ceci indique que les cultivars triploïdes utilisent le soleil de manière plus efficace, comme le montre l'incorporation plus importante de ^{14}C par gramme de matière sèche, de

chlorophylle totale et par unité de surface foliaire. L'activité supérieure de la PEP carboxylase confirme donc la nature C₄ de la photosynthèse chez ces cultivars. Garrett (1978) a également observé qu'un niveau de ploïdie élevé donnait une augmentation de la valeur de K_m de la PEP carboxylase chez le seigle tétraploïde; ce qui indique que les plantes à ploïdie élevée recyclent le ¹⁴CO₂ de manière plus efficace à travers leurs tissus foliaires.

L'utilisation efficace du ¹⁴CO₂ pour la photosynthèse, la dominance du malate et de l'aspartate à quatre carbones démontrée par le calcul du rapport C₃/C₄ et l'activité plus élevée de la PEP carboxylase par rapport à la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase mettent clairement en évidence la présence du syndrome de photosynthèse C₄ chez les cultivars triploïdes. Ces paramètres sont corrélés positivement avec une production élevée de biomasse dans les milieux caractérisés par une température et un ensoleillement élevés, un manque d'eau fréquent ou un faible apport en éléments minéraux (Brown et Bouton, 1993). Les résultats obtenus ici suggèrent que *Morus* est fondamentalement une plante C₃ et que le rendement des cultivars est, entre autres facteurs, déterminé par l'utilisation « efficace » du ¹⁴CO₂ lors de la photosynthèse. Cette étude permet d'établir une corrélation forte et positive entre la nature de la photosynthèse des feuilles et le potentiel de rendement de la culture. Si ceci se confirme sur un grand nombre de cultivars, ce paramètre pourra être utilisé comme indice utile pour le choix d'une variété « efficace » présentant une capacité de photosynthèse élevée dans des programmes de sélection.

EFFECT OF VAM FUNGI, *GLOMUS FASCICULATUM* AND *ACAULOSPORA LAEVIS*, AGAINST THE ROOT-KNOT NEMATODE OF MULBERRY

D.S. CHANDRASHEKAR¹, H. SHEKAR SHETTY¹ & R.K. DATTA²

1. Department of Studies in Applied Botany, University of Mysore, Manasagangothri, Mysore 570 006, India.

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

*Vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungal inoculation in mulberry (*Morus alba* L.) reduced the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, galling and nematode multiplication to a considerable extent of as high as 63.0 per cent in *Acaulospora laevis* and 54.2 per cent in *Glomus fasciculatum*. The treatment with *Meloidogyne incognita* (alone) showed 93.0 per cent infection. Corresponding growth characters, i.e., height of the plant, shoot and root dry weight, percentage of colonisation, root-knot index in comparison to the control, were 57.0 per cent for *G. fasciculatum* and 49.0 per cent for *A. laevis*. The presence of the nematode did not affect the VAM colonisation in the mulberry.*

Keywords: Mulberry, VAM fungi, root-knot nematode.

INTRODUCTION

Heavy incidence of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, was reported in mulberry (*Morus alba* L.) in sandy soils under irrigated conditions (Narayanan *et al.*, 1966). The root-knot nematode affecting mulberry was reported from all the countries practising sericulture. It causes stunting of the plant, chlorosis of the leaves and reduction of the leaf yield in mulberry (Campos *et al.*, 1974; Saha *et al.*, 1983). The leaf yield loss due to the root-knot nematode is reported to be about 10-12% (Govindaiah, 1990).

Vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus association improves the growth and general condition of host plants and is considered as an effective biofertiliser, especially from the phosphorus nutrition point of view. The major advantages of mycorrhizal plants over non-mycorrhizal plants include enhanced soil nutrient uptake as well as resistance and tolerance to root pathogens. These beneficial effects have been demonstrated in many crop plants (Schneck and Kellam, 1978; Bagyaraj *et al.*, 1980; Mosse, 1981; Jalali, 1989; Manibhushan Rao *et al.*, 1994; Raman, 1994; Raman and Gnanaguru, 1994).

Infection and multiplication of species of root pathogens, including the root-knot nematode, are minimum in plants inoculated with VAM fungi (Raman, 1994). There is no report available on the effect of VAM inoculation to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, of mulberry. Hence, a work has been carried out to apply the VAM technology to mulberry crops and the results are presented in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Experiments to study the response of mulberry cuttings to inoculation with VAM fungi and the interaction between selected VAM and *Meloidogyne incognita* were conducted in pots under

glasshouse conditions. The unrooted cuttings of the variety Kanva 2 were raised in sterile sandy loam soil pre-inoculated with a VAM fungi (sand:soil, 3:1) mixture containing in 1 gram soil 20 spores or 1 gram of root bits containing 80% of infection. The initial *Meloidogyne incognita* inoculation concentration was recorded as 400-450/250 ml of soil. The experiment was laid out in a completely randomised block design with four replications. There were six treatments with 24 cuttings in each treatment. The treatments were: T0, control (no inoculation); T1, *G. fasciculatum*; T2, *A. laevis*; T3, *M. incognita* (alone); T4, combination of *G. fasciculatum* and *M. incognita*; and T5, *A. laevis* and *M. incognita*. After 90 days' growth of plants, 10 plants from each treatment were uprooted and the data were recorded on the plant height, dry weight of shoots and roots and mycorrhizal colonisation of the roots (Phillips and Hayman, 1970). The method for isolation and estimation of root-knot was done as described by Southey (1970). The root-knot index was calculated as follows:

$$\text{Root-knot index} = \frac{\text{Number of roots with root-knot}}{\text{Total number of roots}} \times 100$$

RESULTS

All the plants inoculated with VAM fungi showed a remarkable increase in root colonisation. Treatment T2 (*A. laevis*) recorded maximum of 90.0% (Table I) followed by treatment T4 (inoculation of *G. fasciculatum* and *M. incognita*) which showed 86.1% colonisation and treatment T1 (*G. fasciculatum*) 82.4% colonisation. T0, the control (no inoculation), showed the least colonisation of 14.1%. The other growth characters recorded were:

Height of the plant (cm): Treatment T2 (*A. laevis*) recorded 134.0 (Table I) followed by treatment T1 (*G. fasciculatum*) 131.0; treatment T5 (*A. laevis* and *M. incognita*) recorded 89.0, which

Table I. Effect of inoculation with VAM fungi and root-knot nematode on growth and mycorrhizal colonisation in mulberry.

Tableau I. Effet de l'inoculation avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorrhiziens et avec le nématode des racines sur la croissance et la colonisation par les mycorhizes chez le mûrier.

Treatment	Mycorrhizal colonisation (%)	Plant height (cm)	Shoot dry wt. (g/plant)	Root dry wt. (g/plant)
Traitement	Colonisation par les mycorhizes (%)	Hauteur du plant (cm)	Poids sec des pousses (g/plant)	Poids sec des racines (g/plant)
T0	14.1	84.0	12.1	0.91
T1	82.4	131.0	13.1	1.4
T2	90.0	134.0	13.4	1.6
T3	26.0	61.0	6.1	0.49
T4	86.1	71.0	6.3	0.91
T5	79.1	89.0	10.1	0.94
CD at 5% (p = 0.05)	18.1	22.1	2.1	0.31

T0: Control (no inoculation) / Témoin (sans inoculation). T1: *Glomus fasciculatum*. T2: *Acaulospora laevis*. T3: *M. incognita* (alone / sans association). T4: *Glomus fasciculatum* + *M. incognita*. T5: *A. laevis* + *M. incognita*.

showed a significant increase as compared to T0 (control) with 84.0. It was followed by T4, 71.0, and T3, 61.0. The individual inoculation proved beneficial when compared to the combined inoculation.

Shoot dry weight (g): Treatment T2 (*A. laevis*) recorded 13.4, which was closely followed by T1 (*G. fasciculatum*), 13.1 and T0 (control), 12.1. Treatment T5 (*A. laevis* and *M. incognita*) had the lowest dry weight of 10.1 followed by T4, 6.3, and T3, 6.1. The combined inoculation did not contribute to the total shoot dry weight compared to individual inoculation.

Root dry weight (g): Treatment T2 (*A. laevis*) recorded 1.6, followed by T1 (*G. fasciculatum*) with 1.4. The combined inoculation with *M. incognita* recorded 0.94, T5, 0.91, T4, and 0.49, T3. There was a significant difference among the treatments compared to the control, T0, 0.91.

Root-knot index: Treatment T3 (*M. incognita* alone) recorded 93.0 galls/plant (Table II), whereas treatment T5 (*A. laevis* and *M. incognita*) recorded 54.2 galls/plant. Treatment T4 recorded 63.7 galls/plant.

Nematode number per 100 g soil: Treatment T3 (*M. incognita*) had 122, followed by treatment T4 (*G. fasciculatum*) with 76 and treatment T5 (*A. laevis* and *M. incognita*) with 64.0.

Population number per 5 g root: In treatment T3 (*M. incognita*), the population was maximum with 18 numbers and treatment T5 (*A. laevis* and *M. incognita*) had 7 numbers in the samples analysed.

DISCUSSION

The possible mechanism of VAM interaction with nematodes is that, when both are present in the soil, a certain degree of competition between them occurs and often the mycorrhizal association

Table II. Effect of inoculation with VAM fungi and root-knot nematode on galling and nematode population in mulberry.

Tableau II. Effet de l'inoculation avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorrhiziens et avec le nématode des racines sur le développement de la galle et la population de nématodes chez le mûrier.

Treatment	Root-knot index	<i>M. incognita</i> No./100 ml soil	Population No./5 g root
Traitement	Indice de galle	<i>M. incognita</i> (nombre pour 100 ml de terreau)	Population (nombre pour 5 g de racines)
T0	-	-	0
T1	-	-	0
T2	-	-	0
T3	93.0	122	18
T4	63.7	76.0	8
T5	54.2	64.0	7
CD at 5% (p = 0.05)	8.8	9.2	2.3

T0: Control (no inoculation) / *Témoin (sans inoculation)*. **T1:** *Glomus fasciculatum*. **T2:** *Acaulospora laevis*. **T3:** *M. incognita* (alone / *sans association*). **T4:** *Glomus fasciculatum* + *M. incognita*. **T5:** *A. laevis* + *M. incognita*.

of beneficial nature is preferred by the host (Sikora and Schneck, 1975). Further, the VAM association brings about certain physiological and biochemical changes in the host plant that restrict the infection and multiplication of root pathogens (Sikora, 1978).

The response of individual VAM association is effective in reducing the incidence of root-knot proliferation over its associative inoculated treatment. The growth depression due to nematode infestation was minimum when cuttings were pre-inoculated with VAM fungi. It may be concluded that inoculation of mulberry with the appropriate VAM fungus considerably improves the growth and general condition of the plant. Further, the VAM colonisation induces a certain sort of resistance to root-knot nematode infestation and multiplication. Hence, it is highly beneficial to have mycorrhizal mulberry cuttings for field cultivation, especially in areas where root-knot infestation is an endemic problem. Since the supply of mulberry saplings to sericulturists is in practice, the saplings can be pre-inoculated with VAM fungus before supply. This method is practicable and easily adaptable.

REFERENCES

- BAGYARAJ D.J., MANJUNATH A., REDDY D.R. (1980) Response of crop plants to VA mycorrhizal inoculation in an unsterile Indian soil. *New Phytol.* 33-36.
- CAMPOS A.R., LORDDLO L.G.E., ABREM D.C., OLIVEIRA D.A. (1974) Incidence of *Meloidogyne incognita* on mulberry varieties. In *Trabalicos apresentados de seuriaro de nematologia*. Diracicaba (ed. L.G.B. Dordello), Brazil, 6-7 Feb.
- GOVINDAIAH (1990) Studies on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, infecting mulberry. Ph.D. thesis, University of Mysore, India.
- JALALI B.L. (1989) Interaction between VA mycorrhiza and plant pathogens. *Mycorrhiza News*, 1, 1-2.
- MANIBHUSHAN RAO S., SREENIVASAPRASAD, BABY U.I. (1994) Fungal antagonists and VAM fungi for biocontrol of *R. soloni*, the rice sheath blight pathogen. *Nat. Symp. on Recent Dev. in Biocontrol of Plant Pathogens*, March 11-12, Madras, India, p. 6.
- MOSSE B. (1981) VAM research for tropical agriculture. *Research Bulletin*, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 194, 5-81.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1966) A note on the occurrence of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White), in local mulberry. *Indian J. Seric.*, 5, 33-34.
- PHILIPS J.M., HAYMAN (1970) Improved procedures for clearing and staining parasitic and VAM fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55, 158-161.
- RAMAN N. (1994) Role of mycorrhizae in biocontrol of plant pathogens. *Nat. Symp. on Recent Dev. in Biocontrol of Plant Pathogens*, March 11-12, Madras, India, p. 7.
- RAMAN N., GNANAGURU M. (1994) Biological control of Fusarium wilt of tomato by *Glomus fasciculatum*. *Nat. Symp. on Recent Dev. in Biocontrol of Plant Pathogens*, March 11-12, Madras, India.
- SAHA S.S., SINHIABABU P.S., SUKUL M.C. (1983) The effect of nematode infestation on mulberry plants and their effect on feeding silkworm (*Bombyx mori* L.). *Nematologia*, 29, 463-467.
- SCHNECK N.C., KELLAM M.K. (1978) The influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on disease development. *Flo. Agric. Tech. Bull.*, 798-816.
- SIKORA R.A., SCHNEBECK F. (1975) Effect of VAM (*Endogona mossae*) on the population dynamics of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and *M. hapt.* VIII International Plant Protection Congress, Moscow, pp. 158-164.
- SIKORA R.A. (1978) Einfluss der endotrophen Mycorrhiza (*Glomus mosseae*) auf das Wirt-Parasit-Verhältnis von *M. incognita* Tomoten. *Z. Pflkrankh. Pflanzem Schutz*, 85, 197-202.
- SOUTHEY J.F. (1970) Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. *Technical Bulletin No. 2*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationery Office, London.

EFFET DES CHAMPIGNONS VÉSICULAIRES ARBUSCULAIRES MYCORHIZIENS *GLOMUS FASCICULATUM* ET *ACAULOSPORA LAEVIS* CONTRE LE NEMATODE DE LA GALLE DES RACINES CHEZ LE MURIER

D.S. CHANDRASHEKAR¹, H. SHEKAR SHETTY¹ & R.K. DATTA²

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

*L'inoculation de champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens chez le mûrier (*Morus alba* L.) entraîne une diminution de l'infestation par la galle des racines (*Meloidogyne incognita*) et une réduction de la multiplication des nématodes atteignant 63,0 % avec *Acaulospora laevis* et 54,2 % avec *Glomus fasciculatum*. Le traitement avec *Meloidogyne incognita* (sans association) donne un taux d'infestation de 93,0 %. Les caractères liés à la croissance, c'est-à-dire la hauteur du plant, le poids sec des pousses et des racines, le pourcentage de colonisation et l'indice de galle des racines, sont supérieurs au témoin de 57,0 % pour *G. fasciculatum* et de 49,0 % pour *A. laevis*. La présence du nématode n'a pas d'effet sur la colonisation du mûrier par les champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens.*

INTRODUCTION

L'incidence du nématode de la galle des racines (*Meloidogyne incognita*) est particulièrement élevée chez le mûrier (*Morus alba* L.) cultivé en terrain sablonneux et en milieu irrigué (Narayanan et coll., 1966). L'infestation du mûrier par le nématode de la galle des racines a été observée dans tous les pays pratiquant la sériciculture. Le nématode provoque l'étiollement de la plante, la chlorose des feuilles et une diminution du rendement en feuilles chez le mûrier (Campos et coll., 1974 ; Saha et coll., 1983). La perte de rendement en feuilles due au nématode de la galle des racines est de l'ordre de 10 à 12 % (Govindaiah, 1990).

L'association de champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens permet d'améliorer la croissance et l'état général des plantes hôtes : ces champignons sont considérés comme un engrais biologique efficace, en particulier pour ce qui concerne l'apport nutritionnel de phosphore. Les principaux avantages des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées sont l'enrichissement du sol en éléments nutritifs ainsi que la résistance et la tolérance aux agents pathogènes des racines. Ces effets positifs ont été démontrés chez de nombreuses plantes cultivées (Schneck et Kellam, 1978 ; Bagyaraj et coll., 1980 ; Mosse, 1981 ; Jalali, 1989 ; Manibhushan Rao et coll., 1994 ; Raman, 1994 ; Raman et Gnanaguru, 1994).

L'infestation et la multiplication des espèces d'agents pathogènes des racines, dont fait partie le nématode de la galle des racines, sont minimales chez les plantes traitées avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens (Raman, 1994). Il n'existe aucune étude sur l'effet de l'inoculation de champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens sur le nématode de la galle des racines *Meloidogyne incognita* du mûrier. Une expérience a donc été réalisée pour appliquer la technologie des mycorhizes vésiculaires arbusculaires sur les cultures de mûrier : les résultats obtenus sont décrits dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences visant à étudier la réaction des boutures de mûrier à l'inoculation avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorrhiziens et l'interaction entre les mycorrhizes vésiculaires arbusculaires sélectionnées et *Meloidogyne incognita* ont été réalisées dans des pots sous serre. Des boutures non racinées de la variété Kanva 2 ont été cultivées en terreau de sable gras stérile (rapport sable/sol : 3/1) préalablement inoculé avec un mélange des champignons vésiculaires arbusculaires mycorrhiziens contenant 20 spores par gramme de sol ou 1 gramme de morceaux de racines infestées à 80 %. La concentration initiale de *Meloidogyne incognita* est de 400 à 450/250 ml de sol. L'expérience a été réalisée selon la méthode des blocs aléatoires avec quatre répétitions. On a effectué six traitements comportant 24 boutures chacun. Ces traitements sont T0, témoin (sans inoculation) ; T1, *G. fasciculatum*, T2, *A. laevis* ; T3, *M. incognita* (sans association) ; T4, mélange de *G. fasciculatum* et *Meloidogyne incognita* ; T5, *A. laevis* et *M. incognita*. Après 90 jours de croissance, 10 plantes de chacun des traitements ont été déracinées : les données enregistrées portent sur la hauteur du plant, le poids sec des pousses et des racines et la colonisation mycorrhizienne des racines (Philips et Hayman, 1970). L'isolement et l'estimation de la galle des racines ont été réalisés suivant la méthode de Southey (1970). L'indice de galles des racines a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Indice de galle des racines} = \frac{\text{Nombre de racines avec des galles}}{\text{Nombre total de racines}} \times 100$$

RESULTATS

La colonisation des racines augmente de manière marquée chez tous les plants inoculés avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorrhiziens. Le traitement T2 (*A. laevis*) donne une valeur maximale de 90 % (Tableau I), devant le traitement T4 (inoculation de *G. fasciculatum* et *M. incognita*) qui donne une colonisation de 86,1 % et le traitement T1 (*G. fasciculatum*) avec 82,4% de colonisation. Le traitement témoin T0 (sans inoculation) donne le taux de colonisation le plus faible (14,1 %). Les résultats obtenus pour les autres paramètres de croissance sont décrits ci-dessous.

Hauteur du plant (cm) :

Le traitement T2 (*A. laevis*) donne 134,0 (Tableau I), devant le traitement T1 (*G. fasciculatum*), 131,0, et le traitement T5 (*A. laevis* et *M. incognita*) qui donne une hauteur de 89,0, représentant une augmentation significative par rapport au traitement T0 (témoin) avec 84,0. Les valeurs suivantes sont obtenues chez les traitements T4 avec 71,0 et T3 avec 61,0. L'inoculation individuelle s'avère plus efficace que l'inoculation combinée.

Poids sec des pousses (g) :

Le traitement T2 (*A. laevis*) donne 13,4, juste devant le traitement T1 (*G. fasciculatum*) avec 13,1 et le traitement T0 (témoin) avec 12,1. Le traitement T5 (*A. laevis* et *M. incognita*) donne un poids sec plus faible de 10,1, ainsi que le traitement T4 (6,3) et le traitement T3 (6,1). L'inoculation combinée contribue moins au poids sec total des pousses que l'inoculation individuelle.

Poids sec des racines (g) :

Le traitement T2 (*A. laevis*) donne une valeur de 1,6, devant le traitement T1 (*G. fasciculatum*) avec 1,4. L'inoculation combinée avec *M. incognita* donne 0,94, pour le traitement T5 et 0,91 pour le traitement T4 contre 0,49 pour le traitement T3. Il y a une différence significative entre les traitements et le témoin T0, dont la valeur est de 0,91.

Indice de galles des racines :

Le traitement T3 (*M. incognita* sans association) donne 93,0 galles/plant (Tableau II) tandis que le traitement T5 (*A. laevis* et *M. incognita*) donne 54,2 galles/plant. Le traitement T4 donne 63,7 galles/plant.

Nombre de nématodes pour 100 g de sol :

Le traitement T3 (*M. incognita*) donne 122 nématodes, devant le traitement T4 (*G. fasciculatum*) avec 76 nématodes et le traitement T5 (*A. laevis* + *M. incognita*) avec 64,0 nématodes.

Population pour 5 g de racines :

Chez le traitement T3 (*M. incognita*) la population est maximale avec 18 individus. Le traitement T5 (*A. laevis* + *M. incognita*) donne une population de 7 individus dans les échantillons analysés.

DISCUSSION

Les mécanismes probables de l'interaction des mycorhizes arbusculaires vésiculaires avec le nématode sont liés au fait que, lorsque les deux sont présents dans le sol, ils entrent en compétition et l'association mycorhizienne, qui est de nature bénéfique, est préférée par l'hôte (Sikora et Schnebeck, 1975). De plus, l'association avec les champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens provoque des modifications physiologiques et biochimiques chez la plante hôte qui limitent l'infestation et la multiplication des agents pathogènes des racines (Sikora, 1978).

L'association individuelle de champignons arbusculaires vésiculaires mycorhiziens entraîne une réduction plus importante de l'incidence de la prolifération des galles des racines que l'association combinée. La diminution de la croissance due à l'infestation par les nématodes est minimale lorsque la bouture est préalablement inoculée avec des champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens. On peut en conclure que l'inoculation du mûrier avec un champignon mycorhizien approprié améliore considérablement la croissance et l'état général de la plante. De plus, la colonisation par les champignons vésiculaires arbusculaires mycorhiziens induit un certain degré de résistance à l'infestation et à la multiplication des nématodes de la galle des racines. Il est donc fortement conseillé d'utiliser des boutures de mûrier mycorhizées dans les plantations, en particulier dans les zones où l'infestation par la galle des racines est endémique. Les boutures de mûrier étant fournies aux sericiculteurs, il est possible d'inoculer les plantules avant de les distribuer. Cette méthode peut être mise en application et est facile à adopter.

COMPARATIVE PERFORMANCE OF MULTIVOLTINE × BIVOLTINE AND BIVOLTINE × MULTIVOLTINE HYBRIDS OF *BOMBYX MORI* L. FOR COMMERCIAL USE IN EASTERN INDIA

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

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

The experiment was designed to compare the quantitative traits of multivoltine × bivoltine (multi × bi) and bivoltine × multivoltine (bi × multi) silkworm hybrids. Five multivoltine breeds, i.e., Nistari, CB5, Raj, G and B, and five bivoltine breeds, i.e., P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉ and KS(O), were selected on the basis of genetic divergence. Thus, a total of twenty-five hybrids each of multivoltine × bivoltine and bivoltine × multivoltine were raised during four commercial seasons of West Bengal, each of which is distinct from the other in environmental conditions. Most of the quantitative traits in multivoltine × bivoltine were observed to be superior to bivoltine × multivoltine hybrids except fecundity and larval period. In the present paper, the merits and demerits of rearing of both types of hybrids were evaluated on the basis of their performance with respect to ten quantitative traits.

Keywords: *Bombyx mori* L. hybrids, multivoltine, bivoltine.

INTRODUCTION

The hybrid vigour of F₁s has long been noted in maize (East and Hayes, 1912), in vegetables (Pearson, 1983) and also in *Bombyx mori* L. (Toyoma, 1906; Hirobe, 1956; Sengupta *et al.*, 1971, 1974; Jolly, 1983; Benchamin *et al.*, 1988; Subba Rao *et al.*, 1989, 1992; Ghosh *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1994) but the commercial utilisation of hybrid silkworms has been realised by the farmers of eastern India in the last decade.

Commercial silkworm rearing in the plains of eastern India, especially West Bengal, is generally carried out with hybrids between different multivoltine races for adverse seasons (May-June and August-September, locally known as 'Jaistha' and 'Bhaduri', respectively) and multi × bivoltine during favourable seasons (October-November and January-February, locally known as 'Agrahayani' and 'Chaitra', respectively). For the Agrahayani commercial crop, farmers do not get the adequate quantity of desired layings because of limited harvest of bivoltine seed cocoons (P₁ seed crop) during September-October. The mulberry leaf yield is maximum during Agrahayani, being a favourable season for the growth of mulberry. It is also favourable for silkworm rearing. It has, however, been observed that, during multi × bivoltine disease-free laying (DFL) preparation at commercial grainage, the counterpart of this combination, i.e., multivoltine males and bivoltine females, is left unused. It is, therefore, felt that a hybrid between a bivoltine female and a multivoltine male can be supplied to the farmers as a substitute of multivoltine hybrids during favourable seasons of the tropics (although the performance was noted to be slightly lower than with multi × bivoltine hybrids).

In view of the above, the present study is an attempt to generate adequate experimental evidence for proper utilisation of bivoltine breeds as female and male combined separately with multivoltine breeds. The merits and demerits of multivoltine × bivoltine and bivoltine × multivoltine hybrids as a

substitute to multivoltine crosses have been evaluated for popularising bi × multi hybrids among the farmers at least during favourable seasons.

MATERIALS AND METHODS

Five multivoltine breeds, i.e., Nistari (N), CB5, Raj, G and B, and five bivoltine breeds, i.e., P5, NB18, JD6, SF19 and KS(O), selected through genetic divergence (D^2 statistics) (Subba Rao *et al.*, 1991; Sen, 1992) were utilised to prepare 25 combinations of each of the multi × bi and bi × multi crosses. These 50 combinations each with three replications (of cellular batches) were reared during four commercial seasons of West Bengal, i.e., October-November (Agrahayani), February-March (Chaitra), May-June (Jaistha) and August-September (Bhaduri). The standard schedule of rearing was followed. Observations were recorded for the number of eggs laid per female (Fecundity), hatching percentage (Hat. %), larval period in days (Lar. Pd.), weight of ten mature larvae (Wt. 10 ML), survival percentage (Surv. %) and yield per 10,000 larvae reared (ERR Wt.) after counting the larvae at third instar, single cocoon weight in grams (SCW), single shell weight in grams (SSW), cocoon shell ratio in percentage (SR %) and filament length in meters (Fil. Lng.). The season-wise performance was presented where the average values of five bivoltine male parents with a specific multivoltine female component were considered as one unit, i.e., mean 1, and the average values of five bivoltine female components with a specific male counterpart were considered as another single unit, i.e., mean 2. The main idea of adopting this procedure was to exhibit a comprehensive study to the multi × bi and bi × multi hybrids (Tables I-IV).

RESULTS AND DISCUSSION

The rearing performance of the two types of combinations, i.e., multi × bi and bi × multi, reared during the four commercial seasons are presented in Tables I to IV. The season-wise comparative performance of the two types of crosses are described below.

October-November (Agrahayani):

No remarkable difference was observed among the two categories of hybrids in respect of fecundity and hatching percentage (Table I) although the hatching percentage was found to be slightly reduced in bi × multi hybrids. The larval period was found to be shorter in bi × multi than in multi × bi; Wt. 10 ML, survival percentage and ERR Wt. were higher in multi × bi; the survival percentage was slightly higher in multi × bi except bi × N; SCW and SSW were greater in multi × bi than in bi × multi; bi × N and bi × CB5 showed a higher cocoon shell ratio than their reciprocals, i.e., N × bi and CB5 × Bi. The filament length was observed to be slightly greater in the bi × multi combinations, except in bi × G and bi × B.

February-March (Chaitra):

Table II reveals better fecundity and hatching percentage in bi × multi crosses, except hatching in bi × N (96.27%). The shortest larval period was observed in bi × multi, Wt. 10 ML, survival percentage and ERR Wt. were greater in multi × bi hybrids. Cocoon characters were also high in the same hybrids except SCW in bi × G and SR % in bi × B. A high filament length was also observed in multi × bi combinations, except bi × Raj.

May-June (Jaistha):

Fecundity and hatching percentage were found to be significantly high ($P \leq 0.05$) in bi × multi, except bi × Raj for the hatching percentage. During this season also, a shorter larval period was observed in bi × multi. Other parameters like Wt. 10 ML, survival percentage, ERR Wt., single cocoon weight, single shell weight, cocoon shell ratio and filament length were observed to be better in multi × bi, except the filament length in Raj × bi and B × bi (Table III).

Table 1. Comparative performances of multi × bi and bi × multi hybrids. Season: Agrahayani (October-November).

Tableau 1. Performances comparées des hybrides polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins. Saison : Agrahayani (octobre à novembre).

	Fecund.	Hatch. %	Lar. Pd.	Wt. 10 ML	Surv. %	ERR Wt.	SCW	SSW	SR %	Fil. Lng.	Combination
Mean 1 / Moyenne 1	445	92.27*	22.050	35.333*	83.82	13035*	1.516*	0.252*	16.58	688.467	N × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	447	90.05	19.733*	27.167	89.45*	11156	1.349	0.227	16.74	701.933*	Bi × N
Mean 1 / Moyenne 1	418	90.67*	22.150	36.133*	90.22*	14257*	1.576*	0.280*	17.67	746.067	CB ₅ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	453*	86.18	20.300*	30.167	86.74	11608	1.399	0.255	18.15*	817.333*	Bi × CB ₅
Mean 1 / Moyenne 1	411	88.72*	22.250	36.000*	89.04*	14295*	1.568*	0.298*	19.14*	777.733	RAJ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	407	82.60	20.233*	30.400	81.84	10645	1.394	0.255	18.07	804.667*	Bi × RAJ
Mean 1 / Moyenne 1	427*	88.72	22.083	41.233*	85.60*	13822*	1.647*	0.295*	17.84*	767.333*	Bi × G
Mean 2 / Moyenne 2	398	92.04*	20.800*	29.600	83.58	11296	1.471	0.265	17.67	723.000	Bi × G
Mean 1 / Moyenne 1	435	88.10*	22.200	36.500*	85.69*	13251*	1.630*	0.298	18.27*	746.533*	B × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	438	84.25	20.517*	28.500	84.15	11389	1.382	0.248	17.84	701.133	Bi × B

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

N: Nistari. Bi: bivoltine breeds, i.e., P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, and KS(O). Fecund.: fecundity. Hatch. %: hatching percentage. Lar. Pd.: Larval period in days. Wt. 10 ML: weight of 10 mature larvae. Surv. %: survival percentage. ERR Wt.: yield/10,000 larvae by weight (g cocoons). SCW: single cocoon weight. SSW: single shell weight. SR %: cocoon shell ratio percentage. Fil. Lng.: Filament length in meters.

N: Nistari. Bi: souches bivoltines: P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, et KS(O). Fecund.: fécondité. Hatch. %: pourcentage d'éclosion. Lar. Pd.: Durée larvaire en jours. Wt. 10 ML: poids de 10 larves matures. Surv. %: pourcentage de survie. ERR Wt.: rendement en poids pour 10 000 larves (g cocons). SCW: poids du cocon. SSW: poids de la coque. SR %: richesse soyeuse. Fil. Lng.: longueur de la bave en mètres.

Table II. Comparative performances of multi × bi and bi × multi hybrids. Season: Chaitra (February-March).

Tableau II. Performances comparées des hybrides polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins. Saison : Chaitra (février à mars).

	Fecund.	Hatch. %	Lar. Pd.	Wt. 10 ML	Surv. %	ERR Wt.	SCW	SSW	SR%	Fil. Lng.	Combination
Mean 1 / Moyenne 1	424	96.57	26.467	39.407*	95.82*	15824*	1.619*	0.311*	19.19*	844.800*	N × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	581*	96.27	24.533*	33.160	93.04	13711	1.484	0.263	17.84	792.600	Bi × N
Mean 1 / Moyenne 1	318	83.07	26.200	38.867*	94.96*	15133*	1.596*	0.319*	19.97*	978.933*	CB ₅ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	548*	94.41*	25.133*	36.720	91.50	13733	1.503	0.288	19.17	957.067	Bi × CB ₅
Mean 1 / Moyenne 1	423	93.49	26.600	39.100*	95.31*	15364*	1.614*	0.318*	19.69	897.067	RAJ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	558*	95.65*	24.867*	36.033	92.87	13818	1.492	0.291	19.84	928.333*	Bi × RAJ
Mean 1 / Moyenne 1	377	92.63	26.333	45.080*	96.93*	15298*	1.580	0.313*	19.70*	857.200*	G × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	580*	96.66*	25.533*	40.180	94.56	15169	1.603*	0.307	19.10	837.600	Bi × G
Mean 1 / Moyenne 1	361	92.03	26.467	41.153*	96.91*	15305*	1.578*	0.297	18.83	856.667	B × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	596*	96.13*	25.067*	35.400	93.62	14116	1.508	0.293	19.43*	846.800	Bi × B

* Significant at the 5% level / *Significatif au seuil de 5 %.*N: Nistari. Bi: bivoltine breeds, i.e., P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, and KS(O). Fecund.: fecundity. Hatch. %: hatching percentage. Lar. Pd.: Larval period in days. Wt. 10 ML: weight of 10 mature larvae. Surv. %: survival percentage. ERR Wt.: yield/10,000 larvae by weight (g cocoons). SCW: single cocoon weight. SSW: single shell weight. SR %: cocoon shell ratio percentage. Fil. Lng.: Filament length in meters.N : Nistari. Bi : souches bivoltines : P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, et KS(O). Fecund. : fécondité. Hatch. % : pourcentage d'éclosion. Lar. Pd. : Durée larvaire en jours. Wt. 10 ML : poids de 10 larves matures. Surv. % : pourcentage de survie. ERR Wt. : rendement en poids pour 10 000 larves (g cocons). SCW : poids du cocon. SSW : poids de la coque. SR % : richesse soyeuse. Fil. Lng. : longueur de la soie en mètres.

August-September (Bhaduri):

Rearing during August-September revealed that (Table IV) most of the characters were better in multi $\times$ bi combinations except in N $\times$ bi and G $\times$ bi. Shorter larval period of bi $\times$ multi was also observed in this season.

In West Bengal, November to March is the most favourable season for any kind of silkworm rearing. The quantitative traits of bivoltine silkworms are superior to those of multivoltine if both are reared in ideal conditions. It is also recorded that multi $\times$ bi are superior to bi $\times$ multi for most of the economic traits.

During January-February and May-June, the fecundity in bi $\times$ multi hybrids was higher than in multi $\times$ bi because the performance of their parents was better (P₁ seed crop) due to the favourable season (December-January and March-April), which, in turn, led to higher fecundity. The seed crops of August-September and October-November were reared during June-July and September-October which were most unfavourable for silkworm rearing; this obviously led to poor fecundity as fecundity is the direct outcome of the female parent. The hatching in multivoltines is observed in natural form, i.e., without a dormant stage, but in bi $\times$ multi hybrids hatching was done through artificial means (the eggs were treated in hydrochloric acid, sp. gr. 1.075 for 5 minutes at 46 °C). Therefore, the hatching is slightly higher in multi $\times$ bi than in bi $\times$ multi crosses. But it was observed that, during January-February and May-June, hatching in bi $\times$ multi was greater than in multi $\times$ bi, which might be the result of some environmental effects. The values of the survival percentage, ERR Wt., SCW, SSW and Fil. Length were lower in bi $\times$ multi because of its shorter larval period; the survival percentage and filament length were almost equal in both types of crosses during favourable seasons due to the favourable environment, which leads to a better expression of economic traits (Falconer, 1981).

From the observations on the larval period, it is well understood that in all rearings under the experiment, the larval duration was less in F₁ hybrid larvae of bi $\times$ multi crosses than in those of multi $\times$ bi crosses, and the difference is more prominent in favourable seasons, which indicates that this trait is sex-linked. When a multivoltine (short larval duration) is used as male component of the cross, the F₁ larvae mature early, whereas in reciprocal when a bivoltine (long larval duration) is used as male, the F₁ larvae mature late. Thus, it leads to conclude that the male component of the cross carrying the maturity gene, i.e., early maturity (Lm^e) in multivoltines and late maturity (Lm) in bivoltines, on the Z chromosome influences the larval duration. In the silkworm, the male is homogametic (ZZ) and the female is heterogametic (ZW) sex, so the female larvae of bi $\times$ multi crosses mature earlier due to the hemizygous expression of the recessive early maturity (Lm^e) gene of the Z chromosome received from the multivoltine male parent (Tazima, 1964); accordingly, female larvae of multi $\times$ bi crosses mature late due to the dominant late maturity (Lm) gene coming from the bivoltine male parent. On the other hand, males of bi $\times$ multi or multi $\times$ bi crosses have the same gene combinations for the traits, i.e., Lm^e/Lm , hence they should be similar in attaining maturity and this is what we observed. In bi $\times$ multi combinations, female larvae mature one day earlier than the male and in multi $\times$ bi combinations female larvae mature one day later than the male. Moreover, the emergence of male and female moths follows the same pattern of larval maturity. Hence, stage-specific X[Z]-chromosome inactivation, as suggested by Murakami (1984), is not tenable with the result of this experiment, which may possibly be due to the different origin of the multivoltine breeds used in the experiment.

In the present experiment, it was observed (Tables III and IV) that the survival percentage in multi $\times$ bi hybrids was higher than in bi $\times$ multi hybrids, particularly in unfavourable seasons (high temperature and high humidity). It indicates that resistance against unfavourable conditions is greater in multi $\times$ bi hybrids than in the reciprocal. Thus, this finding differs from that of He and Oshiki (1984) who pointed out that the resistance was usually greater in the crossing form of bivoltine (female) $\times$ multivoltine (male) strain than in the reverse crossing form. These data are consistent with the findings of Tazima (1988), Benchamin *et al.* (1988) and the findings support the interpretation of Stephanou and Alahiotis (1983) that the survival rate is chiefly determined by cytoplasmic inheritance although

Table III. Comparative performances of multi × bi and bi × multi hybrids. Season: Jaistha (May-June).

Tableau III. Performances comparées des hybrides polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins. Saison : Jaistha (mai à juin).

	Fecund.	Hatch. %	Lar. Pd.	Wt. 10 ML	Surv. %	ERR Wt.	SCW	SSW	SR %	Fil. Lng.	Combination
Mean 1 / Moyenne 1	399	95.11	19.600	34.404*	79.04*	11489*	1.453*	0.242*	16.64	844.467*	N × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	481*	95.18	19.533	31.169	64.64	8618	1.301	0.224	17.30*	805.667	Bi × N
Mean 1 / Moyenne 1	421	95.08	21.000	33.122*	78.20*	12131*	1.506*	0.277*	18.17*	956.600*	CB ₅ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	495*	96.00*	19.933*	32.153	66.07	9333	1.388	0.248	17.83	923.933	Bi × CB ₅
Mean 1 / Moyenne 1	392	92.65*	20.867	35.239*	70.29*	10742*	1.602*	0.301*	18.78*	924.600	RAJ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	436*	96.59	19.733*	31.804	49.64	7117	1.373	0.239	17.43	927.000*	Bi × RAJ
Mean 1 / Moyenne 1	463*	96.57*	21.000	36.355*	61.60*	9296*	1.557	0.281*	18.23*	862.533*	G × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	429	94.10	20.133*	34.421	59.00	9135	1.549	0.269	17.39	812.867	Bi × G
Mean 1 / Moyenne 1	392	91.32	21.000	32.931*	75.35*	11060*	1.472	0.273*	18.37*	847.267	B × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	497*	96.06*	20.000	31.583	57.22	8487	1.446	0.254	17.57	854.600*	Bi × B

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

N: Nistari. Bi: bivoltine breeds, i.e., P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, and KS(O). Fecund.: fecundity. Hatch. %: hatching percentage. Lar. Pd.: Larval period in days. Wt. 10 ML: weight of 10 mature larvae. Surv. %: survival percentage. ERR Wt.: yield/10,000 larvae by weight (g cocoons). SCW: single cocoon weight. SSW: single shell weight. SR %: cocoon shell ratio percentage. Fil. Lng.: Filament length in meters.N: Nistari. Bi: souches bivoltines: P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, et KS(O). Fecund.: fécondité. Hatch. %: pourcentage d'éclosion. Lar. Pd.: Durée larvaire en jours. Wt. 10 ML: poids de 10 larves matures. Surv. %: pourcentage de survie. ERR Wt.: rendement en poids pour 10 000 larves (g cocoons). SCW: poids du cocon. SSW: poids de la coque. SR %: richesse soyeuse. Fil. Lng.: longueur de la bave en mètres.

Table IV. Comparative performances of multi × bi and bi × multi hybrids. Season: Bhaduri (August-September).

Tableau IV. Performances comparées des hybrides polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins. Saison : Bhaduri (août à septembre).

	Fecund.	Hatch. %	Lar. Pd.	Wt. 10 ML	Surv. %	ERR Wt.	SCW	SSW	SR%	Fil. Lng.	Combination
Mean 1 / Moyenne 1	395*	95.26*	18.200	37.048*	81.56*	12731*	1.530*	0.250*	16.29	660.400*	N × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	357	87.84	18.067	31.680	69.95	8331	1.339	0.220	16.47	627.400	Bi × N
Mean 1 / Moyenne 1	434*	97.03*	19.533	37.391*	66.45*	10960*	1.658*	0.314*	18.95*	868.200*	CB ₅ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	331	83.43	18.533*	32.517	58.36	8459	1.434	0.256	17.84	776.467	Bi × CB ₅
Mean 1 / Moyenne 1	403*	95.17*	19.200	35.797*	59.62*	9558*	1.563*	0.272*	17.33*	823.333*	RAJ × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	350	84.68	18.133*	33.145	49.55	7062	1.384	0.226	16.27	729.800	Bi × RAJ
Mean 1 / Moyenne 1	423*	92.35*	19.800	37.209*	66.69*	10342*	1.554*	0.269	17.34	807.267*	G × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	370	83.20	18.933*	34.026	45.29	6767	1.471	0.259	17.62*	757.667	Bi × G
Mean 1 / Moyenne 1	415*	90.88*	19.933	36.589*	67.47*	11018*	1.638*	0.298*	18.18*	850.000*	B × Bi
Mean 2 / Moyenne 2	344	85.82	18.133*	31.051	67.38	9217	1.355	0.233	17.15	732.133	Bi × B

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

N: Nistari, Bi: bivoltine breeds, i.e., P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, and KS(O). Fecund.: fecundity. Hatch. %: hatching percentage. Lar. Pd.: Larval period in days. Wt. 10 ML: weight of 10 mature larvae. Surv. %: survival percentage. ERR Wt.: yield/10,000 larvae by weight (g cocoons). SCW: single cocoon weight. SSW: single shell weight. SR %: cocoon shell ratio percentage. Fil. Lng.: Filament length in meters.

N : Nistari, Bi : souches bivoltines : P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉, et KS(O). Fecund. : fécondité. Hatch. % : pourcentage d'éclosion. Lar. Pd. : Durée larvaire en jours. Wt. 10 ML : poids de 10 larves matures. Surv. % : pourcentage de survie. ERR Wt. : rendement en poids pour 10 000 larves (g cocons). SCW : poids du cocon. SSW : poids de la coque. SR % : richesse soyeuse. Fil. Lng. : longueur de la bave en mètres.

it also depends to some extent on the nucleus. Quintana and Prevosti (1990) also reached a conclusion that inheritance of heat resistance may depend in part on the origin of the egg cytoplasm. It therefore appears that the multivoltine and bivoltine lines used in the experiment of He and Oshiki (1984) might have different lineage of cytoplasmic factors responsible for heat resistance. From the data (Tables I, II, III and IV), it is well established that multi $\times$ bi hybrids are better than bi $\times$ multi hybrids in most of the characters studied except the number of eggs per laying (fecundity) and larval period. But, since bi $\times$ multi combinations can be popularised at the field level when there is a scarcity of multi $\times$ bi combinations during the October-November crop due to less production of bivoltine cocoons during the preceding seed crop. Moreover, during the grainage of multi $\times$ bi DFL preparation, equal numbers of bivoltine females and multivoltine males remain unused and wasted when they are not properly utilised for commercial purposes. Again, diapause layings of bi $\times$ multi can be prepared during favourable seasons and can be preserved in cold store for a longer period, which would be of additional advantage for future utilisation during October-November and February-March. This would help in utilising the excess foliage available during favourable seasons, especially October-November (Agrahayani). The low cocoon yield of bi $\times$ multi combinations can be compensated to some extent by less consumption of mulberry leaves due to their shorter larval period.

Further, the lower yield of bi $\times$ multi can also be compensated by better fecundity of bi $\times$ multi hybrids.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the reviewers of the paper for their valuable critical comments.

REFERENCES

- BENCHAMIN K.V., JOLLY M.S., BENJAMIN D.A.I. (1988) Studies on the reciprocal crosses of multivoltine and bivoltine breeds in silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the use of bivoltine hybrid as a parent. Indian J. Seric., 27(1), 27-34.
- DAS S.K., PATTNAIK S., GHOSH B., NAIR B.P., SEN S.K., SUBBA RAO G. (1994) Heterosis analysis in some three-way crosses of *Bombyx mori* L. Sericologia, 34(1), 51-61.
- EAST E.M., HAYES H.K. (1912) Heterozygosis evolution and plant breeding. USAA Bur Plant. Ind. Bull., 243, 1-58. In The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. R.H. Moll, J.H. Lonquist, J. Velez Fortuno and E.C. Johnson (1965), Genetics, 52, 139-144.
- FALCONER D.S. (1981) Introduction to Quantitative Genetics. Longman, London.
- GHOSH B., DAS S.K., RAO P.R.T., SEN S.K., SINHA S.S. (1993) Heterosis effect on multivoltine silkworm hybrids, *Bombyx mori* L., suitable to tropics of eastern India. Environ. and Eco., 11(3), 548-552.
- HE Y., OSHIKI T. (1984) Study on crossbreeding of a robust silkworm race in a low latitude area in China. J. Sericult. Sci. Japan, 54(4), 320-324.
- HIROBE T. (1956) An analysis of heterosis made with the silkworm. Proc. Internat. Genet. Symp., Suppl. Vol., Cytologia, 357-361.
- JOLLY M.S. (1983) Silkworm genetics and breeding. Lead Paper. National Seminar on Seric. Research and Development. Session III, 10-13.
- MURAKAMI A. (1994) Growth phenomena in *Bombyx mori* L. with a special reference to genetic factors responsible for growth acceleration and moulting. Indian J. Seric., 33, 12-14.
- PEARSON O.H. (1983) Heterosis in vegetable crops. In Heterosis: Reappraisal of Theory and Practice. R. Frankel ed., pp. 138-178.
- QUINTANA A., PREVOSTI A. (1990) Genetic and environment factors in the resistance of *Drosophila subobscura* adults to high temperature shock. 2. Modification of heat resistance by indirect selection. Theor. Appl. Genet., 80, 847-851.
- SENGUPTA K., DATTA R.K., BISWAS S.N., SINGH B.D. (1971) Heterosis in multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Yield performance of F₁ hybrids of Nistari and four evolved multivoltine breeds. Indian J. Seric., 10, 6-13.

- SENGUPTA K., YUSUF M.R., GROVER S.P. (1974) Hybrid vigour and genetic analysis of quantitative traits in silkworm. Indian J. Genet., SABRAO, 34(A), 249-256.
- STEPHANOU G., ALAHOTIS S.N. (1983) Non-Mendelian inheritance of 'heat sensitivity' in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 103, 93-107.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., GHOSH B. (1989) Heterosis effect on some new silkworm hybrids evolved by three-way cross. Perspective in Cytology and Genetics, 6, 373-378.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., DAS N.K. (1991) Genetic divergence among 15 multivoltine genetic stock of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 30(1), 72-74.
- SUBBA RAO G., SEN S.K., GHOSH B., DAS S.K. (1992) Heterosis in some hybrids of indigenous and bivoltine races of mulberry silkworm. Perspective in Cytology and Genetics, 8, 1043-1054.
- SEN S.K. (1992) On some aspects of improvement of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis, Dept. of Zoology, University of Ranchi, India.
- TAZIMA T. (1964) The Genetics of the Silkworm. Logos Press, Ltd., Great Britain, p. 119.
- TAZIMA T. (1988) A view on the improvement of Mysore breeds. Proc. Intern. Cong. Trop. Seric., Bangalore, IV, 1-5.
- TOYOMA K. (1906) Studies on hybridology of insects in some silkworm crosses with special reference to Mendel's law of heredity. Bull. Coll. Agric., Tokyo Univ., 7, 259-293.

PERFORMANCE COMPARATIVE D'HYBRIDES POLYVOLTINS × BIVOLTINS ET D'HYBRIDES BIVOLTINS × POLYVOLTINS DE *BOMBYX MORI* DESTINES A L'EXPLOITATION COMMERCIALE DANS L'EST DE L'INDE

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

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

Cette expérience a été réalisée afin de comparer les caractères quantitatifs d'hybrides de vers à soie polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins. Cinq races polyvoltines, à savoir Nistari, CB5, Raj, G et B, et cinq races bivoltines, à savoir P5, NB18, JD6, SF19 et KS(O) ont été sélectionnées sur la base de la divergence génétique, soit au total vingt-cinq hybrides polyvoltins × bivoltins et vingt-cinq hybrides bivoltins × polyvoltins. Ces hybrides ont été élevés au cours des quatre saisons d'élevage commercial du Bengale occidental, dont chacune présente des conditions environnementales distinctes des autres. La plupart des caractères quantitatifs des hybrides polyvoltins × bivoltins sont supérieurs à ceux des hybrides bivoltins × polyvoltins, à l'exception de la fécondité et de la durée larvaire. Cet article présente une évaluation des avantages et des inconvénients de l'élevage des deux types d'hybrides en fonction de leur performance pour dix caractères quantitatifs.

INTRODUCTION

La vigueur hybride des F₁ est connue depuis longtemps chez le maïs (East et Hayes, 1912), les légumes (Pearson, 1983) et *Bombyx mori* L. (Toyama, 1906 ; Hirobe, 1956 ; Sengupta et coll., 1971, 1974 ; Jolly, 1983 ; Benchamin et coll., 1988 ; Subba Rao et coll., 1989, 1992 ; Ghosh et coll., 1993 ; Das et coll., 1994). Cependant, l'utilisation commerciale des vers à soie hybrides par les fermiers de l'Inde orientale ne remonte qu'à une décennie.

L'élevage commercial du ver à soie dans les plaines de l'est de l'Inde, en particulier le Bengale occidental, repose généralement sur des hybrides entre différentes races polyvoltines lors des saisons défavorables (mai-juin et août-septembre, appelées respectivement Jaistha et Bhaduri en Inde) et sur des hybrides polyvoltins × bivoltins pendant les saisons favorables (octobre-novembre et janvier-février, respectivement Agrahayani et Chaitra). Pour la saison commerciale d'Agrahayani, les fermiers ne reçoivent pas une quantité suffisante de pontes car la production de cocons bivoltins destinés au grainage (récolte P₁) est limitée à la période de septembre-octobre. Le rendement en feuilles est maximal pendant la saison Agrahayani, qui est la saison favorable pour la croissance du mûrier. On a toutefois observé que, lors de la préparation des pontes polyvoltines × bivoltines dans les centres de grainage, les croisements réciproques de cette combinaison, c'est-à-dire mâles polyvoltins et femelles bivoltines, ne sont pas utilisés. Il semble donc logique de fournir des hybrides entre femelles bivoltines et mâles polyvoltins en remplacement des hybrides polyvoltins pendant les saisons tropicales favorables (même si leur performance est légèrement inférieure à celle des hybrides polyvoltins × bivoltins).

Compte tenu de ces remarques, cette étude a été réalisée afin de recueillir des données expérimentales fiables permettant de définir les combinaisons appropriées entre souches bivoltines comme parent mâle ou parent femelle et souches polyvoltines. Les avantages et les inconvénients des

croisements polyvoltins $\times$ bivoltins et bivoltins $\times$ polyvoltins ont été évalués afin de promouvoir l'utilisation des hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins comme alternative aux hybrides polyvoltins chez les fermiers, du moins pendant les saisons favorables.

MATERIELS ET METHODES

Cinq races polyvoltines, soit Nistari (N), CB₅, Raj, G et B, et cinq races bivoltines, à savoir P₅, NB₁₈, JD₆, SF₁₉ et KS(O), sélectionnées par étude de la divergence génétique (statistiques D²) (Subba Rao et coll., 1991 ; Sen, 1992) ont été utilisées pour préparer 25 combinaisons des croisements polyvoltins $\times$ bivoltins et 25 combinaisons de croisements bivoltins $\times$ polyvoltins. Ces 50 combinaisons, comportant chacune 3 répétitions (en lots cellulaires), ont été élevées sur les quatre saisons d'élevage commercial du Bengale occidental : octobre-novembre (Agrahayani), février-mars (Chaitra), mai-juin (Jaistha) et août-septembre (Bhaduri). On a suivi le planning d'élevage standard. Les observations portent sur le nombre d'oeufs pondus par femelle (fécondité), le pourcentage d'éclosion, la durée larvaire en jours, le poids de 10 larves matures, le taux de survie (%), le rendement en poids pour 10 000 larves (après comptage des larves au troisième âge), le poids du cocon (en grammes), le poids de la coque (en grammes), la richesse soyeuse (en pourcentage) et la longueur de la bave (en mètres). Les performances saisonnières sont exprimées en considérant comme première unité les valeurs moyennes de 5 parents mâles bivoltins combinés avec une femelle polyvoltine spécifique (moyenne 1) et comme deuxième unité les valeurs moyennes de cinq femelles bivoltines combinées avec un parent mâle polyvoltin (moyenne 2). Le but de cette méthode est d'obtenir des résultats complets sur les combinaisons hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins et hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins (Tableaux I à IV).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'élevage des deux types d'hybrides (polyvoltins $\times$ bivoltins et bivoltins $\times$ polyvoltins) élevés sur les quatre saisons d'élevage commercial sont présentés dans les tableaux I à IV. Les performances saisonnières comparatives des deux types de croisements sont présentées ci-après.

Octobre-novembre (Agrahayani) :

On n'observe aucune différence sensible entre les deux catégories d'hybrides pour ce qui concerne la fécondité et le pourcentage d'éclosion (Tableau I), bien que le pourcentage d'éclosion soit légèrement inférieur chez les hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins. La durée larvaire est plus courte chez les hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins que chez les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins. Le poids de 10 larves matures, le taux de survie et le rendement pour 10 000 larves sont plus élevés chez les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins. Le taux de survie est légèrement supérieur chez les polyvoltins $\times$ bivoltins, à l'exception du croisement bivoltin $\times$ N. Le poids du cocon et le poids de la coque sont plus lourds chez les polyvoltins $\times$ bivoltins que chez les bivoltins $\times$ polyvoltins. Les croisements bivoltins $\times$ N et bivoltins $\times$ CB₅ ont une richesse soyeuse plus élevée que leurs croisements réciproques (N $\times$ bivoltins et CB₅ $\times$ bivoltins). La longueur de la bave est légèrement plus élevée chez les combinaisons bivoltins $\times$ polyvoltins, sauf les croisements bivoltins $\times$ G et bivoltins $\times$ B.

Février-mars (Chaitra) :

Les données du tableau II révèlent que la fécondité et le taux d'éclosion sont plus élevés chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins, hormis le taux d'éclosion chez les croisements bivoltins $\times$ N (96,27 %). On observe une durée larvaire plus courte chez les bivoltins $\times$ polyvoltins. Le poids de 10 larves matures, le taux de survie et le rendement pour 10 000 larves sont plus élevés chez les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins. Les caractères du cocon sont également élevés chez ces hybrides, sauf le poids du cocon chez les croisements bivoltins $\times$ G et la richesse soyeuse chez les croisements bivoltins $\times$ B. La longueur de la bave est également plus importante chez les combinaisons polyvoltins $\times$ bivoltins, sauf le croisement bivoltin $\times$ Raj.

Mai-juin (Jaistha) :

La fécondité et le taux d'éclosion sont nettement plus élevés ($P \leq 0.05$) chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins, sauf chez le croisement bivoltin $\times$ Raj pour ce qui concerne le taux d'éclosion. Au cours de cette saison, on observe également une durée larvaire plus courte chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins. Les autres paramètres comme le poids de 10 larves matures, le taux de survie, le rendement pour 10 000 larves, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur de la bave sont plus élevés chez les croisements polyvoltins $\times$ bivoltins, à l'exception de la longueur de la bave chez les croisements Raj $\times$ bivoltins et B $\times$ bivoltins (Tableau III).

Août-septembre :

Les données obtenues pour l'élevage d'août-septembre (Tableau IV) montrent que la plupart des caractères sont supérieurs chez les combinaisons polyvoltins $\times$ bivoltins, sauf N $\times$ bivoltins et G $\times$ bivoltins. On observe une durée larvaire plus courte chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins pendant cette saison.

Dans le Bengale occidental, la période allant de novembre à mars est l'époque d'élevage la plus favorable, quel que soit le type de ver à soie utilisé. Les caractères quantitatifs des bivoltins sont supérieurs à ceux des polyvoltins lorsque les deux types de vers à soie sont élevés dans des conditions idéales. Les croisements polyvoltins $\times$ bivoltins sont supérieurs aux croisements bivoltins $\times$ polyvoltins pour la plupart des caractères économiques.

Au cours des saisons d'élevage janvier-février et mai-juin, la fécondité est plus élevée chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins que chez leurs réciproques car la performance des parents (récolte des graines P_1) est elle-même supérieure car ils sont élevés à une saison favorable (décembre-janvier et mars-avril), permettant une meilleure fécondité. Les graines produites en août-septembre et octobre-novembre sont élevées en juin-juillet et en septembre-octobre, qui sont les saisons les moins propices à l'élevage du ver à soie; ce qui se traduit par une fécondité médiocre, la fécondité étant le résultat direct du parent femelle. Le taux d'éclosion chez les polyvoltins a été observé par des méthodes naturelles, c'est-à-dire sans stade de dormance; tandis que, chez les bivoltins, l'éclosion a été provoquée par des méthodes artificielles (œufs traités dans l'acide chlorhydrique, gravité spécifique 1,075, pendant 5 minutes à 46 °C). L'éclosion est donc logiquement légèrement plus élevée chez les croisements polyvoltins $\times$ bivoltins que chez les réciproques. Cependant, au cours des saisons janvier-février et mai-juin le taux d'éclosion est supérieur chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins, ce qui pourrait être dû à des effets environnementaux. Les valeurs du taux de survie, du rendement pour 10 000 larves, du poids du cocon, du poids de la coque et de la longueur de la bave sont plus faibles chez les croisements bivoltins $\times$ polyvoltins car leur durée larvaire est plus courte. Le taux de survie et la longueur de la bave sont pratiquement identiques chez les deux types de croisement au cours des saisons favorables en raison des conditions environnementales propices, ce qui entraîne une meilleure expression des caractères économiques (Falconer, 1981).

Les observations concernant la durée larvaire permettent de démontrer que, pour toutes les saisons d'élevage considérées dans cette étude, la durée larvaire est plus courte chez les larves hybrides F_1 des croisements bivoltins $\times$ polyvoltins que chez celles des croisements réciproques et que cette différence est plus marquée lors des saisons favorables; ceci indique que ce trait est lié au sexe. Lorsqu'un polyvoltin (durée larvaire courte) est utilisé comme composant mâle du croisement, les larves F_1 arrivent à maturité rapidement; chez les réciproques, lorsqu'un bivoltin (durée larvaire longue) est utilisé comme composant mâle, les larves F_1 arrivent à maturité tardivement. Ceci nous conduit à penser que le composant mâle du croisement portant le gène de la maturité, c'est-à-dire maturité précoce (Lm^e) chez les polyvoltins et maturité tardive (Lm) chez les bivoltins, sur le chromosome Z influence la durée larvaire. Chez le ver à soie, le mâle est homogamétique (ZZ) et la femelle hétérogamétique (ZW), aussi les larves femelles des croisements bivoltins $\times$ polyvoltins arrivent-elles à maturité plus tôt en raison de l'expression hémizygote du gène de la maturité précoce (Lm^e) récessif du chromosome transmis par le parent polyvoltin mâle (Tazima, 1964). De même, les larves femelles des croisements polyvoltins $\times$ bivoltins arrivent à maturité tardivement car le gène de maturité tardive (Lm) transmis par le parent mâle bivoltin est dominant. Par ailleurs, les mâles des

croisements bivoltins $\times$ polyvoltins ou polyvoltins $\times$ bivoltins ont les mêmes combinaisons géniques pour les caractères, c'est-à-dire Lm^e/Lm , aussi doivent-ils arriver à maturité au même moment ; c'est ce que nous avons observé dans cette étude. Chez les combinaisons bivoltins $\times$ polyvoltins, les larves femelles arrivent à maturité un jour plus tôt que les larves mâles et, dans les croisements polyvoltins $\times$ bivoltins, les larves femelles arrivent à maturité un jour plus tard que les larves mâles. De plus, l'émergence des papillons mâles et femelles suit le même modèle que la maturité larvaire. Aussi, l'inactivation du chromosome X[Z] à un stade spécifique, suggérée par Murakami (1994), n'est pas conforme aux résultats obtenus ici ; ceci pourrait être dû à la différence d'origine des races polyvoltines utilisées.

Dans l'expérience présentée ici, on a observé (Tableaux III et IV) que le taux de survie est plus élevé chez les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins que chez les hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins, particulièrement en saisons défavorables (température et humidité élevées). Ceci indique que la résistance aux conditions défavorables est plus forte chez les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins que chez les croisements réciproques. Nos résultats diffèrent donc de ceux obtenus par He et Oshiki (1984) qui ont observé que la résistance est généralement plus élevée chez les croisements bivoltins (femelles) $\times$ polyvoltins (mâles) que chez les croisements inverses. Nos données corroborent les résultats de Tazima (1988), Benchamin et coll. (1988) et confirment l'hypothèse de Stephanou et Alahiotis (1983) selon laquelle le taux de survie est principalement déterminé par transmission héréditaire du cytoplasme et dépend également, dans une certaine mesure, du noyau. Quintana et Prevosti (1980) sont également arrivés à la conclusion que la transmission héréditaire de la résistance à la chaleur peut dépendre en partie de l'origine du cytoplasme de l'oeuf. Il semble donc que les lignées polyvoltines et bivoltines utilisées dans l'expérience de He et Oshiki (1984) soient issues de lignages différents de facteurs cytoplasmiques responsables de la résistance à la chaleur. Nos données (Tableaux I, II, III et IV) montrent clairement que les hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins sont supérieurs aux hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins pour la plupart des caractères étudiés, sauf le nombre d'oeufs pondus (fécondité) et la durée larvaire. Cependant, les combinaisons bivoltins $\times$ polyvoltins présentant des différences minimes pendant les saisons favorables (octobre-novembre et février-mars), leur utilisation peut être conseillée chez les fermiers lorsque les combinaisons polyvoltins $\times$ bivoltins deviennent insuffisantes au cours de la saison d'élevage d'octobre-novembre en raison de la baisse de production de cocons bivoltins à la saison précédente. De plus, pendant les opérations de grainage des polyvoltins $\times$ bivoltins, des quantités égales de femelles bivoltines et de mâles polyvoltins sont inutilisées et, donc, perdues si elles ne sont pas utilisées à des fins commerciales. En outre, les pontes diapausantes des bivoltins $\times$ polyvoltins peuvent également être préparées pendant la saison favorable et conservées au froid sur une période plus longue, ce qui présente l'avantage d'une utilisation différée aux périodes d'octobre-novembre et de février-mars. Ceci permettrait d'utiliser le feuillage excédentaire disponible pendant les saisons favorables, en particulier octobre-novembre (Agrahayani). Le rendement en cocons médiocre des hybrides bivoltins $\times$ polyvoltins peut être compensé, jusqu'à un certain point, par une diminution de la consommation de feuilles de mûrier, leur période larvaire étant plus courte.

Le faible rendement des bivoltins $\times$ polyvoltins peut également être compensé par leur fécondité, qui est supérieure.

OVIPOSITION IN THE MUGA SILKMOTH, *ANTHRAEA ASSAMA* WESTWOOD (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)

A.K. SAHU, G. RAJKHOWA, P.K. DAS & U.P. GRIYAGHEY

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko 781 123, Kamrup, Assam, India.

The rate of oviposition in the muga silkworm, *Antheraea assama* Ww., was studied during May, June and August 1992; May, June, July, October and December 1993 and January and May 1994 under different treatments. The average realized fecundity was maximum, i.e., 171.11 in wing-cut moths tied to fresh twigs of Som and kept in a dark room, followed by 163.53 in wing-cut moths tied to fresh twigs of Som and kept in a normal room, 131 in wing-cut moths kept in earthen cups, 126.12 in wing-cut moths kept in plastic cups as compared to 139.58 in the control (moths with intact wings allowed to oviposit on dry twigs). The oviposition index (realized fecundity divided by potential fecundity) was highest, i.e., 0.81 in wing-cut moths allowed to oviposit on fresh Som twigs irrespective of whether they were placed in a dark or normal room as compared to 0.71 in the control. The gain in the rate of oviposition was 10% in the first two cases whereas moths placed in closed containers exhibited a loss over the control. The preference of moths for a higher oviposition rate on fresh twigs of Som, *Machilus bombycina* King, one of its primary host plants, is discussed.

Keywords: *Antheraea assama* Ww., oviposition, realized fecundity, potential fecundity, oviposition index.

INTRODUCTION

The muga silkworm, *Antheraea assama* Ww., is being reared by the people of the north-eastern region and especially those of Assam since a very long time for production of the lustrous golden yellow silk. This sericigenous insect with $n = 15$ number of chromosomes has a very restricted distribution in the Brahmaputra Valley and some parts of Nagaland, Meghalaya and Mizoram. The continued existence of this species in the region implies that it is very specific in its oviposition habit.

The muga silkworm is polyphagous and feeds on a number of food plants, among which Som, *Machilus bombycina* King, and Soalu, *Litsaea polyantha* Juss, are the primary ones. Ample literature is available on the oviposition preference of different lepidopteran insects (Hosny and Kotby, 1960; Haynes and Butcher, 1962; Wilson, 1963; Bulyginskaya and Bryantseva, 1969; Deser, 1976; Honda and Matsumoto, 1984; Robertson, 1987; Hussain *et al.*, 1988; and several others). Studies on the correlation between diet and pupal weight and fecundity of various lepidopteran insects have been carried out by various workers (Kansu, 1962; Marker, 1964; Boreyko, 1972; Hough and Pimental, 1978; Barbosa and Greenblatt, 1979; Massodi and Srivastava, 1985; Igbinsosa, 1986). With particular reference to Saturniids, studies on the correlation between pupal size and egg production have been carried out by Singh and Bordaiyar (1982) in *Antheraea proylei*, Millar *et al.* (1982) in *Antheraea polyphemus*, Singh and Prasad (1987) and Kotikal *et al.* (1987) in *Philosamia ricini* Hutt. and Barah and Sengupta (1991) in *Antheraea assama* Ww. A study on an improved egg-laying device in *Antheraea mylitta* Drury was carried out by Sinha *et al.* (1992). Scanty information is available on the egg-laying behaviour of non-mulberry silkworms (Dash and Nayak, 1991; Dubey *et al.*, 1993). It is thus apparent that no attention has been paid to study the preference (if any) of the muga silkworm for a particular oviposition site. Under the traditional method of egg production, which is still in vogue, the moths are allowed to oviposit on 'Kharika' made up of dry thatch and also on twigs of different trees. It has been observed that, under such practices, there is a wide variation in the rate of oviposition

and large numbers of eggs are retained in the abdomen of the moth. Moreover, considerable numbers of eggs are wasted while handling the twigs/kharikas for removing the eggs.

Due primarily to the paucity of literature on the oviposition of the muga silkworm, questions such as whether the oviposition phenomenon is host-specific or controlled by photoperiod or other biotic as well as abiotic factors remain to be answered. As such, the reasons for the present conditions of low fecundity, less fertility and the large span of oviposition in the muga silkworm are not known.

Under the above circumstances, the present study was undertaken to determine whether or not the semi-domesticated muga moth also, as its wild counterpart which invariably oviposits on its host plants, has any preference for oviposition.

MATERIALS AND METHODS

Cocoons for the present experiment were obtained from the stock maintained at the Seed Technology Section, Regional Muga Research Station, Assam. Female pupae weighing 6.0-6.5 g were considered. After emergence, the females were allowed to copulate for 8-10 hours and then naturally decoupled females were utilized for oviposition up to 3 days under different treatments. The study was conducted during 9 seasons, i.e., May, June and August 1992; May, June, July, October and December 1993 and January 1994 under four treatments, namely, T-1: wing-cut moths tied to fresh Som twigs and allowed to oviposit in a dark room; T-2: wing-cut moths tied to fresh Som twigs allowed to oviposit in normal room conditions; T-3: wing-cut moths placed in earthen cups and T-4: wing-cut moths placed in plastic boxes. The data were compared with those of the control (normal moths tied to dry twigs and placed under normal grainage conditions). Each treatment was replicated three times each with 10 moths. Eggs retained in the abdomen were counted by dissecting each female moth. The oviposition index was calculated by dividing the realized fecundity by the potential fecundity.

RESULTS AND DISCUSSION

Perusal of the data in Table I reveals that the maximum realized fecundity was recorded in T-1 with 171.11 eggs per disease-free laying, followed by 163.53 in T-2, 131 in T-3, 126.12 in T-4 as compared to 139.58 in the control. T-1 and T-2 were at par but significantly superior to the rest. There was no significant difference among T-3, T-4 and the control. The oviposition index of 0.81, as recorded in T-1 and T-2, was significantly superior to the rest both at the 5% and 1% levels of significance. Both T-1 and T-2 showed a gain of 10% over the control while 17% over T-3 and 31% over T-4. In other words, T-3 and T-4 recorded a loss of 7% and 21% respectively as compared to the control. It is to be noted that there was no significant difference in the potential fecundity of moths utilized under T-1, T-2, T-3 and control (Table I), whereas the moths under T-4 in spite of their higher potential fecundity showed a significantly lower realized fecundity as compared to T-1 and T-2. Egg retention in T-4 was also significantly higher than the rest of the treatments.

It is evident from the above that the moths that were allowed to oviposit on fresh Som twigs laid a higher number of eggs within the same time period than those allowed to oviposit on dry twigs and closed containers made up of inert substances. This indicates the sensitivity of the moths towards the odour of the host plants as in the case of T-1 and T-2. Working on the oviposition behaviour of *Plodia interpunctella*, the Indian meal moth, Deser (1976) found that the fecundity of these moths increased by the odour of certain nutrients and that the eggs were laid in batches near the source of the odour. Similar findings were made by Honda and Matsumoto (1984) in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis*. Selection of a suitable site of oviposition by phytophagous insects has been reported to be a critical factor for successful development of the offspring and the behavioural events leading to oviposition are mediated to a large extent by chemical cues associated with potential host plants (Renwick, 1989). It has further been reported that errors made by adult insects in selection of the oviposition site may cause great loss to the population (Dethier, 1959). Hinton in his book 'Biology of Insect Eggs' (first edition, 1981, p. 63) stated that gravid females of most insects make certain specific demands for environment for proper oviposition. The findings of the present study also suggest that the semi-domesticated muga silkworm does have some preference for its potential host plants for oviposition. The data as recorded in T-3 and T-4 suggest that the muga silkworm lays eggs

in closed containers as well, but certainly under compulsion. Some insects retain their eggs for some time, but as they grow older they become less particular and may lay anywhere (Knoll, 1922; Schwarz, 1923). It has also been reported that the odour and/or taste of the plants are of much greater significance

Table I. Oviposition in *Antheraea assama* Ww. under different treatments (average values).

*Tableau I. Oviposition chez *Antheraea assama* Ww. en fonction de différents traitements (valeurs moyennes).*

Treatment	Realized fecundity (eggs/dfl)	Eggs retained (No./moth)	Potential fecundity (No./moth)	Oviposition index	Gain over control (%)
<i>Traitement</i>	<i>Fécondité réelle (œufs/dfl)</i>	<i>Oeufs retenus (Nombre/papillon)</i>	<i>Fécondité potentielle (Nombre/papillon)</i>	<i>Indice d'oviposition</i>	<i>Gain par rapport au témoin (%)</i>
T-1	171.11	39.39	210.10	0.81	+ 10.0
T-2	163.53	37.01	200.45	0.81	+ 10.0
T-3	131.00	69.79	203.94	0.64	- 07.0
T-4	126.12	123.07	249.27	0.50	- 21.0
Control / Témoin	139.58	55.59	195.63	0.71	
CD at 5%	17.24	23.15	15.80	0.04	-
CD at 1%	27.05	36.32	24.79	0.07	-

T-1: wing-cut moths tied to fresh Som twigs and allowed to oviposit in a dark room. **T-2:** wing-cut moths tied to fresh Som twigs allowed to oviposit in normal room conditions. **T-3:** wing-cut moths placed in earthen cups. **T-4:** wing-cut moths placed in plastic boxes. **Control:** normal moths tied to dry twigs and placed under normal grainage conditions.

T-1 : Papillons aux ailes coupées attachés à des branches de Som fraîches et mis à pondre dans l'obscurité. **T-2 :** Papillons aux ailes coupées, attachés à des branches de Som fraîches et mis à pondre dans des conditions normales. **T-3 :** Papillons aux ailes coupées, placés dans des tasses en terre. **T-4 :** Papillons aux ailes coupées, placés dans des boîtes en plastique. **Témoin :** Papillons attachés à des branches sèches et placés dans les conditions normales du grainage.

in triggering the oviposition behaviour than any other factor (Hinton, 1981). As is evident from the present results, this phenomenon of triggering oviposition in the presence of the odour of the host plant in other groups of insects cannot be ruled out in the muga silkworm as well. A detailed biochemical analysis of the volatile attractants present in fresh Som twigs, which induce maximum oviposition in the moth, and a study of correlation with various meteorological parameters are expected to generate new information and thereby open up a new vistas in the muga seed sector.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Member Secretary, Central Silk Board, Bangalore, for providing financial assistance for carrying out the study.

REFERENCES

- BARAH A., SENGUPTA A.K. (1991) Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae), on different food plants. *Acta Physiologica Hungarica*, 78(3), 261-264.
- BARBOSA P., GREENBLATT J. (1979) Suitability, digestibility and assimilation of various host plants by gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Oecologia*, 43(1), 111-119.
- BOREYKO T.A. (1972) Correlation between pupal weight and fecundity in *Laspeyseria pomonella* (Lep.: Tortricidae). *Komhat Sionnya Luvisimost Mezbdv Vesom Kukoloti Jaytsepfudktsiyes* (Lep.: Tortricidae). *Wool. LL*, 51, 920-922.
- BULYGINSKAYA M.A., BRYANTSEVA I.B. (1969) The selective reaction of the adults of malva moths, *Pectinophora malvella* Hb. (Lepidoptera), when ovipositing. *Ent. Obozr.*, 48, 57-60 (in Russian, English translation: *Ent. Rev.*, 48, 30-31).
- DASH A.K., NAYAK B.K. (1991) Studies on some oviposition behaviour of Godamodal ecorace of Indian wild tasar silkworm, *Antheraea paphia* Linn. (Lepidoptera: Saturniidae). In *Wild Silkworm*. International Society for Wild Silkworms, ed. by H. Akai, Y. Kato, M. Kiuchi and Kobayashi, pp. 78-81.
- DESER K.V. (1976) The oviposition of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* HBN (Lepidoptera: Phyticidae), influenced by olfactory stimuli and antennectomy. *Symp. Biol. Hung.*, 16, 61-65.
- DETHIER V.G. (1959) Egg-laying habits of Lepidoptera in relation to available food. *Can. Ent.*, 91, 554-561.
- DUBEY O.P., BAJPEYI C.M., OJHA N.G., THANGAVELU K. (1993) Oviposition — a vital aspect in silkworm rearing. *Indian Silk*, March, 31(11), 29-31.
- HAYNES D.L., BUTCHER J.W. (1962) Studies on host preference and its influence on European pine shoot moth success and development. *Can. Ent.*, 94, 690-706.
- HINTON H.E. (1981) *Biology of Insect Eggs*. Vol. I, pp. 63-71.
- HONDA H., MATSUMOTO Y. (1984) Oviposition responses of the fruit feeding type of yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenee) (Lepidoptera: Pyralidae) to host plant odors. *Japanese J. Appl. Entomol. Zool.*, 28(2), 82-86.
- HOSNY M.M., KOTBY F.A. (1960) Host plants favoured by the cotton leaf worm moth, *Prodenia litura* F., for egg laying and their values as egg mass trap crops (Lepidoptera: Agrotidae-Zenobiinae). *Bull. Soc. Ent. Egypte*, 44, 223-234.
- HOUGH J.A., PIMENTAL D. (1978) Influence of host foliage on development, survival and fecundity of gypsy moth. *Environ. Entomol.*, 7(1), 97-102.
- HUSSAIN T., BHATTI M.A., WAHLA M.A. (1987) Effect of different food plants on mating and oviposition of *Diacrisia obliqua* Walk. *Pak. J. Zool.*, 19(3), 253-256.
- IGBINOSA I.B. (1986) On relationship between fecundity and size of the nettle moth, *Latolia varidissima* Holland (Lepidoptera: Limacodidae). *Rev. Zool. Afr.*, 99(4), 363-369.
- KANSU I. (1962) The effect of food on the larvae of butterflies and moths and experiment on the gypsy moth larvae. (in Turkish) *Ankara Univ. Ziraat Fak., Yamin*, 2, 116-138.
- KNOLL F. (1922) *Insekten und Blumen. Experimentelle Arbeiten zur Vertiefung unserer Kenntnisse über die Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren. III. Lichtsinn und Blumenbesuch der Falter von *Macroglossum stellatarum**. *Abh. Zool.-Bot. Ges., Wien*, 12, 123-377.
- KOTIKAL Y.K., REDDY D.N., PRABHU A.S., BHAT G.B., PUSHPALATA S. (1989) Relationship between pupal size and egg production in eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Indian J. Seric.*, 28(1), 80-82.
- LARSON A.O. (1927) The host selection principle as applied to *Bruchus quadrimaculatus* Feb. *Am. Entomol. Soc. Am.*, 20, 30-39.
- MARKER E. (1964) The effect of food on development of *Lymantria dispar* L. (in German). *Allg. Forest. Jagdztg.*, 135(2), 34-36.
- MASSODI A.A., SRIVASTAVA A.S. (1985) Effect of host plants on pupal weight and fecundity of *Lymantria obfuscata* Walker (Lymantriidae: Lepidoptera). *Indian J. Ent.*, 4(4), 410-412.

- MILLAR 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.
- RENWICK J.A.A. (1989) Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. Experientia, 45(8), 223-228.
- ROBERTSON H.G. (1987) Oviposition site selection in *Cactoblastio castorum* (Lepidoptera) constraints and compromises. Oecologia, 74(4), 601-608.
- SCHWARZ E. (1923) The reason why *Catacola* eggs are occasionally deposited on plants upon which the larvae cannot survive and a new variation (Lepid.: Noctuidae). Ent. News, 34, 272-273.
- SINHA S.S., SENGUPTA K. (1992) Improved egg laying device in *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). Sericologia, 32(3), 499-503.
- SINGH Y.R., BORDAIYAR V.N. (1982) Studies on the ovipositional behaviour and relationship between the body weight and fecundity in *Antheraea proylei*. J. Orient. Zool., 2, 109-110.
- SINGH Y.R., PRASAD B. (1987) Correlation among body weight, pupal weight and fecundity in eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Saturniidae). Sericologia, 27(1), 49-60.
- WILSON F. (1963) Australia as a source of beneficial insects for biological control. Tech. Common. No. 3, Commonwealth Inst. Biol. Control, pp. 1-28.

OVIPOSITION CHEZ LE VER A SOIE MUGA *ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

A.K. SAHU, G. RAJKHOWA, P.K. DAS & U.P. GRIYAGHEY

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko 781 123, Kamrup, Assam, Inde.

On a étudié le taux d'oviposition du ver à soie muga *Antheraea assama* Ww. en mai, juin et août 1992; mai, juin, juillet, octobre et décembre 1993 et janvier et mai 1994 en fonction de différents traitements. Les papillons aux ailes coupées, attachés à des branches fraîches de Som et placés dans l'obscurité donnent la fécondité réelle maximale (171,11), devant les papillons aux ailes coupées, attachés à des branches fraîches de Som et placés dans une pièce normale (163,53), les papillons aux ailes coupées, placés dans des tasses en terre (131), les papillons aux ailes coupées placés dans des boîtes en plastique (126,12) ; le lot témoin (papillons aux ailes intactes, mis à pondre sur des branches sèches) donne un taux d'oviposition de 139,58. L'indice d'oviposition (fécondité réelle divisée par la fécondité potentielle) est maximal (0,81) chez les papillons aux ailes coupées, mis à pondre sur des branches fraîches de Som, que ce soit dans l'obscurité ou dans une pièce normale ; il est de 0,71 chez le lot témoin. L'augmentation du taux d'oviposition est de 10 % dans les deux premiers cas, tandis que les papillons placés dans des récipients fermés donnent un taux d'oviposition inférieur à celui obtenu pour le lot témoin. La préférence d'oviposition, qui se traduit par une augmentation du taux d'oviposition, chez les papillons placés sur des branches fraîches de Som (*Machilus bombycina* King) (l'une des plantes hôtes primaires d'*A. assama*) est discutée dans cet article.

INTRODUCTION

Le ver à soie muga *Antheraea assama* Ww. est élevé dans la région nord-est de l'Inde et, en particulier, dans l'Assam depuis très longtemps pour sa soie jaune d'or lustrée. La distribution de cet insecte séricigène, qui possède 15 chromosomes, est limitée à la vallée du Brahmapoutre et à certaines régions du Nagaland, du Meghalaya et du Mizoram. Le maintien de cette espèce dans ces régions implique qu'elle a un comportement d'oviposition très spécifique.

Le ver à soie muga est polyphage et se nourrit d'un certain nombre de plantes hôtes, dont Som (*Machilus bombycina* King) et Soalu (*Litsaea polyantha* Juss) qui sont les plantes primaires. De nombreuses études ont été réalisées sur la préférence d'oviposition des différents lépidoptères (Hosny et Kotby, 1960 ; Haynes et Butcher, 1962 ; Wilson, 1963 ; Bulyginskaya et Bryantseva, 1969 ; Dcser, 1976 ; Honda et Matsumoto, 1984 ; Robertson, 1987 ; Hussain et coll., 1988, ainsi que plusieurs autres auteurs). Des études sur la corrélation entre l'aliment, le poids nymphal et la fécondité ont été réalisées pour divers lépidoptères (Kansu, 1962 ; Marker, 1964 ; Boreyko, 1972 ; Hough et Pimental, 1978 ; Barbosa et Greenblatt, 1979 ; Massodi et Srivastava, 1985 ; Igbinosa, 1986). Pour ce qui concerne les saturniides, des études sur la corrélation entre la taille nymphale et la production d'oeufs ont été faites par Singh et Bordaiyar (1982) chez *Antheraea proylei*, Millar et coll. (1982) chez *Antheraea polyphemus*, Singh et Prasad (1987) et Kotikal et coll. (1987) chez *Philosamia ricini* Hutt. et Barah et Sengupta (1991) chez *Antheraea assama* Ww. Une méthode de ponte améliorée chez *Antheraea mylitta* a été mise au point par Sinha et coll. (1992). On dispose de peu d'informations sur le comportement de ponte des vers à soie non mûrier (Dash et Nayak, 1991 ; Dubey et coll., 1993). Il apparaît qu'aucune recherche n'a été effectuée sur la préférence éventuelle du ver à soie muga pour un site d'oviposition particulier. Selon les méthodes traditionnelles de grainage, qui sont encore utilisées, les papillons sont mis à pondre sur des « kharikas » faits de chaume et de branches de

différents arbres. Ce type de méthode donne des variations importantes du taux d'oviposition et un grand nombre d'oeufs restent dans l'abdomen du papillon. En outre, de grandes quantités d'oeufs sont gaspillées lors de la collecte des oeufs sur les branches/kharikas.

Principalement en raison du manque d'informations sur le comportement de ponte du ver à soie muga, on ignore, entre autres questions, si le phénomène de ponte est spécifique de l'hôte ou gouverné par la photopériode ou d'autres facteurs biotiques et abiotiques. De ce fait, on ne connaît pas les causes des résultats médiocres obtenus actuellement pour ce qui concerne la fécondité, la fertilité et la durée prolongée de la période d'oviposition.

Cette étude a donc été entreprise pour déterminer si le ver à soie muga semi-domestiqué et la souche correspondante sauvage, qui pond invariablement sur ses plantes hôtes, ont une préférence d'oviposition.

MATERIELS ET METHODES

Les cocons utilisés dans cette expérience proviennent du stock de la Section de Technologie du Grainage, *Regional Muga Research Station* (Boko, Assam, Inde). On a sélectionné des chrysalides femelles pesant de 6,0 à 6,5 g. Après l'éclosion, les femelles ont été accouplées pendant 8 à 10 heures ; après s'être désaccouplées naturellement, elles ont été soumises à différentes expériences d'oviposition pendant 3 jours. L'étude a été réalisée sur 9 périodes, à savoir mai, juin et août 1992, mai, juin, juillet, octobre et décembre 1993 et janvier 1994. Quatre traitements ont été mis en place : T1, papillons aux ailes coupées attachés à des branches fraîches de Som et mis à pondre dans l'obscurité ; T2, papillons aux ailes coupées attachés à des branches fraîches de Som et mis à pondre dans des conditions normales ; T3, papillons aux ailes coupées placés dans des tasses en terres ; T4, papillons aux ailes coupées placés dans des boîtes en plastique. Les données obtenues ont été comparées avec celles obtenues pour le lot témoin (papillons normaux attachés à des branches sèches et placés dans les conditions normales du grainage). Chaque traitement a été répété trois fois avec 10 papillons pour chaque répétition. Les oeufs retenus dans l'abdomen ont été comptés après dissection des femelles. L'indice d'oviposition a été calculé en divisant la fécondité réelle par la fécondité potentielle.

RESULTATS ET DISCUSSION

La lecture des données présentées dans le tableau I révèle que le traitement T1 donne la fécondité réelle maximale (171,11 oeufs par ponte) devant le traitement T2 (163,53), le traitement T3 (131) et le traitement T4 (126,12) tandis que le témoin donne 139,58 oeufs. Les traitements T1 et T2 donnent des résultats comparables mais nettement supérieurs à ceux obtenus pour les autres traitements. Il n'y a pas de différence significative entre le traitement T3, le traitement T4 et le témoin. L'indice d'oviposition enregistré chez les traitements T1 et T2 (0,81) est supérieur à celui enregistré chez les autres traitements, quel que soit le seuil de signification (5 % et 1 %). Les traitements T1 et T2 donnent une augmentation de 10 % par rapport au témoin, de 17 % par rapport au traitement T3 et de 31 % par rapport au traitement T4. En d'autres termes, les traitements T3 et T4 donnent respectivement des pertes de 7 % et de 21 % par rapport au témoin. Il convient de noter qu'il n'y a pas de différence significative pour ce qui concerne la fécondité potentielle entre les traitements T1, T2, T3 et le témoin (Tableau 1) ; par contre, les papillons du traitement T4, malgré leur fécondité potentielle supérieure, présentent une fécondité réelle nettement inférieure à celle des traitements T1 et T2. La rétention d'oeufs est également nettement plus élevée chez le traitement T4 que chez les autres traitements.

Il est donc évident que, sur une même durée, les papillons mis à pondre sur des branches fraîches de Som pondent un plus grand nombre d'oeufs que les papillons placés sur des branches sèches et dans des récipients fermés faits de substance inerte. Ceci permet de démontrer la sensibilité des papillons à l'odeur de la plante hôte, comme le montrent les résultats obtenus avec les traitements T1 et T2. Au cours d'une étude sur le comportement de ponte de la pyrale indienne *Plodia interpunctella*, Deser (1976) a observé que la fécondité de ce papillon augmentait en fonction de l'odeur de certains éléments nutritifs et que les oeufs étaient pondus en masse près de la source de l'odeur. Honda et Matsumoto (1984) ont obtenu des résultats similaires chez *Conogletus punctiferalis*. La sélection d'un

site approprié d'oviposition par les insectes polyphages est un facteur décisif pour le développement de la génération suivante et les événements comportementaux conduisant à l'oviposition sont fortement liés à des signaux chimiques associés aux plantes hôtes potentielles (Renwick, 1989). On a également observé que des erreurs de sélection du site d'oviposition par les insectes adultes peuvent entraîner de fortes pertes de population (Dethier, 1959). Hinton, dans son ouvrage « *Biology of Insect Eggs* » (première édition, 1981, p. 63), a indiqué que, chez la plupart des insectes, les femelles pleines demandent, pour l'oviposition, un environnement spécifique. Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent également que le ver à soie muga présente une certaine préférence d'oviposition pour ses plantes hôtes potentielles. Les données obtenues avec les traitements T3 et T4 indiquent que le ver à soie muga peut également pondre ses oeufs dans des récipients fermés mais seulement sous la contrainte. Certains insectes retiennent leurs oeufs pendant un certain temps mais se montrent moins spécifiques à mesure qu'ils vieillissent et pondent sur n'importe quel site (Knoll, 1922 ; Schwarz, 1923). L'odeur et/ou le goût des plantes ont également une plus grande importance dans le déclenchement de l'oviposition que tout autre facteur (Hinton, 1981). Comme le montrent les résultats obtenus ici, le phénomène de déclenchement de l'oviposition en présence de l'odeur de la plante hôte observé chez d'autres espèces d'insectes ne peut être écarté chez le ver à soie muga. Une analyse biochimique détaillée des agents d'attraction volatiles présents dans les branches fraîches de *Som* qui induisent l'oviposition maximale chez ce papillon et des études de corrélation avec divers paramètres météorologiques permettront d'obtenir des informations et d'ouvrir de nouvelles possibilités pour la filière de grainage muga.

STUDIES ON CRUDE PROTEIN AND AMINO ACID CONTENTS OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) LEAVES IN RELATION TO COCOON PRODUCTION OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

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

1. Serichemistry Laboratory, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi 6100, Bangladesh.

2. Department of Biochemistry, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

*Crude protein and amino acid (total and free form) contents of five mulberry varieties were studied and their influence on the cocoon characters of two silkworm (*Bombyx mori* L.) races were studied. Mulberry varieties BM-1, BM-3 and BM-4 were found to contain higher amounts of crude protein, amino acids in total and free form, which resulted in producing higher amounts of single cocoon and shell weight, cocoon yield/100 larvae, filament length and fibroin content of the cocoon shell. There were positive correlations of crude protein with cocoon shell weight and cocoon yield.*

Keywords: Mulberry leaf, crude protein, amino acid, silkworm, cocoon characters.

INTRODUCTION

Silk is a solidified viscous fluid excreted from special glands by the silkworm. It is a polymer mainly made up of amino acids, glycine and alanine (Reddy, 1992). Raw silk consists primarily of proteins, sericin and fibroin. The bulk is fibroin coated with 25-30% sericin (Sadov *et al.*, 1978). These two proteins are synthesised by the silkworm, *Bombyx mori* L. in two silk glands from the mulberry leaf it feeds on during its larval period of twenty-five to thirty days (Ullal and Narasimhanna, 1987).

The main parts of proteins of mulberry leaves are globulin, glutelin, prolamine, albumin, protease, etc., and the amino acid components of proteins of mulberry leaves are glycocoll, alanine, valine, leucine, aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine, proline, hydroxyproline, cysteine, cystine, etc. (Anonymous, 1975). Amino acids are one of the most important constituents in silkworm nutrition and the silkworm requires 18 amino acids for its nutrition. The requirements for the usual ten essential amino acids in silkworm nutrition have been confirmed by different deletion experiments (Inokuchi *et al.*, 1967). The best growth of silkworms is obtained when the diet or mulberry leaf contains the ten essential amino acids, proline, the five nonessential amino acids and the two acidic amino acids (Bose *et al.*, 1989). Chuan and Chuang (1988) reported that 170 parts of protein, 200 parts of sugar, 23 parts of fat and 7 parts of inorganic salts are required to produce 100 parts of silk substance. All these substances come from mulberry leaves, hence the nutritional quality of mulberry leaves is important for a successful cocoon crop harvest. Therefore, a study has been undertaken to select mulberry variety/varieties containing higher amounts of protein and amino acids for qualitative and quantitative improvement of cocoon production in the silkworm, *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Five-year-old mulberry plants of varieties BM-1, BM-2, BM-3, BM-4 and Telia were selected for the study. The chemical fertilisers at the rate of 300 kg N, 150 kg P₂O₅ and 100 kg K₂O/ha/yr in four split doses were applied to the mulberry field. Organic manure at the rate of 20 mt/ha was also

used once in a year. Normal cultural operations were carried out as and when needed. All the plants were irrigated twice a month depending on the rainfall conditions.

Leaf samples in three replications were collected from the stem of a mulberry plant starting from the top largest glossy leaf down to the bottom level excluding the overmature leaves. The collected leaf samples were dried in an oven at 70 °C until constant weight was obtained. The nitrogen content of mulberry leaves was determined by the micro kjeldahl method and the crude protein was estimated using the conversion factor 6.25. The total and free amino acid contents of fresh mulberry leaves were determined by two dimensional paper chromatography (Jayaraman, 1985).

The nutritive effect of five varieties of mulberry leaves were evaluated through rearing of two silkworm races, BSRI-85/3 (improved multivoltine) and BV(J) (evolved bivoltine). Rearing was started 45 days after pruning of the mulberry plants. Three DFLs (disease-free layings) of silkworm eggs were brushed for each variety. After the second moult, 200 larvae were selected for each replication. The rearing was conducted in three replications according to the improved technique of Krishnaswami (1978). The experiment was carried out during four seasons, S₁ (February-March), S₂ (May-June), S₃ (August-September) and S₄ (November-December).

The quality and quantity of cocoons produced were evaluated by taking single cocoon and shell weights, cocoon yield/100 larvae and filament length using standard techniques as applied for assessment of silk cocoons. The sericin content in the cocoon shell was determined following the method of Orlandi (1954) and the fibroin content was estimated by subtraction.

RESULTS AND DISCUSSION

The crude protein content of the five mulberry varieties studied during four seasons is presented in Table I. Variety BM-3 contained the highest amount of crude protein followed by the varieties BM-1 and BM-4. Variety Telia showed the lowest value. Seasons S₁ (February-March) and S₃ (August-September) showed the highest and lowest values of crude protein in all the varieties studied. Fifteen amino acids, i.e., alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, proline, phenylalanine, serine, threonine, tyrosine and valine, were found in the mulberry leaves of all the varieties in the total form (Table II). The highest values of glutamic acid, glycine, histidine, leucine, lysine and valine were obtained in variety BM-3 whereas the highest amount of alanine, serine and tyrosine were observed in variety BM-1. Again, variety BM-4 contained the highest amount of arginine, isoleucine and phenylalanine. The highest amounts of aspartic acid and threonine were found in varieties Telia and BM-2, respectively.

Twelve amino acids, i.e., alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, leucine, lysine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine and amino butyric acid, were present in free state (Table III). Leucine and tyrosine were found to be highest in varieties Telia and BM-2 in free form, respectively. Variety BM-3 contained alanine, aspartic acid, proline, threonine and valine in highest amounts while variety BM-1 showed the highest value in arginine and amino butyric acid in free form. Glutamic acid and serine were observed to be highest in variety BM-4 in free form.

Mean cocoon characters, i.e., single cocoon weight, single shell weight, cocoon yield, filament length, fibroin and sericin content in the cocoon shell, of two silkworm races were studied during four seasons (Table IV). The highest single cocoon weight, single shell weight, cocoon yield/100 larvae, filament length and fibroin content of the cocoon shell for the silkworm races BSRI-85/3 and BV(J) were found on feeding the leaves of mulberry variety BM-3, followed by BM-1 and BM-4. The least values of the above characters were observed on feeding the leaves of variety Telia. The highest sericin content of cocoon shell was obtained on feeding mulberry leaves of variety BM-2 both for BSRI-85/3 and BV(J) races.

The mean shell weight and cocoon yield of BSRI-85/3 and BV(J) races were respectively plotted against the crude protein content of mulberry leaves and the regression lines were drawn by the method of the least squares (Fig. 1 and 2). The estimated correlation coefficients suggest that the shell weight and cocoon yield were positively correlated ($r = 0.93$ and $r = 0.99$, respectively) with the crude protein content of mulberry leaves.

Table I. Crude protein content (g/100 g dry leaf) of different mulberry varieties during four seasons.*Tableau I. Teneur en protéines brutes (g/100 g de feuilles sèches) chez différentes variétés de mûrier au cours de quatre saisons.*

Variety <i>Variété</i>	Season / Saison				Mean <i>Moyenne</i>
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	
Telia	18.60	19.30	17.37	18.11	18.34
BM-1	21.70	22.57	20.18	21.32	21.44
BM-2	19.62	20.48	18.31	19.16	19.39
BM-3	22.78	23.32	21.50	22.40	22.50
BM-4	20.66	21.51	19.42	20.13	20.43
CD at 5%	0.18	0.16	0.20	0.20	0.19
CD at 1%	0.26	0.23	0.29	0.29	0.27

Table II. Total amino acid (free + bound) content of different mulberry varieties (percentage in fresh leaves).*Tableau II. Teneur totale en acides aminés (libres + liés) chez différentes variétés de mûrier (pourcentage dans les feuilles fraîches).*

Amino acid <i>Acide aminé</i>	Variety / <i>Variété</i>				
	Telia	BM-1	BM-2	BM-3	BM-4
Alanine	1.05	1.22	1.01	1.20	1.10
Arginine	0.40	0.48	0.45	0.50	0.52
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	2.06	1.53	1.60	2.01	1.82
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	1.80	2.05	1.70	2.25	2.10
Glycine	0.87	1.05	0.89	1.09	0.98
Histidine	0.42	0.40	0.38	0.45	0.41
Isoleucine	0.72	0.96	0.80	0.94	1.00
Leucine	1.60	1.75	1.53	1.81	1.70
Lysine	0.90	1.10	1.01	1.16	1.08
Proline	0.82	1.00	0.80	0.96	0.92
Phenylalanine / <i>Phénylalanine</i>	0.90	1.07	0.92	1.11	1.13
Serine / <i>Sérine</i>	0.70	0.95	0.71	0.88	0.90
Threonine / <i>Thréonine</i>	0.74	0.91	0.94	0.82	0.90
Tyrosine	0.51	0.63	0.50	0.61	0.60
Valine	0.91	1.14	1.03	1.20	1.16

Table III. Free amino acid content of different mulberry varieties (percentage in fresh leaves).
Tableau III. Teneur en acides aminés libres chez différentes variétés de mûrier (pourcentage dans les feuilles fraîches).

Amino acid <i>Acide aminé</i>	Variety / <i>Variété</i>				
	Telia	BM-1	BM-2	BM-3	BM-4
Alanine	0.065	0.081	0.074	0.098	0.085
Arginine	0.390	0.421	0.380	0.410	0.403
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	0.018	0.016	0.014	0.023	0.022
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	0.023	0.025	0.021	0.024	0.031
Leucine	0.013	0.012	0.01	0.011	0.01
Lysine	0.012	0.013	0.011	0.012	0.011
Proline	0.053	0.055	0.052	0.058	0.054
Serine / <i>Sérine</i>	0.072	0.071	0.074	0.076	0.078
Threonine / <i>Thréonine</i>	0.018	0.02	0.022	0.023	0.021
Tyrosine	0.015	0.012	0.017	0.013	0.014
Valine	0.011	0.014	0.012	0.016	0.013
Aminobutyric acid / <i>Acide aminobutyrique</i>	0.136	0.143	0.133	0.138	0.141

Table IV. Mean cocoon characters of two silkworm races fed on five mulberry varieties over four seasons.

Tableau IV. Moyennes des caractères du cocon chez deux races de ver à soie nourries avec cinq variétés de mûrier sur quatre saisons.

Mulberry variety	Cocoon characters					
	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Cocoon yield (g/100 larvae)	Filament length (m)	Fibroin (g/100 g cocoon shell)	Sericin (g/100 g cocoon shell)
<i>Variété de mûrier</i>	<i>Caractères du cocon</i>					
	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Rendement en cocons (g/100 larves)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Fibroïne (g/100 g de coque)</i>	<i>Séricine (g/100 g de coque)</i>
Race: BSRI-85/3						
Talia	1.18 ^b	0.16 ^b	66.57 ^c	584.76 ^c	70.66 ^c	29.34 ^b
BM-1	1.23 ^a	0.18 ^{ab}	75.44 ^b	657.42 ^b	73.04 ^b	26.95 ^c
BM-2	1.17 ^b	0.15 ^{bc}	69.67 ^d	609.11 ^c	70.23 ^c	29.77 ^a
BM-3	1.25 ^a	0.20 ^a	78.60 ^a	675.94 ^a	73.74 ^a	26.25 ^d
BM-4	1.22 ^a	0.18 ^b	72.07 ^c	659.93 ^b	73.30 ^{ab}	26.70 ^{bc}
Race: BV(J)						
Telia	1.24 ^c	0.21 ^c	76.22 ^d	825.25 ^c	75.07 ^c	24.94 ^b
BM-1	1.34 ^a	0.25 ^b	87.93 ^b	893.00 ^b	76.64 ^{ab}	23.36 ^d
BM-2	1.29 ^b	0.22 ^c	80.45 ^c	814.66 ^c	74.35 ^d	25.65 ^a
BM-3	1.37 ^a	0.27 ^a	91.59 ^a	925.42 ^a	76.85 ^a	23.14 ^c
BM-4	1.35 ^a	0.25 ^b	87.76 ^a	912.92 ^a	76.41 ^b	23.59 ^c

Figure(s) followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5% level as per Duncan's multiple range test.
 Les chiffres suivis d'une même lettre ne diffèrent pas de manière significative au seuil de 5 % d'après le test de Duncan.

Protein is the main constituent of mulberry leaves and it is reported that nearly 70 per cent of the silk proteins produced by a silkworm is directly derived from the proteins of mulberry leaves (Rangaswami *et al.*, 1976). The crude protein content of mulberry leaves was found to be higher in varieties BM-3, BM-1 and BM-4 compared to the other varieties studied, which might be due to genotype variation.

The silkworm, *Bombyx mori* L., requires 10 essential amino acids which can be synthesised by the silkworm only when their precursors are present in the diet or mulberry leaves (Bajpeyi *et al.*, 1991). In the present studies, BM-3, BM-1 and BM-4 contained higher amounts of 15 amino acids in total form (Table II) while Bose *et al.* (1989) reported 18 amino acids in mulberry leaves in total form (free + bound). Among the five varieties, BM-3, BM-1 and BM-4 showed 12 amino acids in free form (Table III) whereas 17 amino acids in free form were reported (Bose and Majumdar, 1989). Free amino acids in plant tissues are sensitive indicators of the nutritional status. The content of free amino acids in mulberry leaves affects the cocoon shell of the silkworm (Yamada *et al.*, 1983). It is reported that omission of any of the 10 essential amino acids from the artificial diet leads to block the protein synthesis and enhance the uric acid excretion (Horie and Inokuchi, 1978). Again, the omission of both glutamic acid and aspartic acid from the artificial diet results in marked retardation of larval growth (Horie and Watanabe, 1980).

The highest cocoon weight, shell weight, cocoon yield, filament length and fibroin content of the cocoon shell of the races BSRI-85/3 and BV(J) were obtained on feeding mulberry leaves of the varieties BM-3, BM-1 and BM-4 (Table IV), which might be due to the presence of higher amounts of protein and amino acids in the leaves of these varieties. The bulk of silk fibroin was formed by the four amino acids glycine, alanine, serine and tyrosine, and that glycine and alanine, which are the amino acids with a shorter side-chain, occupied an exceptionally high proportion (Bajpeyi *et al.*, 1991).

The positive correlation coefficients of the cocoon shell weight and cocoon yield with the crude protein content of mulberry leaves (Fig. 1 and 2) indicate that with the increase in crude protein content of mulberry leaves, the cocoon shell weight and cocoon yield of *Bombyx mori* increased.

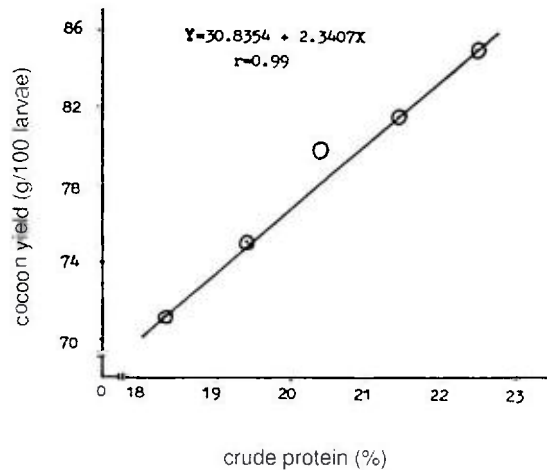


Fig. 1: Regression line of cocoon yield with crude protein content of mulberry leaves.

Fig. 1 : Droite de régression du rendement en cocons par rapport à la teneur en protéines brutes des feuilles.

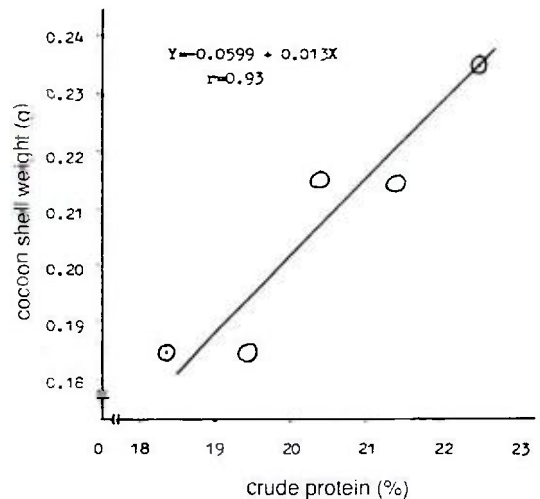


Fig. 2: Regression line of cocoon shell weight with crude protein content of mulberry leaves.

Fig. 2 : Droite de régression du poids de la coque par rapport à la teneur en protéines brutes des feuilles.

CONCLUSION

On the basis of the above results and discussion, it is suggested that the mulberry varieties BM-3, BM-1 and BM-4 may be cultivated commercially to boost up cocoon crop harvest as these varieties contain higher amounts of crude protein and required amino acids for silk fibroin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori* L.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mr Mokhesur Rahman and Mr S.M. Nazim of the Serichemistry Laboratory, BSRTI, Rajshahi, for help in rearing the silkworms. We are grateful to the Director of BSRTI, Rajshahi, for providing necessary facilities for the study.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Textbook of Tropical Sericulture. Japan Overseas Cooperation Volunteers, Tokyo, pp. 154-166.
- BAJPEYI C.M., SINGH R.N., THANGAVELU K. (1991) Supplementary nutrients to increase silk production. *Indian Silk*, 30(7), 41-42.
- BOSE P.C., MAJUMDAR S.K. (1989) Amino acid requirements in silkworm, *Bombyx mori* L., nutrition. *Indian Silk*, 28(4), 41-43.
- BOSE P.C., MAJUMDAR S.K., SENGUPTA K. (1989) Role of amino acids in silkworm, *Bombyx mori* L. Nutrition and their assurance in hemolymph, silk gland and cocoons - A review. *Indian J. Seric.*, 28(1), 17-31.
- CHUAN W.P., CHUANG C.D. (1988) Silkworm rearing. (translated by Chen *et al.*, Regional Sericulture Training Centre, Guangzhou, China). *FAO Agricult. Services Bull.*, 73(2), 39-56.
- HORIE Y., INOKUCHI T. (1978) Protein synthesis and uric acid excretion in the absence of essential amino acids in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biochem.*, 8, 201-204.
- HORIE Y., WATANABE M. (1980) Recent advances in sericulture. *Ann. Rev. Entomol.*, 25, 49-71.
- INOKUCHI T., HORIE Y., ITO T. (1967) Nutrition of silkworm, *Bombyx mori* L. XIX. Effects of omission of essential amino acids in each of the larval instars. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 22, 195.
- JAYARAMAN J. (1985) Laboratory Manual in Biochemistry. Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, pp. 75-78.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New Technology of Silkworm Rearing. Bull. No. 2, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- ORLANDI L. (1954) Percentute di sericin in Bozzoli diversi razze incroci di *Bombyx mori* L. *Annuaio*, 5(1), 195.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R. (1976) Sericulture Manual 1: Mulberry Cultivation. *FAO Agricultural Services Bull.* 15/1, UNO, Rome, pp. 1-97.
- REDDY K.D. (1992) Nature of silk: increasing silk yield using silkworm's body chemistry. *Indian Silk*, 31(2), 38-40.
- SADOV F., KORCHAGIN M., MATETSKY A. (1978) Chemical Technology of Fibrous materials. Mir Publishers, Moscow, 97 p.
- ULLAL S.R., NARASIMHANNA M.N. (1987) Handbook of Practical Sericulture. Central Silk Board, India, pp. 1-28.
- YAMADA N., NAKAMURA K., INOKUCHI T. (1983) Effects of diets on the content of free amino acid and urea in the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nippon Oyo Dobutzu Konchue, Gakkishi*, 27(1), 46-51.

ETUDE SUR LES TENEURS EN PROTEINES ET EN ACIDES AMINES DES FEUILLES DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) EN RELATION AVEC LA PRODUCTION DE COCONS CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI*

A.A. SARKER¹, M R. HAQUE¹, M.A. RAB¹ & 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 étudié les teneurs en protéines brutes et en acides aminés (totaux et libres) de cinq variétés de mûrier ainsi que leur influence sur les caractères du cocon chez deux races de vers à soie (*Bombyx mori* L.). Les variétés de mûrier BM-1, BM-3 et BM-4 contiennent des quantités supérieures de protéines totales et d'acides aminés libres et totaux ; ceci se traduit par des valeurs plus élevées pour ce qui concerne le poids du cocon, le poids de la coque, le rendement en cocons pour 100 larves, la longueur de la bave et la teneur en fibroïne de la coque. On observe une corrélation positive entre la teneur en protéines brutes, d'une part, et le poids de la coque et le rendement en cocons, d'autre part.*

INTRODUCTION

La soie est un liquide visqueux solidifié excreté par des glandes spécifiques du ver à soie. C'est un polymère composé principalement des acides aminés glycine et alanine (Reddy, 1992). La soie grège contient essentiellement des protéines (séricine et fibroïne), la majeure partie étant de la fibroïne recouverte de 25 à 30 % de séricine (Sadov et coll., 1978). Ces deux protéines sont synthétisées par le ver à soie *Bombyx mori* dans deux glandes séricigènes à partir de la feuille de mûrier dont il se nourrit au cours de sa période larvaire, qui dure 25 à 30 jours (Ullal et Narasimhanna, 1987).

Les principaux composants protéiques des feuilles de mûrier sont la globuline, la glutéline, la prolamine, l'albumine, les protéases, etc. ; les acides aminés constitutifs des protéines de feuilles de mûrier sont le glycocolle, l'alanine, la valine, la leucine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la phénylalanine, la proline, l'hydroxyproline, la cystéine, la cystine, etc. (Anonyme, 1975). Les acides aminés sont l'un des composants les plus importants dans la nutrition du ver à soie, dix-huit acides aminés étant nécessaires pour sa nutrition. Les besoins nutritifs du ver à soie en dix acides aminés essentiels ont été confirmés par différentes expériences de carence (Inokuchi et coll., 1967). La croissance du ver à soie est optimale lorsque l'aliment, ou la feuille de mûrier, contient les dix acides aminés essentiels, de la proline, cinq acides aminés non essentiels et deux acides aminés acides (Bose et coll., 1989). Chuan et Chuang (1988) ont observé que 170 parties de protéines, 200 parties de sucre, 23 parties de matières grasses et 7 parties de sels inorganiques sont nécessaires pour produire 100 parties de substance de soie. Toutes ces substances provenant des feuilles de mûrier, la qualité nutritive de la feuille de mûrier est essentielle à la réussite d'une récolte de cocons. Une étude visant à sélectionner une ou des variété(s) de mûrier présentant des teneurs supérieures en protéines et en acides aminés a été entreprise afin d'obtenir une amélioration qualitative et quantitative de la production de cocons chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Des plants âgés de cinq ans appartenant aux variétés BM-1, BM-2, BM-3, BM-4 et Telia ont été choisis pour cette étude. Des engrais chimiques à raison de 300 kg N, 150 kg P₂SO₅ et 100 kg K₂O/ha/an ont été appliqués en quatre doses égales sur la plantation. Du fumier organique à raison de 20 tonnes/ha a également été appliqué une fois dans l'année. Les opérations culturales habituelles ont été effectuées suivant les besoins. Tous les plants ont été irrigués deux fois par mois en fonction des conditions pluviométriques.

Des échantillons de feuilles en trois répétitions ont été prélevés sur la tige à partir de la feuille vernissée supérieure la plus large jusqu'au niveau basal en évitant les feuilles trop âgées. Les échantillons de feuilles ont été séchés au four à 70 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. La teneur en azote des feuilles a été déterminée selon la méthode de Microkjeldahl et la teneur en protéines brutes a été estimée à l'aide du facteur de conversion 6,25. Les teneurs en acides aminés totaux et libres des feuilles de mûrier ont été déterminées par chromatographie bidimensionnelle (Jayaraman, 1985).

L'effet nutritif des cinq variétés de mûrier a été évalué chez deux races de vers à soie : BSRI-85/3 (polyvoltin amélioré) et BV(J) (bivoltin). On a commencé l'élevage 45 jours après la taille des plants. Trois pontes saines ont été levées pour chaque variété. Après la deuxième mue, 200 larves ont été sélectionnées pour chaque répétition. L'élevage a été réalisé en trois répétitions selon la technique améliorée de Krishnaswami (1978). Cette expérience a été effectuée sur quatre saisons : S₁ (février-mars), S₂ (mai-juin), S₃ (août-septembre) et S₄ (novembre-décembre).

La qualité et la quantité des cocons produits ont été évaluées sur la base des valeurs obtenues pour le poids de la coque, le poids du cocon, le rendement en cocons pour 100 larves et la longueur de la bave en utilisant les techniques standard appliquées à l'évaluation des cocons de soie. La teneur en sérécine de la coque soyeuse a été déterminée d'après la méthode d'Orlandi (1954) et la teneur en fibroïne par soustraction.

RESULTATS ET DISCUSSION

La teneur en protéines brutes des cinq variétés de mûrier considérées sur quatre saisons est présentée dans le tableau I. La variété BM-3 présente la teneur maximale en protéines brutes, devant les variétés BM-1 et BM-4 tandis que la variété Telia présente la valeur minimale. La teneur en protéines brutes est maximale à la saison S₁ (février-mars) et minimale à la saison S₃ (août-septembre) chez toutes les variétés étudiées. Quinze acides aminés, à savoir alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, isoleucine, lysine, proline, phénylalanine, sérine, thréonine, tyrosine et valine, ont été observés sous forme totale dans les feuilles de mûrier pour toutes les variétés (Tableau II). La variété BM-3 présente les valeurs maximales pour l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, la leucine, la lysine et la valine tandis que la variété BM-1 donne les valeurs maximales pour l'alanine, la sérine et la tyrosine. La variété BM-4 présente la teneur maximale en arginine, en isoleucine et en phénylalanine. Les variétés Telia et BM-2 présentent respectivement les teneurs maximales en acide aspartique et en thréonine.

Douze acides aminés sont présents sous forme libre : alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, leucine, lysine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine et acide aminobutyrique (Tableau III). Les variétés Telia et BM-2 présentent respectivement les teneurs maximales en leucine et en tyrosine sous forme libre. La variété BM-3 donne les teneurs maximales en alanine, en acide aspartique, en proline, en thréonine et en valine sous forme libre tandis que la variété BM-1 présente la teneur maximale en arginine et acide aminobutyrique sous forme libre. Les teneurs en acide glutamique et en sérine sous forme libre sont maximales chez la variété BM-4.

On a étudié certains caractères moyens du cocon tels que le poids du cocon, le poids de la coque, le rendement en cocons, la longueur de la bave, les teneurs en fibroïne et en sérécine de la coque chez deux races de vers à soie sur quatre saisons (Tableau IV). Le poids du cocon, le poids de la coque, le rendement en cocons pour 100 larves, la longueur de la bave et la teneur en fibroïne de la coque sont maximaux chez les races de vers à soie BSRI-85/3 et BV(J) après nourrissage avec des feuilles de la variété BM-3, devant les variétés BM-1 et BM-4. Les valeurs de ces caractères sont minimales chez

les vers à soie nourris avec des feuilles de la variété Telia. La teneur en sérine de la coque est maximale chez les deux races de vers à soie considérées nourries avec des feuilles de la variété BM-2.

On a tracé la droite de régression du poids moyen du cocon et du rendement moyen en cocons par rapport à la teneur en protéines brutes des feuilles selon la méthode des moindres carrés (Fig. 1 et 2). Les coefficients de corrélation estimés indiquent que le poids de la coque et le rendement en cocons sont corrélés positivement avec la teneur en protéines brutes (respectivement $r = 0,93$ et $r = 0,99$) des feuilles de mûrier.

Les principaux composants des feuilles de mûrier sont les protéines et 70 % des protéines de soie produites par le ver à soie sont directement dérivés des protéines de feuilles de mûrier (Rangaswami et coll., 1976). La teneur en protéines brutes des feuilles de mûrier est plus élevée chez les variétés BM-3, BM-1 et BM-4 que chez les autres variétés considérées ; ceci pourrait être dû à des variations génotypiques.

Le ver à soie a besoin de dix acides aminés essentiels qu'il ne peut synthétiser que lorsque leurs précurseurs sont présents dans l'aliment ou dans les feuilles de mûrier (Bajpeyi et coll., 1991). Dans cette étude, les variétés BM-3, BM-1 et BM-4 présentent des teneurs supérieures en quinze acides aminés sous forme totale (Tableau II) tandis que Bose et coll. (1989) ont observé dix-huit acides aminés sous forme totale (libre + liée) dans les feuilles de mûrier. D'après notre étude, les variétés BM-3, BM-1 et BM-4 possèdent douze acides aminés sous forme libre (Tableau III) tandis que Bose et Majumdar (1989) ont observé dix-sept acides aminés sous forme libre. Les acides aminés libres contenus dans les tissus foliaires sont des indices du statut nutritionnel. La teneur en acides aminés libres des feuilles de mûrier affecte la coque soyeuse du ver à soie (Yanada et coll., 1983). L'absence de l'un des dix acides aminés essentiels dans l'aliment artificiel entraîne l'inhibition de la synthèse de protéines et favorise l'excrétion d'acide urique (Horie et Inokuchi, 1978). De la même façon, l'absence des acides glutamique et aspartique dans l'aliment artificiel retarde fortement la croissance larvaire (Horie et Watanabe, 1980).

Le poids du cocon, le poids de la coque, le rendement en cocons, la longueur de la bave et la teneur en fibroïne de la coque sont maximaux chez les races BSRI-85/3 et BV(J) nourries avec des feuilles des variétés BM-3, BM-1 et BM-4 (Tableau IV) ; ceci pourrait être dû à la présence d'une quantité plus importante de protéines et d'acides aminés dans les feuilles de ces variétés. La fibroïne de soie est composée en majeure partie de glycine, d'alanine, de sérine et de tyrosine ; la glycine et l'alanine, acides aminés à chaîne latérale courte, sont présentes dans des proportions extrêmement importantes (Bajpeyi et coll., 1991).

Les coefficients de corrélation positifs entre, d'une part, le poids de la coque et le rendement en cocons et, d'autre part, la teneur en protéines brutes des feuilles de mûrier (Fig. 1 et 2) indiquent que l'augmentation du poids de la coque et du rendement en cocons chez *Bombyx mori* est proportionnelle à la teneur en protéines brutes des feuilles de mûrier.

CONCLUSION

Sur la base des résultats et de la discussion présentés ici, on suggère de cultiver les variétés BM-3, BM-1 et BM-4 à l'échelle commerciale pour assurer une bonne récolte de cocons, ces variétés présentant des teneurs supérieures en protéines brutes et en acides aminés essentiels, composants indispensables pour la synthèse de la fibroïne de soie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

MULBERRY RAISING UNDER SUBTROPICAL CONDITIONS OF INDIA — AN ECONOMIC APPRAISAL

ANIL DHAR & B.B. BINDROO

Regional Sericultural Research Station, Miran Sahib, Jammu - 181 101, India.

The cost and financial analysis techniques of UNIDO concerning project appraisals were utilised to estimate the NPV and IRR for a model proposed for raising mulberry through 'Kissan Nurseries' in subtropical regions. The analysis revealed that following the technology described the raising of mulberry saplings is economically a viable proposition at the commercial level, provided that the survivability potential of the mulberry cutting material does not fall below 35% and that the cost of saplings should stand to prevail at 35 paise (US\$ 0.01) or beyond.

Keywords: Mulberry, nurseries, cost analysis, net present value, internal rate of return, economics.

INTRODUCTION

The entire subtropical belt of India, comprising the areas of Punjab, Haryana and parts of Jammu and Kashmir, Himachal Pradesh, Uttar Pradesh and Rajasthan, has a tremendous sericultural potential. Although the mulberry farming in India is now picking up in a big way, the available mulberry wealth in subtropical regions is mostly met in the form of scattered trees and wayside plants. Owing to the launching of the National Sericulture Project in 1989 under the World Bank and Swiss Development Bank assistance, the innovation of technologies particularly for economic raising of mulberry became imperative.

The raising of mulberry saplings through Kissan (farmer's) Nurseries, though a distinct activity in the National Sericulture Project, has virtually lost impetus in the farmers' field; the reason being the lack of effective technologies which could snug comprehensive and viable economic models acceptable for subtropical climates. Steps in this direction have, however, been undertaken (Bindroo and Bhat, 1992; Fotedar *et al.*, 1995) to develop some acceptable mulberry cultivation packages for direct field utilisation in subtropical regions. To some extent, the seed cuttings/planting material of different mulberry varieties are still brought to these areas all the way from the southern regions of India for propagation and plantation purposes. A lot of work has, however, been carried out on propagation of mulberry through cuttings both under temperate and subtropical areas (Bindroo *et al.*, 1988; Das *et al.*, 1987; Fotedar *et al.*, 1990; Tiku *et al.*, 1987, 1989) but no information on the economics of mulberry raising at farmer's level is available for this area except for an attempt by Bindroo and Bhat (1992).

In view of these facts, a model has been envisaged on the economics of raising mulberry saplings commercially in the subtropical areas of the country. The prime objective of the project is to meet the much needed demand for mulberry saplings under the National Sericulture Project through nurseries which could be run profitably by the farmer himself and who could also sell the plants directly to the people interested in mulberry farming.

METHODOLOGY

The cost analysis and economics of raising mulberry saplings has been calculated for one acre (4047 m²) of land on the basis of the package of practices already recommended for raising nurseries under subtropical conditions (Bindroo *et al.*, 1996; Fotedar *et al.*, 1995).

The analysis has been worked out using the standard analysis technique for project appraisals (UNIDO, 1978) by estimating the net present value (NPV) of the project and internal rate of return (IRR) on a Lotus worksheet of personal computer. The analysis has been carried out on the fact, based on three years' data collected on the practical feasibility of nursery-raising commercially, that in subtropical regions mulberry nurseries can be raised twice a year (Fig. 1) during the monsoon season (June-July) and winter season (December-January), a practice hitherto unknown in this region. The saplings of monsoon nursery become ready for transplantation in winter and the saplings raised in winter nursery become ready for transplantation during monsoon. The stocks of seed cutting material during the monsoon season remain available due to annual bottom pruning of the plants and the material for winter gets stocked out by middle pruning of the branches carried out during December-January.

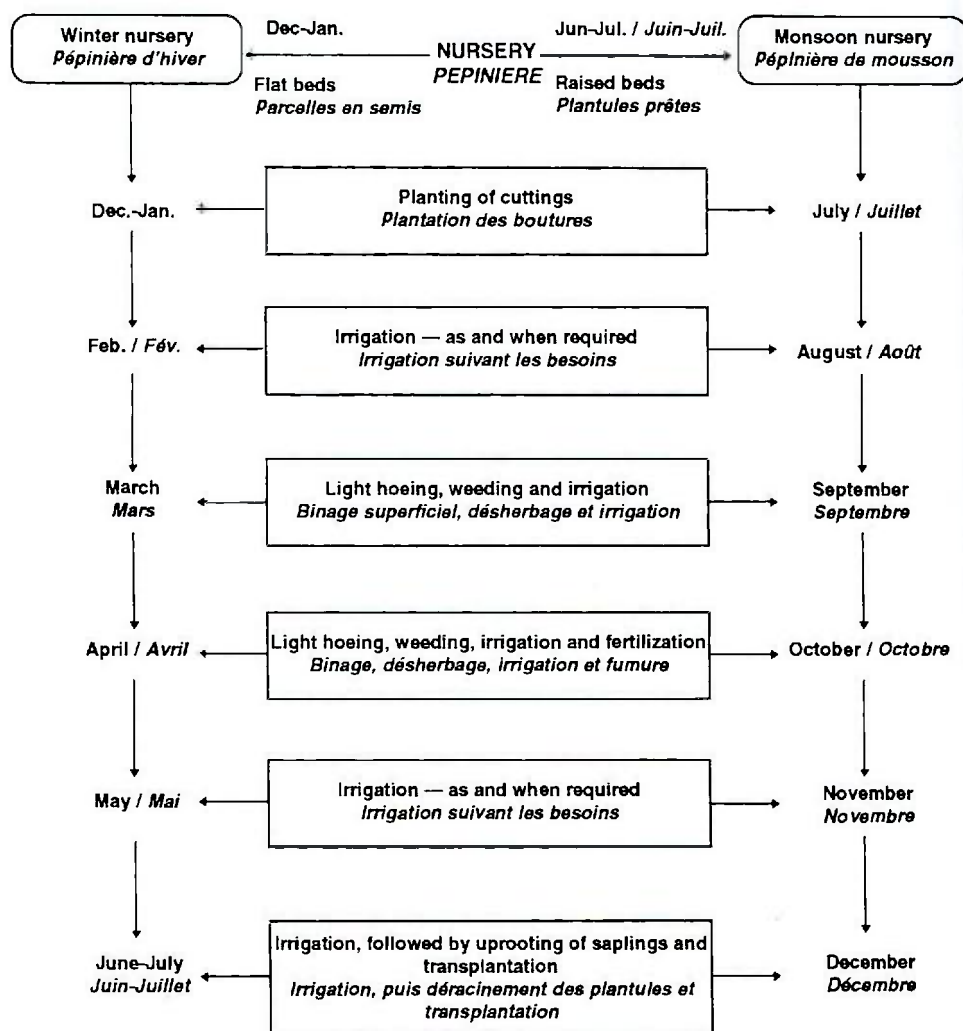


Fig. 1: Flow chart for raising mulberry nursery under subtropical conditions.
Fig. 1 : Organigramme de la production de pépinières de mûrier en milieu tropical.

All the costs are indicated in the Indian system with the equivalence of the costs given in US dollars in parentheses (@ Rs. 32.00 = US\$ 1.00).

COST ANALYSIS

The cost analysis is worked out as follows:

A) Preparation of the land:

The land can be prepared in the months of June-July with the onset of monsoon showers or/and in the month of December, corresponding to two nursery-raising seasons as recommended under subtropical conditions (Bindroo *et al.*, 1996). This would involve an expenditure of Rs. 10,640.00 (US\$ 332.5), fulfilling the following operations @ Rs. 40.00 (US\$ 1.25) per man-day.

Activity:

- Ploughing/deep digging.
- Collection of weeds/levelling and subsequent preparation of nursery beds with bunds and channels.
- Application of farmyard manure @ 20 tonnes/acre.
- Final digging of beds and mixing of farmyard manure.

B) Planting material and maintenance of nursery:

Mulberry varieties withstanding 50% of survivability could be taken as the planting material under this model. Under subtropical conditions, varieties like Chackmajra, S146 and Chinese White are advocated, as the rooting of these cultivars revolves around 50 to 60% under field conditions. The expenditure incurred on production of saplings works out to be Rs. 14,860 (US\$ 464.375) with the following activities:

Activity:

- Transportation of cuttings from the availability site, including material cost.
- Preparation of cuttings.
- Planting of cuttings
- Two rounds of hoeing/weeding.
- Irrigation, including cost towards electricity/diesel/labour.
- Application of fertiliser (urea @ 5.5 quintals).
- Uprooting of saplings.
- Miscellaneous expenditure, including cost of pesticides, etc.

C) Garden implements:

It has been estimated that garden implements amounting to Rs. 10,000.00 (US\$ 312.5) would be required cumulatively for one acre of land for a project period of five years. The implements would include digging spades, rose-cans, pickaxes, garden forks, wheelbarrows, bill-hoes, etc.

The total recurring cost thus works out to be Rs. 51,000.00 (US\$ 1,593.75) for two nursery seasons and the non-recurring cost to be Rs. 10,000.00 (US\$ 312.5) distributed over a period of five years, but to be purchased at one instance only.

FINANCIAL AND ECONOMICAL ASSUMPTIONS

Financial analysis has been worked out at Re. 0.50 (US\$ 0.016), being the cost of each sapling with an annual hike of 10%. The following points have been considered while formulating the package:

i) That the labour wages have been estimated at Rs. 40.00 (US\$ 1.25) on the basis of average prevailing rates of subtropical states of India, with an anticipated hike of 10% per year;

- ii) That the rate of chemical/farmyard manure, etc., has been fixed as per the present day rate with a provision of 10% rise in the cost of proceeding years;
- iii) That with the continuous usage of farm implements, there would be a depreciation of 30% and the loan raised at a prevailing interest rate of 12%.

In addition, other assumptions like survivability of cuttings ranging from as low as 30 to 50%, selling price of each sapling from Re. 0.30 (US\$ 0.009) to Rs. 0.50 (US\$ 0.016), depreciation rate ranging from 0 to 30% and appreciation in costs between 0 and 10% have been considered for having an overall picture of the economics of raising mulberry saplings through the package.

FINANCIAL ANALYSIS

The analysis of the data reveals that at an estimated survivability rate of 50%, the net present value of the project is recorded as Rs. 122,691.00 (US\$ 3,834.09) with an internal rate of return of 350%, thereby indicating that the raising of mulberry saplings through the package, as proposed, is an economically viable model. Table I gives the details of the model, which includes the initial flow of Rs. 10,000.00 (US\$ 312.5) to be incurred on the purchase of farm implements, operating flow for the period of five years including profits, and the depreciation on the assets. At a 30% depreciation rate a total of Rs. 1,681.00 (US\$ 52.53) are expected at the end of the project as net salvage value of farm implements, thereby Rs. 51,460.00 (US\$ 1,608.125) are expected as net cash flow at the end of the project, when proceeds from sale of saplings are calculated to be Rs. 124,449.00 (US\$ 3,889.03). It has further been observed that beyond a survivability rate of 32% (Fig. 2) it is economically feasible to go in for commercial raising of saplings. As is evident from the analysis, the net present value of the project at 32% survivability rate of cuttings is Rs. 5,000.00 (US\$ 156.25) with an IRR of 30%; whereas at 31% the NPV is (-) Rs. 1,539 (US\$ 48.09) and an IRR at 30%. NPV is (-) Rs. 8,007 (US\$ 250.22). It can thereby be concluded that no variety with a survivability rate of less than 35% is feasible for nursery-raising at commercial level. At this rate the NPV of the project works out to be about Rs. 25,000.00 (US\$ 781.25). Similarly, it is estimated that with the sale of saplings at Re. 0.35 (US\$ 0.01) and beyond, the nursery-raising at commercial level is economically viable. The lower disposal rates of the cuttings, however, make this project fairly non-viable.

Further, it is seen that, by changing the economic assumptions, hardly any difference in IRR is met, whereas the NPV of the project gets considerably altered. However, change in depreciation rates does not significantly affect the NPV as is observed when no depreciation is assumed. The NPV of Rs. 126,906.00 (US\$ 3,965.8) is expected as against Rs. 122,691.00 (US\$ 3,834.09) at 30% depreciation rate. Further, assuming that the discounting rate of the project is 6% as against the envisaged 12%, the NPV of

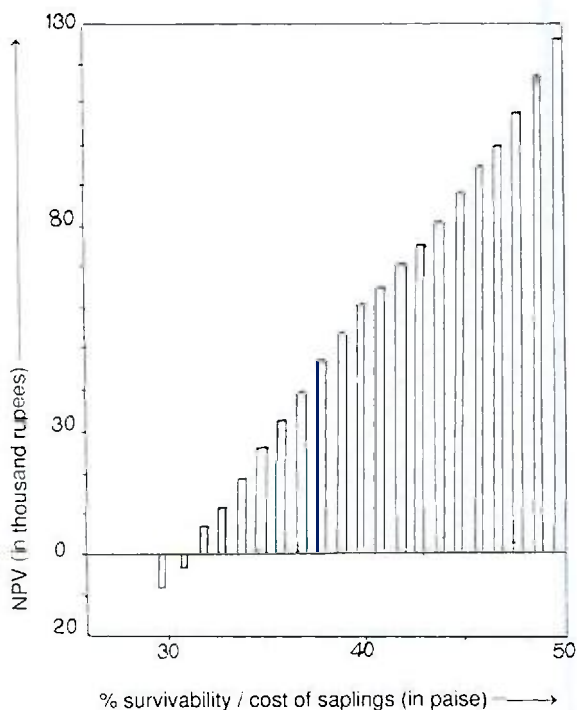


Fig. 2: Net present value (NPV) regimes on different survivability rates/sapling costs.

Fig. 2 : Régimes des valeurs actuelles nettes (NPV) en fonction des taux de survie et du coût des plantules.

Rs. 154,908 (US\$ 4,840.875) emerges and, simultaneously, at an assumed discounting rate of 0%, it is Rs. 199,254.00 (US\$ 6,226.69).

Table I. A package for raising mulberry saplings (in a one-acre nursery, two crops/year).

Tableau I. Analyse des coûts et profits de la production de plantules de mûrier (pépinière d'un acre, deux récoltes par an).

Description	Years / Années					
	0	I	II	III	IV	V
Value in rupees* / Valeur en roupies*						
Capital cost / Coût en capital						
Cost of farm implements	10000					
Coût du matériel agricole	(312.5)					
Savings / Recettes						
Proceeds from sale of saplings		85000	93500	102850	113135	124449
Produits de la vente des plantules		(2656.25)	(2921.875)	(3214.06)	(3535.47)	(3889.03)
Operational cost / Coûts d'exploitation						
Wages, cost of chemicals, etc.		51000	56100	61710	67881	74669
Salaires, produits chimiques, etc.		(1593.75)	(1753.125)	(1928.44)	(2121.28)	(2333.41)
Depreciation		3000	2100	1470	1029	720
Amortissement		(93.75)	(65.62)	(45.937)	(32.16)	(22.5)
Profit		31000	35300	39670	44225	49059
Bénéfices		(968.75)	(1103.125)	(1239.69)	(1382.03)	(1533.09)
Net salvage value						1681
Valeur nette récupérée						(52.53)
Initial flow	-10000					
Fonds initial	(312.5)					
Operating flow		34000	37400	41140	45254	49779
Flux de fonctionnement		(1062.5)	(1168.75)	(1285.625)	(1414.187)	(1555.6)
Terminal flow						1681
Capital final						(52.53)
Net cash flow	-10000	34000	37400	41140	45254	51460
Marge brute d'autofinancement	(312.5)	(1062.5)	(1168.75)	(1285.625)	(1414.187)	(1608.125)
Depreciation rate / Taux d'amortissement	30%	IRR = 350%				
Tax rate / Taux d'imposition	0.00%	NPV = 122691.00				
		(3834.09)				
Annual hike in / Hausse annuelle pour						
Cost of saplings / Coût des plantules				10%		
Cost of chemicals / Coût des produits chimiques				10%		
Labour wages/planting material, etc. / Salaires, matériel de plantation, etc.				10%		

* Values in parentheses indicate US dollars / Les chiffres entre parenthèses indiquent la valeur en dollars américains.

IRR: Internal rate of return / Taux interne de rendement. NPV: Net present value / Valeur actuelle nette. DR: Discount rate / Taux d'escompte.

It is further seen that with the assumption of no appreciation in the cost of saplings, labour wages, chemicals, etc., the estimated NPV works out to be Rs. 101,354.00 (US\$ 3,167.3); whereas, assuming that there is an escalation of 10% in all the components included in operation costs — except in the case of the cost of saplings — the NPV is estimated at Rs. 69,347.00 (US\$ 2,167.1). This means that even if the cost of saplings is maintained at Re. 0.50 (US\$ 0.016) per sapling for the project period of five years, the project pays for itself.

ECONOMICS

As per the recommended package of nursery-raising under subtropical conditions, a total of 0.2 million cuttings can be planted in one acre of land at a spacing of 6" × 4" (15 × 10 cm) in one season, keeping a provision of bunds and channels in-between the nursery beds. With a survivability rate of only 50% at farmers' level, 0.1 million saplings could be produced from one acre of land in one season. Further, with a provision of 5% loss of saplings on uprooting and 10% rejections on account of weak and undersized saplings, consequently a total of 0.17 million healthy saplings could be raised in one acre of land per year in two nursery-planting seasons. At a selling price of Re. 0.50 (US\$ 0.016) per sapling, Rs. 85,000.00 (US\$ 2,656.25) would be the total returns from one acre of land. Deducting the recurring cost of Rs. 51,000 (US\$ 1,593.75) per year and also the non-recurring cost of Rs. 10,000 (US\$ 312.5) distributed for a period of five years at Rs. 2,000.00 (US\$ 62.5) per year, the net returns during one year would be Rs. 32,000 (US\$ 1,000).

The above analysis therefore reveals that raising of mulberry saplings for bush plantation is economically very much viable at commercial level, following the technology described, provided that the survivability rate of cuttings does not fall below 35% and that the cost of sapling should stand to prevail at 35 paise (US\$ 0.01) or beyond. However, the cost of production and analysis thereof may vary for raising 1-2 year-old mulberry saplings for tree plantation.

REFERENCES

- BINDROO B.B., TIKU A.K., PANDIT R.K. (1988) Response of Japanese mulberry varieties propagated through cuttings under Kashmir eco-climate. *Geobios New Reports*, 7(1), 36-39.
- BINDROO B.B., BHAT M.I. (1992) Appraisal of producing improved mulberry cuttings/saplings at farmers' level in sub-tropical region of Jammu & Kashmir state. Third Organisation Based Programme on Computer Application in Economics, Statistics, Fin. and Proj. Management, April-May 1992, IIM, Bangalore.
- BINDROO B.B., FOTEDAR R.K., DHAR A. (1996) Propagation of mulberry under sub-tropical conditions. *Indian Silk*, 34(9), 11-15.
- DAS B.C., BINDROO B.B., TIKU A.K., PANDIT R.K. (1987) Propagating mulberry through cuttings. *Indian Silk*, 26(1), 12-13.
- FOTEDAR R.K., AHSAN M.M., DHAR A. (1990) Screening of mulberry varieties for rooting and induction of rooting by the use of growth regulators. *Sericologia*, 30(3), 347-361.
- FOTEDAR R.K., DHAR A., BINDROO B.B. (1995) Package of practices for mulberry cultivation under sub-tropical conditions. *Indian Silk*, 34(3), 21-24.
- TIKU A.K., BINDROO B.B., PANDIT R.K. (1987) Studies on propagation of hardwood cuttings of Kanva-2 a tropical mulberry variety in the valley of Kashmir. *Res. & Dev. Reporter*, 4(1), 85-88.
- TIKU A.K., BINDROO B.B. (1989) Propagation methods of mulberry germplasm under temperate conditions. In *Genetic Resources of Mulberry and Utilization*. pp. 87-89. Eds K. Sengupta and S.B. Dandin, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, 224 pp.
- UNIDO (1978) Project Formulation and Evaluation Series. No. 3 : Social Benefit-Cost Analysis in Developing Countries. United Nations, New York.

PRODUCTION DE MURIER DANS LES CONDITIONS SUBTROPICALES DE L'INDE : EVALUATION ECONOMIQUE

ANIL DHAR & B.B. BINDROO

Regional Sericultural Research Station, Miran Sahib, Jammu - 181 101, Inde.

On a fait appel aux techniques d'analyse des coûts et du financement de l'ONUDI pour les évaluations de projets afin d'estimer la valeur actuelle nette et le taux interne de rendement d'un modèle proposé pour la production de mûriers en pépinières « Kissans » en milieu subtropical. L'analyse révèle que, selon la technologie décrite, la production de boutures de mûrier est économiquement viable si le potentiel de survie des boutures de mûrier n'est pas inférieur à 35 % et si le coût des boutures est égal ou supérieur à 0,35 roupie (US\$ 0,01).

INTRODUCTION

La totalité de la ceinture subtropicale de l'Inde, qui comprend les Etats du Pendjab, de l'Haryana et une partie du Jammu-et-Cachemire, de l'Himachal Pradesh, de l'Uttar Pradesh et du Rajasthan, possède un immense potentiel sericole. Bien que la culture du mûrier en Inde soit maintenant bien relancée, les richesses disponibles en termes de mûrier dans les régions subtropicales se rencontrent principalement sous la forme d'arbres dispersés ou en bordure de route. Du fait de la mise en place du *National Sericulture Project* en 1989 financé par la Banque mondiale et la Banque suisse pour le développement, il est devenu impératif de développer des technologies nouvelles en particulier pour cultiver les mûriers de manière rentable.

La production de boutures de mûriers en pépinières Kissans (c'est-à-dire chez les fermiers), activité distincte du *National Sericulture Project*, a perdu de l'importance chez les fermiers en raison du manque de technologies efficaces assurant des modèles économiques détaillés viables adaptés aux climats subtropicaux. Des démarches dans cette voie ont toutefois été entreprises (Bindroo et Bhat, 1992 ; Fotedar et coll., 1995) afin de mettre au point un ensemble de mesures de production de mûriers acceptables destinés à l'utilisation directe sur le terrain dans les régions subtropicales. Dans une certaine mesure, on continue d'acheminer, depuis le sud de l'Inde, le matériel de bouturage ou de plantation de différentes variétés de mûrier destiné à la multiplication ou à la plantation dans ces régions. Bien que de nombreux travaux aient été réalisés sur la multiplication du mûrier par bouturage dans les zones tempérées et subtropicales (Bindroo et coll., 1988 ; Das et coll., 1987 ; Fotedar et coll., 1990 ; Tiku et coll., 1989), on ne dispose d'aucune information sur la rentabilité de la production de mûriers chez les fermiers dans cette région, à l'exception d'une étude de Bindroo et Bhat (1992).

Au vu de ces remarques, on a élaboré un modèle de production de boutures de mûrier à l'échelle commerciale dans les zones subtropicales de l'Inde. Le principal objectif de ce projet est de répondre à la demande croissante de boutures de mûrier dans le cadre du *National Sericulture Project* en mettant en place des pépinières pouvant être gérées de manière rentable par le fermier lui-même et dont la production pourrait être vendue directement aux personnes intéressées par la culture du mûrier.

METHODOLOGIE

L'analyse des coûts et rendements de la production de boutures de mûrier a été effectuée sur la base d'un acre (4 047 m²) de terre d'après l'ensemble des mesures recommandées pour la culture en pépinière en milieu subtropical (Bindroo et coll., 1996 ; Fotedar et coll., 1995).

L'analyse a été réalisée d'après la technique d'analyse standard d'évaluation des projets (UNIDO, 1978) en estimant la valeur actuelle nette du projet et le taux interne de rendement sur un tableur Lotus PC. A partir de données recueillies sur trois ans portant sur la faisabilité commerciale de la culture en pépinière, l'analyse a été réalisée en tenant compte du fait que, dans les régions subtropicales, les pépinières donnent deux productions par an (Fig. 1) à la mousson (juin-juillet) et en hiver (décembre-janvier), une méthode jusqu'à présent inconnue dans cette région. Les boutures de la pépinière de mousson sont prêtes à être transplantées en hiver et les boutures produites en pépinière d'hiver sont prêtes à être transplantées à la mousson. La taille basale annuelle permet de conserver le stock de matériel de bouturage produit à la mousson et la taille à la moitié des branches effectuée en décembre-janvier permet de fournir le matériel d'hiver.

Les coûts sont indiqués en monnaie indienne avec l'équivalent en US\$ entre parenthèses au taux de 32,00 roupies = 1 US\$.

ANALYSE DES COUTS

L'analyse des coûts a été réalisée selon la méthode indiquée ci-dessous :

A) Préparation de la terre :

La terre peut être préparée pendant les mois de juin et de juillet au début de la mousson et/ou au mois de décembre, ces deux périodes correspondant aux deux saisons de production en pépinière recommandées pour les régions subtropicales (Bindroo et coll., 1996). Les frais engagés s'élèvent à 10 640,00 roupies (US\$ 332,5) et couvrent, à raison de 40,00 roupies (US\$ 1,25) par jour de main-d'oeuvre, les opérations suivantes :

Activité :

- Labourage/bêchage en profondeur.
- Désherbage/nivelage et préparation des parcelles de pépinières avec des digues et des canaux.
- Application de fumier de ferme à raison de 20 tonnes par acre.
- Dernier bêchage des parcelles et mélange avec le fumier de ferme.

B) Matériel de plantation et entretien de la pépinière :

Selon ce modèle, les variétés de mûrier présentant un taux de survie de 50 % peuvent être utilisées comme matériel de plantation. En milieu subtropical, on conseille les variétés comme Chackmajra, S146 et Chinese White car le racinement de ces cultivars se situe entre 50 et 60 % en plantation. Les dépenses engagées pour la production des boutures s'élèvent à 14 860 roupies (US\$ 464,375) et couvrent les activités suivantes :

Activité :

- Transport des boutures depuis le site de prélèvement, coût du matériel inclus.
- Préparation des boutures.
- Plantation des boutures.
- Binage/désherbage en deux temps.
- Irrigation, coûts de l'électricité, du diesel et de la main-d'oeuvre inclus.
- Application d'engrais (urée à raison de 5,5 quintaux).
- Déracinement des boutures.
- Dépenses diverses, dont coût des pesticides, etc.

C) Ustensiles de jardinage :

On estime que des ustensiles de jardinage d'un coût de 10 000,00 roupies (US\$ 312,5) sont nécessaires pour un acre de terre sur une période de cinq ans. Les ustensiles sont les suivants : bêches, arrosoirs avec aspersion, pioches, fourches de jardinier, brouettes, sarcelles, etc.

Les coûts périodiques s'élèvent au total à 51 000,00 roupies (US\$ 1 593,75) pour deux saisons de culture en pépinière et les coûts non périodiques à 10 000,00 roupies (US\$ 312,5) répartis sur une période de cinq ans, mais déboursés en une seule fois.

POSTULATS FINANCIERS ET ECONOMIQUES

L'analyse financière a été calculée à raison de 0,50 roupie (US\$ 0,016) correspondant au coût d'une bouture pour une hausse annuelle de 10 %. Les points suivants ont été pris en compte lors de l'élaboration de l'ensemble des mesures :

- 1) Les salaires ont été estimés à 40 000 roupies (US\$ 1,25) sur la base des salaires moyens pratiqués dans les Etats subtropicaux de l'Inde, pour une hausse attendue de 10 % par an.
- 2) Le coût des produits chimiques, des engrais, etc. a été fixé au taux actuel compte tenu d'une hausse attendue des coûts de 10 % au cours des années de production.
- 3) L'utilisation continue des ustensiles agricoles entraîne une dépréciation de 30 % et le taux d'intérêt de l'emprunt est de 12 %.

En outre, on a également pris en compte d'autres postulats comme un taux de survie des boutures de 30 à 50 %, un prix de vente par bouture de 0,30 roupie (US\$ 0,009) à 0,50 roupie (US\$ 0,016), un taux de dépréciation de 0 à 30 % et une hausse des prix de 0 à 10 % afin d'avoir une vue d'ensemble de la rentabilité de la production de boutures de mûrier par cette méthode.

ANALYSE FINANCIERE

L'analyse des données révèle que, pour un taux de survie estimé à 50 %, on obtient une valeur actuelle nette de 122 691,00 roupies (US\$ 3 834,09) pour un taux interne de rendement de 350 %. Ceci indique que la production de boutures de mûrier selon le schéma proposé est un modèle économiquement viable. Le tableau I donne le détail du modèle proposé et comprend la mise de fonds initiale de 10 000,00 roupies (US\$ 312,5) au moment de l'achat du matériel de jardinage, le flux de fonctionnement pour une période de cinq ans incluant les bénéfices et la dépréciation des actifs. A un taux de dépréciation de 30 %, on peut escompter une valeur nette récupérée sur le matériel de jardinage de 1 681 roupies (US\$ 52,53) à la fin du projet, d'où une marge brute d'autofinancement de 51 460,00 roupies (US\$ 1 608,125) à la fin du projet si les produits de la vente des boutures s'élèvent à 124 449,00 roupies (US\$ 3 889,03). Si le taux de survie est supérieur à 32 % (Fig. 2), la production de boutures à l'échelle commerciale est économiquement faisable. Comme le montre l'analyse, pour un taux de survie des boutures de 32 %, la valeur actuelle nette du projet est de 5 000,00 roupies (US\$ 156,25) à raison d'un taux interne de rendement de 30 %. En revanche, pour un taux interne de rendement de 31 %, la valeur actuelle nette est de (-) 1 539 roupies (US\$ 48,09) et de (-) 8 007 roupies (US\$ 250,22) pour un taux interne de rendement de 30 %. On peut en conclure que l'utilisation de variétés dont le taux de survie est inférieur à 35 % pour la production de boutures en pépinière n'est pas rentable à l'échelle commerciale. A ce taux, la valeur actuelle nette du projet s'élève à environ 25 000,00 roupies (US\$ 781,25). De même, on estime que le prix de vente des boutures doit être égal ou supérieur à 0,35 roupie (US\$ 0,01) pour que la production à l'échelle commerciale soit économiquement viable. Les taux de cession inférieurs des boutures rendent le projet peu viable.

De plus, si l'on change les postulats économiques, on n'observe aucune différence pour ce qui concerne le taux interne de rendement tandis que la valeur actuelle nette du projet est fortement modifiée. Cependant, la variation des taux de dépréciation n'affecte pas de manière significative la valeur actuelle nette, comme le montre le postulat sans dépréciation. La valeur actuelle nette sera de 126 906,00 roupies (US\$ 3 965,8) contre 122 691,00 (US\$ 3 834,09) pour un taux de dépréciation de 30 %. De plus, pour un taux d'escompte du projet de 6 %, au lieu des 12 % initialement considérés, on obtient une valeur actuelle nette de 154.908 (US\$ 4 840,875) et, pour un taux d'escompte de 0 %, une valeur actuelle nette de 199 254,00 (US\$ 6 226,69).

On constate également que, si l'on part du postulat qu'il n'y a pas de hausse du coût des boutures, des salaires, des produits chimiques, etc., la valeur actuelle nette estimée est de 101 354,00 roupies

(US\$ 3 167,3). En revanche, pour une hausse de 10 % des différents composants des coûts d'exploitation (sauf le coût des boutures), la valeur actuelle nette est estimée à 69 347,00 roupies (US\$ 2 167,1). Ceci implique que le projet est rentable même si le coût des boutures reste à 0,50 roupies (US\$ 0,016) par bouture sur une période de cinq ans.

RENTABILITE

D'après l'ensemble des mesures recommandées pour la production de boutures en pépinière en milieu subtropical, on peut planter 0,2 million de boutures sur un acre de terre à espacement de 6" × 4" (15 × 10 cm) sur une saison tout en maintenant des digues et des canaux entre les parcelles de pépinière. Pour un taux de survie ne dépassant pas 50 % chez les fermiers, un acre de terre peut produire 0,1 million de boutures par saison. De plus, avec une provision de 5 % de perte des boutures au moment du déracinement et de 10 % de rejets pour les boutures malades ou de taille médiocre, on peut produire 0,17 millions de boutures saines par acre de terre et par an à raison de deux saisons de production en pépinière. A un prix de vente de 0,50 roupie (US\$ 0,016) par bouture, les recettes totales pour un acre de terre sont de 85 000,00 roupies (US\$ 2 656,25). Déduction faite des coûts périodiques s'élevant à 10 000 roupies (US\$ 312,5) sur cinq ans à raison de 2 000,00 roupies (US\$ 62,5) par an, les recettes nettes s'élèvent à 32 000 roupies (US\$ 1 000) par an.

Cette analyse révèle que la production de boutures de mûrier destinées à être plantées en arbustes est économiquement viable et faisable à l'échelle commerciale si l'on suit la technologie présentée ici, à condition que le taux de survie des boutures ne soit pas inférieur à 35 % et que le coût des boutures soit égal ou supérieur à 0,35 roupies (US\$ 0,01). Cependant, les coûts de production et l'analyse s'y rapportant peuvent varier pour ce qui concerne la production de boutures de mûrier âgées de 1 à 2 ans pour les plantations d'arbres.

ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF GUT pH IN THE OAK TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA PROYLEI* J.

R.K. PANDEY

Purvanchal Sericulture Development Project, Central Silk Board, Khajuri, Varanasi - 221010, Uttar Pradesh, India.

*The gut pH of the non-mulberry silkworm, **Antheraea proylei** J., was found to be 10.5. Since at pH values greater than 9, tannin-protein precipitation does not occur, it is inferred that alkalinity of gut reflects the adaptation of **A. proylei** to tannin content of oak (**Quercus**) leaves. Detection of tannins in the cocoon shell further corroborates that this silkworm has not only alkaline gut against oak leaf tannins, but also means to utilize leaf tannins for its own benefit.*

Keywords: *Antheraea*, tannins, pH.

Tannins have been accorded an important role in protecting plants from herbivores. Feeny (1970) proposed that most lepidopterous insects feed on *Quercus robur* early in the spring because the leaf quality declines as the growing season progresses. Based primarily on this work, Feeny (1975) and others (Rhoades and Cates, 1976) postulated a theory that long-lived plants, such as trees, have evolved 'quantitative' defenses, while short-lived, transitory plants have 'qualitative' defenses. Quantitative defenses act in a stoichiometric fashion. For example, tannins supposedly bind plant proteins and insect proteolytic enzymes, thus increasing amounts of tannins render protein less available to insect herbivores.

Tannins are considered as the ideal quantitative defense. Most of the evidence rests upon the fact that tannins are ubiquitous and abundant among apparent, woody plants. Experimental evidence for the defensive nature and mode of action of tannins is exiguous or nonexistent (Zucker, 1983). Recently, the idea that tannins are generalized defenses and are always detrimental to herbivorous insects has been challenged (Bernays, 1978; Bernays and Woodhead, 1982; Fox, 1981; Bercenbaum, 1983; Coley, 1983; Zucker, 1983). The tannin-protein complexes are stable at acidic and neutral pH levels but dissociate at higher alkaline pH (Loomis and Battaile, 1966).

In the present work, protein precipitation capacities of leaf extracts of three *Quercus* species were estimated. The level of the gut pH of the oak tasar silkworm (*Antheraea proylei*) was measured and tannins were detected in the cocoon shell.

The protein precipitation capacities of tannins were determined by using 60 mg dry leaf powder of three oak species, *Quercus leucotrichophora* A. Camus, *Q. semecarpifolia* Smith and *Q. himalayana* Bahadur, separately, using the method of Dawra *et al.* (1988).

Fifth instar larvae of *Antheraea proylei* were obtained from indoor rearing. They were processed for the estimation of pH of the haemolymph and midgut according to the procedure of Mishra and Singh (1978).

Cocoons harvested after indoor rearing as reported earlier (Pandey *et al.*, 1991) on different host plants were stifled in a hot air oven at 80 °C for 12 hr. Samples of the cocoon shell (25 mg each) were taken from two portions (outer peelable floss and inner compact portion) for determination of tannins as proanthocyanidins by addition of 3 ml of FeSO₄-butanol-HCl reagent, according to Martin and Martin (1982). These results were expressed as bisulfited quebracho equivalent.

The protein precipitation capacity of oak leaves of *Q. leucotrichophora*, *Q. semecarpifolia* and *Q. himalayana* is presented in Table I. The condensed tannins in *Q. leucotrichophora*, *Q. semecarpifolia* and *Q. himalayana* contributed 7.9, 9.0 and 17.8%, respectively, in the total protein

precipitation capacity of extracts. The protein precipitation capacity of hydrolyzable tannins was obtained by subtracting the protein precipitation capacity of condensed tannins from the total. It was observed that hydrolyzable tannins in the extracts contributed considerably toward the protein precipitation capacity of the leaf extracts.

Table I. Protein precipitation capacity of various oak species (in mg BSA precipitated/g dry wt. of leaves).

Tableau I. Capacité de précipitation des protéines chez différentes espèces de chênes (en mg SAB précipités/g de feuilles en poids sec).

<i>Quercus</i> species	Total	Condensed tannins	Hydrolyzable tannins
<i>Espèces de Quercus</i>	<i>Total</i>	<i>Tannins condensés</i>	<i>Tannins hydrolysables</i>
<i>Q. leucotrichophora</i> A. Camus	67.3	5.3	62.0
<i>Q. semecarpifolia</i> Smith	273.9	24.6	249.3
<i>Q. himalayana</i> Bahadur	30.0	5.3	24.6
LSD (0.05)	18.3	1.46	15.2

On the basis of the pH value of the midgut contents (10.5), it was found that the gut fluid of oak tasar silkworms was strongly alkaline (Table II).

Table II. pH level in the oak tasar silkworm, *Antheraea proylei*.

*Tableau II. Niveau du pH chez le ver à soie tasar du chêne, *Antheraea proylei*.*

Body portion / <i>Partie du corps</i>	pH
Haemolymph / <i>Hémolymph</i>	6.5
Midgut / <i>Intestin moyen</i>	10.5

Tannin (proanthocyanidin) content of the outer floss and inner compact cocoon layer of *A. proylei* fed on different *Quercus* species is presented in Table III. The outer floss, which anchors the cocoon shell, contained higher amounts of tannins in comparison with the inner compact layer.

The protein precipitation capacity was highest in *Q. semecarpifolia*. The difference could be attributed to species variation. This is further supported by the observation in *Q. baloot*, where protein precipitation capacity was not detectable (Pandey and Makkar, 1991). In recent years,

protein-precipitation capacity has been taken as a measure of the antinutritional properties of a tannin or a group of tannins.

Table III. Tannins in the cocoon shell of *Antheraea proylei*.

Tableau III. Tannins dans la coque soyeuse d'*Antheraea proylei*.

Fed on	Tannins* ($\mu\text{g}/25 \text{ mg dry cocoon shell}$)	
	Outer floss	Inner reelable cocoon shell
Nourriture	Tannins* ($\mu\text{g}/25 \text{ mg de coque sèche}$)	
	Blaze externe	Coque interne dévidable
<i>Q. leucotrichophora</i>	66.01 ± 26.96	31.02 ± 12.86
<i>Q. semecarpifolia</i>	36.39 ± 9.94	0.56 ± 1.94
<i>Q. himalayana</i>	34.28 ± 10.09	1.25 ± 0.58
<i>Q. acutissima</i>	28.54 ± 12.06	0.39 ± 0.10

* Tannins were estimated in the cocoon shell as proanthocyanidins (bisulfited quebracho equivalent).

* Les tannins de la coque soyeuse ont été estimés sous la forme de proanthocyanes (en équivalent quebracho bisulfité).

The objective of this study was to ascertain whether the conditions that prevail in the gut fluid of oak tasar silkworms favor or disfavor the formation of insoluble complexes between proteins and tannins. Alkaline pH of the gut fluid clearly indicates that conditions are unfavorable for the formation of such complexes in view of previous investigations of Martin *et al.* (1985) who suggested that an elevated midgut pH may be an antitannin adaptation.

The work of Feeny on the winter moth (*Operophtera brumata*) shows an adverse effect from tannins extracted from autumn oak leaves and added to an artificial diet (Feeny, 1968). Tannins were considered by Feeny (1976) to be quantitative plant defenses, always seriously affecting growth in a dosage-dependent manner through their generalized antidigestive action. An assumption of this thesis is that insects are unlikely to have evolved any mechanism to counter this. But the response of the oak tasar silkworm (*A. proylei*) is quite different. It would presumably be advantageous for phytophagous insects exposed to leaf tannins to maintain alkaline pH levels in the gut. Results of the present work suggest that larvae *A. proylei* do exactly what is expected of them. In view of the occurrence of tannins in the cocoon shell of *A. proylei*, it seems reasonable to conclude that alkalinity in the larval midgut reflects adaptation of *A. proylei* to tannin content of oak leaves.

REFERENCES

- BERENBAUM M. (1983) Effect of tannins on growth and digestion in two species of papilionids. Ent. Exp. Appl., 34, 245-250.
 BERNAYS E.A. (1978) Tannins: an alternative viewpoint. Ent. Exp. Appl., 24, 44-53.
 BERNAYS E.A., WOODHEAD S. (1982) Incorporation of dietary phenols into the cuticle in the tree locust, *Anacridium melanorhodon*. J. Insect Physiol., 28(7), 601-606.

- COLEY P.D. (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, 53, 209-229.
- DAWRA R.K., MAKKAR H.P.S., SINGH B. (1988) Protein-binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochemistry*, 170, 50-53.
- FEENY P. (1968) Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth, *Operophtera brumata*. *J. Insect Physiol.*, 14, 805-817.
- FEENY P. (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51, 565-582.
- FEENY P. (1976) Plant apparency and chemical defense. *Rec. Adv. Phytochem.*, 10, 1-40.
- FOX L.R. (1981) Defense and dynamics in plant-herbivore systems. *Amer. Zool.*, 21, 853-864.
- LOOMIS W.D., BATTAILE J. (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.*, 5, 423-438.
- MARTIN J.S., MARTIN M.M. (1982) Tannin assays in ecological studies: lack of correlation between phenolics, proanthocyanidins and protein precipitating constituents in mature foliage of six oak species. *Oecologia (Berl.)*, 54, 205-211.
- MARTIN M.M., ROCKHOLM D.C., MARTIN J.S. (1985) Effects of surfactants, pH and certain cations on precipitation of proteins by tannins. *J. Chemical Ecology*, 11, 485-494.
- MISHRA S.C., SINGH P. (1978) Polysaccharide digestive enzymes in the larvae of *Stromatium barbatum* (Fabr.); a dry wood borer (Coleoptera: Cerambycidae). *Material u. organismen*, 13, 115-122.
- PANDEY R.K., MAKKAR H.P.S. (1991) Variation of tannins in oak leaves. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 187, 392-394.
- PANDEY R.K., NOAMANI M.K.R., DAS P.K., THANGAVELU K. (1991) Advances in oak tasar rearing technology. *Indian Silk*, 30(5), 35-38.
- RHOADES D.F., CATES R.G. (1976) Toward a general theory of plant and antiherbivore chemistry. *Rec. Adv. Phytochem.*, 10, 168-213.
- ZUCKER W.F. (1983) Tannins does structure determine function? an ecological perspective. *Am. Nat.*, 121, 335-365.

SIGNIFICATION DE L'ADAPTATION DU pH DE L'INTESTIN CHEZ LE VER A SOIE TASAR, *ANTHERAEA PROYLEI* J.

R.K. PANDEY

Purvanchal Sericulture Development Project, Central Silk Board, Khajuri, Varasani - 221010, Uttar Pradesh, Inde.

*Le pH de l'intestin de l'insecte séricigène non mirier **Antheraea proylei** J. est de 10,5. Etant donné qu'il n'y a pas de précipitation protéines-tannins lorsque la valeur du pH dépasse 9, on peut penser que l'alcalinité de l'intestin reflète l'adaptation d'**A. proylei** à la teneur en tannins des feuilles de chêne (**Quercus**). En outre, la présence de tannins dans la coque soyeuse confirme que cet insecte séricigène non seulement possède un intestin alcalin pour se protéger des tannins des feuilles de chêne mais qu'il utilise également les tannins foliaires pour son propre bénéfice.*

On pense que les tannins jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les herbivores. Feeny (1970) a suggéré que la plupart des lépidoptères se nourrissent avec *Quercus robur* au début du printemps car la qualité de la feuille diminue à mesure que la saison avance. Sur la base de ces travaux, Feeny (1976) et d'autres chercheurs (Rhoades et Cates, 1976) ont émis une théorie selon laquelle les plantes vivaces, comme les arbres, ont développé des défenses « quantitatives » tandis que les plantes à vie courte, ou éphémères, possèdent des défenses « qualitatives ». Les défenses quantitatives agissent de manière stœchiométrique. Par exemple, les tannins sont supposés fixer les protéines des plantes et les enzymes protéolytiques des insectes, ainsi l'augmentation des tannins rend les protéines moins accessibles aux insectes herbivores.

Les tannins sont considérés comme des défenses quantitatives idéales. Cette hypothèse est principalement basée sur le fait que les tannins sont ubiquistes et qu'ils sont présents en abondance chez les plantes ligneuses. Les études expérimentales sur la nature défensive et sur le mode d'action des tannins sont rares ou inexistantes (Zucker, 1983). Récemment, l'idée selon laquelle les tannins sont des défenses généralisées et sont toujours nocifs aux insectes herbivores a été remise en question (Bernays, 1978 ; Bernays et Woodhead, 1982 ; Fox, 1981 ; Berenbaum, 1983 ; Coley, 1983 ; Zucker, 1983). Les complexes tannins-protéines sont stables à des niveaux de pH acide et neutre mais se dissocient lorsque l'alcalinité du pH est élevée (Loomis et Battaile, 1966).

Dans cette étude, on a estimé la capacité de précipitation des protéines d'extraits foliaires de trois espèces de *Quercus*. Le niveau du pH de l'intestin du ver à soie tassar (*Antheraea proylei*) a été mesuré et les tannins ont été détectés dans la coque soyeuse.

La capacité de précipitation des protéines de tannins a été déterminée en utilisant 60 mg de poudre de feuilles séchées issues de trois espèces de chêne (*Quercus leucotrichophora* A. Camus, *Q. semecarpifolia* Smith et *Q. himalayana* Bahadur) séparément suivant la méthode de Dawra et coll. (1988).

Les larves du cinquième âge d'*Antheraea proylei* proviennent d'un élevage en intérieur. Elles ont été traitées pour l'estimation du pH de l'hémolymphe et de l'intestin moyen selon le protocole de Mishra et Singh (1978).

Les cocons récoltés après élevage en intérieur selon la méthode décrite précédemment (Pandey et coll., 1991) sur différentes plantes hôtes ont été étouffés dans un four à air chaud à 80 °C pendant 12 heures. Les échantillons de coque soyeuse (25 mg chacun) ont été prélevés sur deux portions (blaze détachable externe et couche compacte interne) afin de déterminer les tannins sous forme de

proanthocyanes par addition de 3 ml d'un réactif FeSO_4 -butanol-HCl, selon la méthode de Martin et Martin (1982). Les résultats obtenus ont été exprimés en équivalents quebracho bisulfaté.

La capacité de précipitation des protéines de feuilles chez *Q. leuchotrichophora*, *Q. semecarpifolia* et *Q. himalayana* est présentée dans le tableau I. Les tannins condensés chez *Q. leuchotrichophora*, *Q. semecarpifolia* et *Q. himalayana* contribuent respectivement à raison de 7,9, 9,0 et 17,8 % à la capacité totale de précipitation des protéines de l'extrait. La capacité de précipitation des protéines par les tannins hydrolysables a été déterminée en déduisant la capacité de précipitation des protéines des tannins condensés du total. Les tannins hydrolysables des extraits contribuent fortement à la capacité de précipitation des protéines des extraits foliaires.

D'après la valeur du pH de l'intestin moyen (10,5), le liquide intestinal s'avère fortement alcalin (Tableau II).

La teneur en tannins (proanthocyanes) de la blaze externe et de la couche compacte interne du cocon d'*A. proylei* nourri avec différentes espèces de *Quercus* est présentée dans le tableau III. La blaze externe, qui fixe la coque soyeuse, contient davantage de tannins que la couche compacte interne.

La capacité de précipitation des protéines est maximale avec *Q. semecarpifolia*. Cette différence pourrait être attribuée à des variations entre les espèces. Ceci est confirmé par les observations réalisées sur *Q. baloot* chez lequel la capacité de précipitation des protéines n'est pas détectable (Pandey et Makkar, 1991). Depuis quelques années, la capacité de précipitation des protéines est utilisée comme mesure des propriétés antinutritionnelles d'un tannin ou d'un groupe de tannins.

Cette étude a pour objet de déterminer si les conditions du liquide intestinal du ver à soie tasar favorisent ou défavorisent la formation de complexes insolubles entre les protéines et les tannins. L'alcalinité du pH du liquide intestinal indique clairement que les conditions sont défavorables à la formation de ce type de complexe au vu des études de Martin et coll. (1985) qui ont suggéré que l'augmentation du pH dans l'intestin pourrait être une adaptation contre les tannins.

Les travaux de Feeny sur la phalène d'hiver (*Operophtera brumata*) montrent que les tannins extraits des feuilles de chêne d'automne ajoutées à un aliment artificiel ont un effet négatif (Feeny, 1968). Feeny (1976) estime que les tannins sont des défenses quantitatives des plantes qui affectent toujours fortement la croissance de façon dose-dépendante par leur action généralisée contre la digestion. L'une des implications de cette hypothèse est qu'il est peu probable que les insectes aient développé un mécanisme pour contrer cette action. Cependant, la réponse du ver à soie tasar (*A. proylei*) est tout à fait différente. On suppose qu'il serait profitable pour les insectes phytophages exposés à des tannins foliaires de maintenir des niveaux de pH alcalins dans l'intestin. Les résultats de l'étude présentée ici suggèrent que les larves d'*A. proylei* réagissent selon cette prévision. Etant donné la présence de tannins dans la coque soyeuse d'*A. proylei*, il semble raisonnable de penser que l'alcalinité de l'intestin larvaire reflète l'adaptation d'*A. proylei* à la teneur en tannins des feuilles de chêne.

SEED MYCOFLORA OF MULBERRY

D.S. CHANDRASHEKAR & H. SHEKAR SHETTY

Seed Pathology Laboratory, Department of Studies in Applied Botany, University of Mysore,
Manasagangothri, Mysore - 570 006, India.

Keywords: Mulberry, seed mycoflora, standard blotter method.

Mulberry (*Morus alba* L.) is an important cash crop grown for its foliage which provides food for the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.). The crop is attacked by a number of diseases (Anonymous, 1985). Some seed-borne diseases of mulberry are reported, i.e., popcorn disease (*Ciboria carunculoides*), scerotium disease (*Sclerotinia shiraianum*), which are found on fruits and they are not necessarily seed-transmitted (Richardson, 1993). The poor germination and occurrence of abnormal seedlings cause a considerable loss in the genetic material for the plant breeders (Rao, 1939). However, very little work has been done on the seed mycoflora of mulberry. As such, mulberry is propagated by vegetative means and by employing grafts. The present investigations were undertaken to study the seed-borne mycoflora of this crop and to understand its pathogenic potential.

Seed samples of the most popular variety, Kanva 2 (or M5), were collected from the Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Salem (Tamil Nadu), during February 1993. The seed mycoflora was detected by employing the standard blotter method (Rao, 1939). Two hundred seeds of each species were plated at the rate of 25 seeds per plate and were incubated as per the standard technique (Anonymous, 1985). To detect the seed-borne mycoflora, seeds were surface-sterilised for 5 minutes in 0.2% sodium hypochlorite. The unsterilised seeds were also kept for the detection of mycoflora on the standard blotter method. Various fungi associated with the seeds were detected on the twelfth day of incubation with the help of a stereo-binocular microscope. The fungal identity was confirmed by compound microscope and relevant key books.

In all, 12 fungal species belonging to 7 different genera were recorded, among which a few of them are represented in Fig. 1. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Cercospora moricola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma* sp., *Cladosporium cladosporioides* and *Bipolaris halodes* were common in surface-sterilised seeds. The incidence of mycoflora was greater in unsterilised seeds. Among the different fungi isolated, the association of *Curvularia lunata* with *Aspergillus* sp. was found among the samples. The plumule and the radicle of the emerging seedling showed the presence of *Lasiodiplodia theobromae*. The present work will throw light on the understanding of seed mycoflora in relation to the germination and seedling production of mulberry.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1985) International rules for seed testing. Seed Sci. and Technol., 13, 299-355.
NEERGAARD P. (1977) Seed Pathology. Vol. 1, McMillan Press Pvt. Ltd., England.
RAO B.V. (1939) The biology of mulberry seeds. Paper read at All India Seric. Conference.
RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R.,
JOLLY M.S. (1976) Sericultural Manual. Vol. 1: Mulberry Cultivation. FAO Agricultural Services Bull., 15, 150 pp.
RICHARDSON M.J. (1993) An Annotated List of Seed-Borne Diseases. Pub. ISTA, Switzerland.

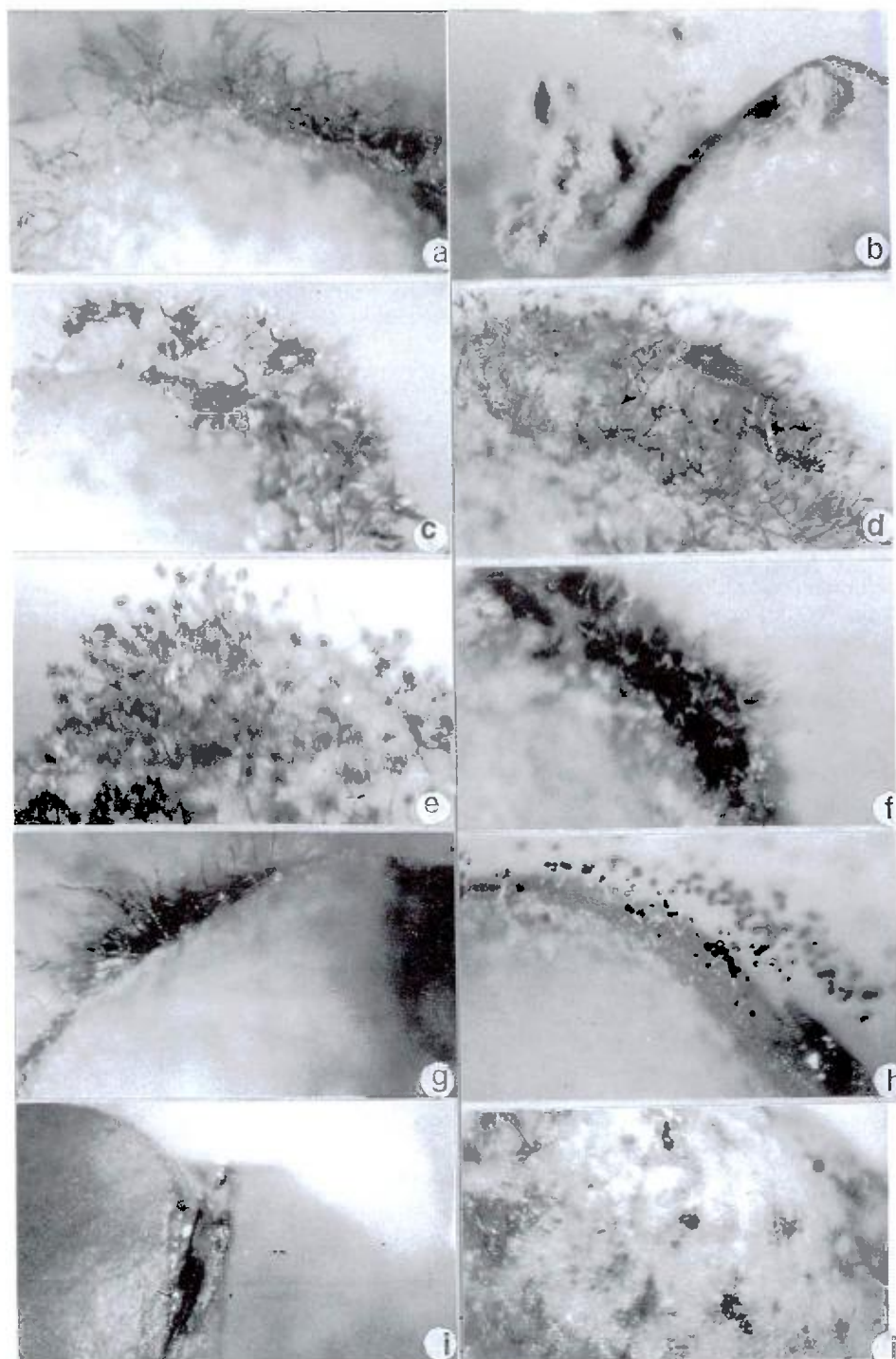


Fig. 1:

a: *Alternaria alternata*. **b:** *Aspergillus flavus*. **c:** *Bipolaris halodes*. **d:** *Bipolaris* sp. **e:** *Curvularia lunata*. **f:** *Cercospora moricola*. **g:** *Cercospora* sp. **h:** *Aspergillus niger*. **i:** seed emergence is affected by rotting of radicle / le pourrissement du radicule affecte l'émergence des graines. **j:** *Phoma* sp.

FLORE MYCOLOGIQUE DES GRAINES DE MURIER

D.S. CHANDRASHEKAR & H. SHEKAR SHETTY

Seed Pathology Laboratory, Department of Studies in Applied Botany, University of Mysore,
Manasagangothri, Mysore - 570 006, Inde.

Le mûrier (*Morus alba* L.) est une culture de rapport importante pour son feuillage qui constitue la nourriture du ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.). Cette culture est sensible à un certain nombre de maladies (Anonyme, 1985). Certaines maladies sont portées par les graines de mûrier comme la maladie du pop-corn (*Ciboria carunculoides*) ou le sclérotium (*Sclerotinia shiraiianum*) qui se trouvent sur les fruits et ne sont pas forcément transmis par les graines (Richardson, 1993). Une germination médiocre et la présence de semis anormaux occasionnent des pertes considérables au niveau du matériel génétique nécessaire aux techniciens qui sélectionnent les plantes (Rao, 1939). Cependant, on dispose de très peu d'informations sur la flore mycologique des graines de mûrier. Actuellement, le mûrier est reproduit par des méthodes végétatives et par greffage. Cette étude a été entreprise afin d'étudier la flore mycologique portée par les graines chez cette culture et de comprendre leur potentiel pathogène.

Les échantillons de graines de Kanva 2 (ou M5), variété la plus couramment utilisée, ont été fournis par la *Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board*, de Salem (Tamil Nadu) en février 1993. La flore mycologique des graines a été détectée en employant la méthode de buvardage standard (Rao, 1939). Deux cent graines de chaque espèce ont été déposées sur des plaques à raison de 25 graines par plaque et incubées selon la méthode standard (Anonyme, 1985). Pour détecter la flore mycologique, les graines ont été stérilisées en surface pendant 5 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 0,2 %. Des graines non stérilisées ont également été utilisées pour détecter la flore mycologique selon la méthode de buvardage standard. Après 12 jours d'incubation, plusieurs champignons associés aux graines ont été détectés à la loupe binoculaire. L'identité des champignons a été confirmée au microscope et à l'aide des ouvrages de références appropriés.

Au total, douze espèces fongiques appartenant à sept genres différents ont été identifiées. Parmi celles-ci, un certain nombre d'entre elles sont présentées dans la figure 1. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Cercospora moricola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma*, *Cladosporium cladosporioides* et *Bipolaris halodes* sont présents en abondance chez les graines stérilisées en surface. L'incidence de la flore mycologique est plus élevée chez les graines non stérilisées. Parmi les différents champignons isolés, on a relevé une association entre *Curvularia lunata* et *Aspergillus* dans les échantillons. Les gemmules et les radicules des semis émergés montrent la présence de *Lasiodiplodia theobromae*. Cette étude permettra de mieux comprendre la relation entre la flore mycologique des graines et la germination et la production de semis chez le mûrier.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	168
General sericulture	
Mûrier	171
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	175
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	180
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	182
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	186
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	192
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	194
Silkworms: silk glands	
Soie	195
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

Status of Japanese silk industry.

Statut de l'industrie de la soie japonaise.

ANONYME

1997 Indian Silk, Vol. 35(11), 39-40. (E)

Physico-chemical properties of soils from major sericultural areas of Kolar and Bangalore districts, Karnataka, India.

Propriétés physico-chimiques des sols des principales régions séricicoles des districts de Kolar et de Bangalore, Karnataka, Inde.

BONGALE U.D., SIDDALINGASWAMY N.

Karnataka State Sericulture Res. and Development Inst., Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 152-154. (E)

India - The sericulture project.

Inde - Le projet séricicole.

CREEVEY L.E.,

1996 in "Changing women's lives and work", Intermediate Technology Publications Ltd, London, United Kingdom, 110-131. (E)

Intercropping for profitable sericulture in Purvanchal.

Culture alternée pour une sériciculture rentable au Purvanchal.

GARGI, SHUKLA P., KUMAR D., KUMAR R., PANDEY R.K.

PSDP, Central Silk Board, Varanasi, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(11), 31-32. (E)

Progress and prospect of sericulture in Guangdong.

Progrès et perspective de la sériciculture au Guangdong.

HUANG X.G., MAO K.Z., HUO Y.K.

Guangdong Silk Corp. (Group), 198 Dong Feng Road West, Guangzhou 510 180, P.R. China.

1997 Indian Silk, Vol. 35(10), 39-41. (E)

Input delivery system in sericulture - An empirical study in Karnataka.

Système de répartition des frais en sériciculture - Une étude empirique au Karnataka.

JAYARAM H. *et al.*

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 117-121. (E)

***Bacillus thuringiensis* as a bio-insecticide - a threat ?**

Bacillus thuringiensis comme bio-insecticide - une menace ?

JYOTHI N.B., PATIL C.S.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(12), 11-12. (E)

Solar gadgets for silk industry.

Dispositifs solaires pour l'industrie de la soie.

KUMAR V.J.F.

Tamil Nadu Agril University, Coimbatore, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(8-9), 25-28. (E)

Economic issues of production of mulberry cocoon in Tanil Nadu - A micro economic study.

Débouchés économiques de la production des cocons de mûrier au Tamil Nadu - Une étude micro économique.

LAKSHMANAN S. *et al.*

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 128-131. (e)

Tamil Nadu: labour composition in sericulture.

Tamil Nadu : répartition du travail en sériciculture.

LAKSHMANAN S., GANAPATHY RAO R., JAYARAM H., GEETHA DEVI R.G.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(12), 19-21. (E)

Women in sericulture : an analysis.

Les femmes dans la sériciculture : une analyse.

LAKSHMI RAJU D., NATARAJU M.S., NIRANJANAMURTHY.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(8-9), 31-34. (E)

Bivoltine sericulture at higher altitudes : potentials.

Sériciculture bivoltine en altitude : les potentiels.

MAHADEVAPPA, RAJU P.J., DANDIN S.B.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute Sub-Station, B.R. Hills, Karnataka, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(12), 8-10. (E)

Scope for new commercial products from sericulture.

Possibilités pour de nouveaux produits commerciaux issus de la sériciculture.

MAJUMDER S.K.

UN University, CFRTI, Mysore, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(12), 13-18. (E)

Silk industry of Assam.

Industrie de la soie en Assam.

MISHRA S.N.

DCTC, Sualkuchi, Kamrup, Assam, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(10), 22-26. (E)

Tasar trade in ancient and medieval Orissa.

Commerce du tasar dans l'Orissa ancien et médiéval.

PATRO K.B.G.

Koraput and N.K. Textiles, Directorate of Textiles, Bhubaneswar, Orissa, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(12), 36. (E)

Cocoon 'Pelade' for better health.

"Pelade" des cocons pour une meilleure santé.

RAMAKANTH, ANANTHA RAMAN K.V.

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

1997 Indian Silk, Vol. 35(8-9), 35. (E)

Infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*, in northern districts of Karnataka, India.

Flacherie infectieuse du ver à soie *Bombyx mori* dans les districts du nord du Karnataka, Inde.

SANAKAL R.D. *et al.*

Post-graduate Department of Studies and Research in Sericulture, Karnatak University, Dharward 580 003, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 90-94. (E)

Manual silk reeling in India.

Dévidage manuel de la soie en Inde.

SHEKAR P.

1995 in "Do it herself: women and technical innovation", Appleton H. ed., IT Publications Ltd, London, United Kingdom, 207-230. (E)

Education and development of sericulture.

Education et développement de la sériciculture.

SUMAN CHANDRA.

National Institute of Rural Development, Hyderabad, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(10), 30-34. (E)

Yield gap studies in Andhra Pradesh.

Etudes de la baisse des rendements en Andhra Pradesh.

VEERESHAM K., SHIVAKUMAR G.R., MAGADUM S.B., DATTA R.K.*

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

1997 Indian Silk, Vol. 35(8-9), 14-16. (E)

Mûrier

Mulberry

Occurrence of a new distributional range of *Morus laevigata* Wall. and its variants in south India.

Présence d'un nouveau domaine de distribution de *Morus laevigata* Wall. et ses variants dans le sud de l'Inde.

DAYAKAR YADAV B.R., PAVAN KUMAR T.

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur 635 109, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 163-164. (E)

Exploitation of mulberry genotypes for drought resistance potential.

Exploitation des génotypes de mûrier pour leur potentiel de résistance à la sécheresse.

DORCUS D., VIVEKANANDAN M.

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

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(2), 71-80. (E)

Components of the root bark of *Morus cathayana*. 1. Structures of five new isoprenylated flavonoids, sanggenos A-E and a diprenyl-2-arylbenzofuran, mulberrofuran V.

Composants de l'écorce des racines de *Morus cathayana*. 1. Structures de cinq nouveau flavonoïdes isoprénylés, sanggenos A-E et un diprényl-2-arylbenzofurane, mulberrofurane V.

FUKAI T., PEI Y.H., NOMURA T., XU C.Q., WU L.J., CHEN Y.J.

1996 *Heterocycles*, Vol. 43(2), 425-436. (E)

Moisture loss differences in mulberry varieties.

Différences de perte d'humidité selon les variétés de mûrier.

GOKHALE S.B., KULKARNI P.K., DUSANE S.E., HALBE S.C., BABAR S.B.

Central Research Station, BAIF, Urulikanchan, Pune, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(8-9), 17-20. (E)

The breeding of a new mulberry variety Nongsang-10.

Sélection d'une nouvelle variété de mûrier Nongsang-10.

JI D., LIN S., WU Y., LU Z., WANG P., ZHOU J., ZHOU Q.

Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 1-4. (C,e)

Mulberry productivity of soils in relation to their parent materials in Kumamoto Prefecture.

Productivité en mûriers des sols en relation avec leurs parents dans la préfecture de Kumamoto.

KAMIMURA C.

Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, 3801 Sakae, Koshi-machi, Kikuchi-gun, Kumamoto 861-11, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(2), 81-91. (J,e)***Effects of plant growth steroid brassinolide on dry-weight growth and nutrient translocation in mulberry shoots.**

Effets du stéroïde de croissance végétale, la brassinolide, sur la croissance en poids sec et la translocation des éléments nutritifs dans les pousses de mûrier.

KUNO K.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8, Saiwaicho, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(1), 57-58. (E)***Effect of cadmium, thallium, selenium and tellurium on the growth of mulberry callus.**

Effet du cadmium, du thallium, du sélénium et du tellurium sur la croissance des cals de mûrier.

KUNO K., ASAI S.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(1), 54-56. (J)***Pruning of mulberry for economic leaf yields under hills conditions.**

Taille des mûriers pour les rendements économiques en zone de montagne.

MASILAMANI S., NAGARAJ B., THIAGARAJAN V.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Coonoor, India.

*1996 Indian Farming, Vol. 46(3), 17-20. (E)***Drought tolerance is partly related to amino acid and ammonia assimilation: a comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity.**

La tolérance à la sécheresse est en partie liée à l'assimilation des acides aminés et de l'ammoniaque : une étude comparative chez deux génotypes de mûriers différant dans leur sensibilité à la sécheresse.

RAMANJULU S., SUDHAKAR C.

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

*1997 Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology, Vol. 116(2), 243-256. (E)***Response of mulberry (*Morus alba*) to plant growth-regulators.**Réponse du mûrier (*Morus alba*) aux régulateurs de croissance des végétaux.

SETUA M., DAS C., MANDAL B.K., GHOSH D.C., SEN S.K.

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

*1996 Indian Journal of Agricultural Sciences, Vol. 66(7), 434-436. (E)***Thermotherapy for eradication of *Meloidogyne incognita* infecting mulberry (*Morus alba* L.).**Thermothérapie pour l'éradication de *Meloidogyne incognita* infestant le mûrier (*Morus alba* L.).

SHARMA D.D., GOVINDAIAH.

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

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 142-143. (E)

Studies on the constituents of *Broussonetia* species. 1. Two new pyrrolidine alkaloids, broussonetines C and D, as beta-galactosidase and beta-mannosidase inhibitors from *Broussonetia kazinoki* SIEB.

Etudes des constituants des variétés de *Broussonetia*. 1. Deux nouveaux alcaloïdes de pyrrolidine, les broussonetines C et D, utilisées comme inhibiteurs de beta-galactosidase et de beta-mannosidase provenant de *Broussonetia kazinoki* SIEB.

SHIBANO M., KITAGAWA S., KUSANO G.*

* Osaka University of Pharmaceutical Science, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 56911, Japan.

1997 *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 45(3), 505-508. (E)

***In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against mulberry leaf spot pathogen, *Cercospora moricola*.**

Antagonisme *in vitro* des espèces de *Trichoderma* contre le pathogène des taches des feuilles du mûrier, *Cercospora moricola*.

SHIVAPRATAP H.R., TOMY PHILIP, SHARMA D.D.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 107-110. (E)

Fertigation in mulberry.

"Fertigation" chez le mûrier.

SHIVASHANKAR K., SHIVAKUMAR H.R.

University of Agricultural Science, GKVK, Bangalore 560 065, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(10), 5-7. (E)

Effect of *Cercospora moricola* on the leaf quality in mulberry.

Effet de *Cercospora moricola* sur la qualité des feuilles de mûrier.

SRIKANTASWAMY K., GOVINDALAH, REDDY M.M., BAJPAI A.K., RAVEESHA K.A.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 144-146. (E)

Soil and leaf nutrients status of mulberry gardens as influenced by irrigation from sewage and borewell water.

Etat du sol et des nutriments des feuilles dans les mûraies irriguées par l'eau des épandages et des puits forés.

SUBBARAYAPPA C.T., BONGALE U.D., DANDIN S.B.

Karnataka State Sericultural Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 147-149. (E)

Studies on the induction of tetraploid mulberry with colchicine treatment.

Etudes sur l'induction des mûriers tétraploïdes par traitement à la colchicine.

SUN R. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 55-56. (C)

Genotypic differences in response to *in vitro* shoot development of mulberry (*Morus* spp.).

Différences génotypiques en réponse au développement *in vitro* des pousses de mûrier (*Morus* spp.).

TEWARY P.K., RAGUNATH M.K., VANKATESWARLU M., SARKAR A.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 104-106. (E)

Management of mulberry diseases.

Gestion des maladies du mûrier.

TOMY PHILIP.

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

*1997 Indian Silk, Vol. 35(11), 12-14. (E)***Screening of some promising genotypes of mulberry for leaf spot and rust resistance.**

Examen de quelques genotypes prometteurs de mûrier résistant aux tâches des feuilles et à la rouille.

TOMY PHILIP, SARKAR A., GOVINDAIAH

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

*1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 158-159. (E)***The design of bush belts with equal altitude and the development of mulberry cultivation technique for it.**

La formation en couronne de rameaux et le développement d'une technique culturale du mûrier.

XIAO X. *et al.**1997 Canye Kexue, Vol. 23(1), 53-54. (C)***Using entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* for control of mulberry longicorn *Apriona germari* Hope.**Utilisation du nématode entomopathogène *Heterorhabditis bacteriophora* pour la lutte contre le longicorne du mûrier *Apriona germari* Hope.XU J. *et al.*

Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China.

*1997 Canye Kexue, Vol. 66(1), 5-9. (C,e)***Identification of isofucosterol in mulberry leaves, *Morus alba*.**Identification de l'isofucostérol dans les feuilles de mûrier *Morus alba*.

YAMAZAKI M., NAKAMURA N., KURIOKA A.

Silk Science Research Institute, Dainippon Raw Silk Foundation, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(2), 136-137. (E)***The mode of hibernation of mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* Hope in Korea.**Le mode d'hibernation du longicorne du mûrier *Apriona germari* Hope en Corée.

YOON H.J., MAH Y.I., PARK I.G., LEE S.B., YANG S.Y.

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(2), 128-131. (E)***Preliminary study on mulberry whitefly *Pealius mori* Takahashi.**Etude préliminaire sur la mouche blanche du mûrier *Pealius mori* Takahashi.

YU H., GAO Z., WU X., ZHAO G.

Department of Plant protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

*1997 Canye Kexue, Vol. 23(1), 10-13. (C,e)***Study on mulberry root distribution and water and soil conservation character.**

Etude sur la distribution des racines du mûrier, la conservation de l'eau et des caractères du sol.

ZHANG G. *et al.**1997 Canye Kexue, Vol. 23(1), 59-60. (C)***Studies on loss caused by the 2nd generation mulberry pyralid moth and quota for its control.**

Études sur les dégâts causés par la deuxième génération des papillons de la pyrale du mûrier.

ZHOU L.

1997 Canye Kexue, Vol. 23(1), 62-63. (C)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Génétique moléculaire de *Bacillus thuringiensis*.

Molecular genetics of *Bacillus thuringiensis*.

AGAISSE H., LERECLUS D.

Unité de Biochimie microbienne CNRS URA 1300, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

1996 *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 7(4), 261-269. (F)

Silkworm rearing: cool steps in hot summer.

Elevage des vers à soie : des mesures rafraichissantes contre la chaleur de l'été.

BENCHAMIN K.V.

Regional Sericultural Research Station, Kodathi, Bangalore, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(11), 21-23. (E)

Effect of foliar application of micronutrients to mulberry on the quality of bivoltine cocoon and silk.

Effet de l'application foliaire sur le mûrier de micronutriments sur la qualité des cocons bivoltins et de la soie.

BOSE P.C., MAJUMDER M.K.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 11-113. (E)

Uzifly control: Use of bleaching powder solution: field impact.

Lutte contre la mouche uzi : Utilisation d'une solution de javel : impact sur le terrain.

CHAKRABORTY N., GUPTA S.K., PRASAD B.C., SANTHAKUMAR M.V., SEN S.K.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(8-9), 5-9. (E)

Bio-assay moulting response of silkworm *Bombyx mori* L. in relation to leaf nutritive constituents in mulberry (*Morus* spp.) genotypes.

Comportement de mue du ver à soie *Bombyx mori* L. en fonction des composants nutritifs des feuilles du mûrier (*Morus* spp.).

CHALUVACHARI, BONGALE U D

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560 062, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 160-162. (E)

Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation in mulberry under different levels and sources of phosphorus on silkworm growth, cocoon yield and quality.

Effet de l'inoculation de mycorhize arbusculaire vésiculaire chez le mûrier à différents niveaux et avec différentes sources de phosphore sur la croissance du ver à soie, le rendement et la qualité des cocons.

FATHIMA P.S., DAS P.K., KATIYAR R.S., HIMANTHRAJ M.T., PALLAVI S.N.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 99-103. (E)

Study and development of artificial feed mixes for silkworms. II. Performance traits during first instar.

Etude et développement de préparation d'aliment artificiel pour les vers à soie. II. Caractères de performance au cours du cinquième âge larvaire.

GENOVA E.

Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(4), 64-69. (Bg,r,e)

Suppression of enveloped virus production with a substance from silkworm faeces.

Suppression de la production de virus enveloppé avec une substance provenant des fèces de ver à soie.

HIRAKI A., IKUNO Y., KIM J., UEDA S.

Institute of Molecular and Cellular Biology for Pharmaceutical Science, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan.

1996 *Cell Structure and Function*, Vol. 21, 501-514. (E)

Breeding of Kumokjam, an artificial diet adaptable silkworm variety, for spring rearing season.

Sélection de Kumokjam, une variété de ver à soie adaptable à l'aliment artificiel, pour les élevages de printemps.

HONG K.W. *et al.*

National Sericultural and Entomology Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

1996 *RDA Journal of Agricultural Science (Korea Republic)*, Vol. 38(2), 801-805. (Ko,e)

Isolation of *Bacillus thuringiensis* from diseased larvae of Gypsy moth (*Lymantria dispar*).

Isolement de *Bacillus thuringiensis* à partir de larves malades du papillon Gypsy (*Lymantria dispar*).

IZADYAR S., AMISADEGHI S.

Plant Pests and Diseases Research Institute, Tehran, Iran Islamic Republic.

1995 *Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress, 2-7 September 1995, Karadj, Iran Islamic Rep.*, 265. (Fa,e)

Low-cost incubation chamber for sericulture unit.

Enceintes d'incubation à coût faible pour les unités séricicoles.

JAGADEESHWAR R., SINGH K.A.

Krishi Vigyan, Andhra Pradesh Agricultural University, Warangal, India.

1996 *Indian Farming*, Vol. 46(3), 13,15,30. (E)

La lutte bactériologique contre les insectes : une vieille histoire très actuelle.

Bacteriological control of insects: a very present old story.

LECADET M.M.

Unité des Bactéries entomopathogènes, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

1996 *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 7(4), 207-216. (F)

Breeding of a new silkworm variety Tai.Feng × Xiao.Hui.

Obtention d'une nouvelle variété de ver à soie Tai.Feng × Xiao.Hui.

LIU Q., MU Z., LIU X.

Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 20-23. (C,e)

Correlation between various nutritional parameters of silkworm, *Bombyx mori* L. during V instar.

Corrélation entre divers paramètres nutritionnels du ver à soie *Bombyx mori* L. au cours du 5^e âge larvaire.

MAGADUM S.B., REMADEVI O.K., DATTA R.K., SHIVASHANKAR N.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 138-141. (E)

Nutritional indices in some bivoltine breeds of silkworm, *Bombyx mori* L.

Index nutritionnels chez quelques souches bivoltines du ver à soie *Bombyx mori* L.

MAGADUM S.B., REMADEVI O.K., SHIVASHANKAR, DATTA R.K.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 95-98. (E)

Use of mathematical prognostication in the choice of initial forms for development of tetrahybrids of the silkworm (*Bombyx mori* L.)

Utilisation du pronostic mathématique sur le choix des formes initiales pour le développement des tétrahybrides chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.).

NACHEVA Y., PETKOV N.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(3), 83-86. (Bg,r,e)

***Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm rearing insectaries.**

Populations de *Bacillus thuringiensis* apparaissant naturellement sur les feuilles de mûrier : une source possible dans les insectariums d'élevages des vers à soie.

OHBA M.

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.

1996 *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 80(1), 56-64. (E)

Characterization of a local isolate of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Caractérisation d'un isolat local du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

PALHAN V.B., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

1996 *Current Science*, Vol. 70(2), 147-153. (E)

Vratsa 95 - New high-producing tetrahybrid of the silkworm.

Vratsa 95 - Un nouveau ver à soie tétrahybride à haute production.

PETKOV N., NACHEVA J.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Animal Breeding*, Vol. 50(5-6), 23. (Bg)

Investigations on the productivity traits of composite (tetra) hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Biological characteristics of silkworm.

Investigations sur les caractères de productivité des hybrides composés (tétra) du ver à soie (*Bombyx mori* L.). I. Caractéristiques biologiques du ver à soie.

PETKOV N., NACHEVA Y.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(4), 63-67. (Bg,r,e)

Polytene chromosomes of the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Tachinidae: Diptera).

Chromosomes polytènes de la mouche uzi *Exorista sorbillans* (Tachnidae : Diptera).

PUTTARAJU H.P., MANJUNATHA H.B.

Department of Sericulture, Jnana Bharathi Campus, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

1995 *Cytobios (UK)*, Vol. 84(336), 47-58. (E)

***Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif.**

Bacillus thuringiensis: an optional pathogenic agent.

SALAMITOU S., MARCHAL M., LERECLUS D.

Unité de Biochimie microbienne, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

1996 *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 7(4), 285-296. (F)

Amélioration biotechnologique de *Bacillus thuringiensis* : les enjeux et les risques.

Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis*: stakes and risks.

SANCHIS V., CHAUFAX J., LERECLUS D.

Unité de Biochimie microbienne, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

1996 *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 7(4), 271-284. (F)

Temperature and humidity management during cocoon spinning.

Gestion de la température et de l'humidité au cours du filage du cocon.

SARATCHANDRA B.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(11), 24-26. (E)

Management of silkworm diseases and pests.

Gestion des maladies et des parasites des vers à soie.

SARATCHANDRA B.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(11), 27-30. (E)

Silkworm breeds and their hybrids.

Souches de ver à soie et leurs hybrides.

SENGUPTA A.K., DAS S.K., RAO P.R.T., GHOSH B., SARATCHANDRA B.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(11), 18-20. (E)

Studies on rearing techniques of feeding 3rd-4th instar silkworms once a day on rearing seats of Lattice type.

Etudes sur les techniques d'élevage avec un nourrissage par jour pour les vers à soie du 3e et du 4e âge, sur des claies d'élevage de type treilli.

SHEN X. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 57-58. (C)

Efficacy of calcium hydroxide against nuclear polyhedrosis virus of silkworm, *Bombyx mori* L.

Efficacité de l'hydroxyde de calcium contre le virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie *Bombyx mori* L.

SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J.

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 150-151. (E)

Integrated disease management methods for grasserie in silkworm *Bombyx mori* L.

Méthodes de gestion intégrée de la maladie pour la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J.

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 122-127. (E)

Study on the optimum terms of spring silkworm feeding for seed cocoons production.

Etude sur les termes optimum de nourrissage des vers à soie au printemps pour la production de graines.

TSENOV P.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(3), 70-73. (Bg,e,r)

Effect of feeding dose during the fifth age of the silkworm (*Bombyx mori* L.) larval developement on the rates of domination and display of heterosis in F1.

Effet de la quantité de nourriture au cours du cinquième âge du développement larvaire du ver à soie (*Bombyx mori* L.) sur les taux d'hétérosis chez les F1.

TSENOV P., PETKOV N.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(3), 80-82. (Bg,r,e)

Effect of the terms of spring silkworm feeding for seed cocoons production on the balance of dry matter from 1 decare mulberry tree plantation.

Effet des termes de nourrissage des vers à soie au printemps pour la production de graines sur l'équilibre de matière sèche à partir de dix ares de mûraie.

TSENOV P., PETKOV Z.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(3), 74-79. (Bg,r,e)

Dermestid beetles and some other insect pests associated with stored silkworm cocoons in India, including a world list of dermestid species found attacking this commodity.

Coléoptères dermestides et quelques autres parasites d'insectes associés aux cocons de ver à soie stockés en Inde, comprenant une liste globale d'espèces de dermestides recensés s'attaquant à cette matière première.

VEER, NEGI B.K., RAO K.M.

Entomology Division, Defence R and D Establishment, Gwalior 474 002, India.

1996 *Journal of Stored Products Research (U.K.)*, Vol. 32(1), 69-89. (E)

Breeding of the spring rearing silkworm varieties Su(213), Chun(628) and their quaternary hybrid Su.Zhen × Chun.Guang.

Variétés de ver à soie d'élevage de printemps Su(213), Chun(628) et leur hybride quaternaire Su.Zhen × Chun.Guang.

WANG Z.

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

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 14-19. (C,e)

A study on pathohistology of the skin of fluoride poisoned silkworms.

Une étude histopathologique sur la peau des vers à soie empoisonnés au fluorure.

ZHOU C., ZHOU C., WANG S. IWASHITA Y.

Shandong Sericultural Research Institute, Yantai 264002, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 28-32. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Scanning electron microscopic observations on the embryogenesis in the wild silkmoth, *Antheraea yamamai*.

Observations au microscope électronique sur l'embryogenèse chez le papillon à soie sauvage *Antheraea yamamai*.

BABA H., KUWABARA N., IWASHITA Y.

Utandai Fuzoku High School, 1-35 Mutsumi, Utsunomiya, Tochigi 320, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(2), 99-106. (J,e)

Breeding of Fang shan huang No 2 a new hypersilk generous variety of *Antheraea pernyi*.

Sélection de Fang shan huang n° 2 une nouvelle variété d'*Antheraea pernyi* génèreuse en soie.

DONG G., ZHAO F., LIU Y., SONG D., ZHANG J.

Fang Shan Oak Silkworm Parental Egg Production Farm, Qixia 265300, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 33-37. (C,e)

New integrated package for tasar rearing : field trials.

Un nouvel ensemble de méthodes intégrées pour l'élevage du tasar : essais sur le terrain.

JAIPAL REDDY K., YADAV G.S., SHUKLA R.M., KADU R.A., BIJAGARE B.L.

Regional Tasar Research Station, Bhandara, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(10), 8-10. (E)

Delaying the hatching of tropical tasar eggs.

Retardement de l'éclosion des oeufs du tasar tropical.

KUMAR N., OJHA N.G., SINHA S.S.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(8-9), 10. (E)

Effect of refrigeration on mating efficiency of male moths of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Effet de la réfrigération sur la capacité d'accouplement des papillons mâles du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D.

OJHA N.G., SHARAN S.K., RAVIKUMAR G., DUBEY O.P., SINHA B.R.R.Pd., SINHA S.S.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 155-157. (E)

Management of tasar nursery.

Gestion des nourriceries de tasar.

RAJADURAI S., THIANGAVELU K.

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

1997 Indian Silk, Vol. 35(11), 33-34. (E)

Cultivation of castor in Meghalaya.

Culture du "castor" au Meghalaya.

SAHA L.M., CHANDA S.

P4 / P2 Basic Seed Farm, NSP, Central Silk Board, Kalimpong, Darjeeling, West Bengal, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(8-9), 21-24. (E)

Status of muga seed sector.

Statut du grainage du muga.

SAHU A.K., KUMAR N., DAS P.K.

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko, Assam, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(12), 29-32. (E)

Mejankari: the unexplored Assam silk.

Mejankari : la soie inexplorée du Assam.

SURESH SAIKIA, GOSWAMI B.C.

Gargoan College, Simaluguri, Assam, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(12), 33-35. (E)

Diapause intensity and ecdysiotroph: Comparisons between two *Antheraea* species (Lepidoptera: Saturniidae) having summer and winter diapause at pupae.

Intensité de la diapause et ecdysiotrophe : comparaisons entre deux espèces d'*Antheraea* (Lepidoptera : Saturniidae) ayant une diapause d'été et d'hiver au stade chrysalide.

TAKEDA M., MATSUMOTO M., TOHNO Y.

Laboratory of Insect Science, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657, Japan.

1997 Eur. J. Entomol., Vol. 94(1), 67-73. (E)

Frequency distribution of tasar flora.

Distribution de la flore du tasar.

YADAV G.S., REDDY K.J., SINGH B.M.K., ROY G.C., SINHA S.S.

Regional Tasar Research Station, Bhandara, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(12), 22-24. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Manual on bivoltine rearing race maintenance and multiplication.

Manuel de maintenance et de reproduction des races bivoltines d'élevage.

DATTA R.K., BASAVARAJA H.K., MANO Y.

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

1996 *CSRTI Mysore, India*. 65 p. (E)

Genetical analysis of the mosaic lethal mutant in *Bombyx mori*.

Analyse génétique du mutant léthal mosaïque chez *Bombyx mori*.

GOTO K., KOBAYASHI M.

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 123-127. (J,e)

Breeding of a dominant silkworm trimolter SG.

Obtention d'un ver à soie trimuant dominant SG.

HE Y., HE S.

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

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 24-27. (C,e)

Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyedrovirus of *Buzura suppressaria*.

Caractérisation du gène de l'UDP-glucosyltransférase d'ecdystéroïde d'un nucléopolyédrovirus à simple nucléocapside de *Buzura suppressaria*.

HU Z.H. et al.

Department of Virology, Wageningen Agricultural University, Binnehaven 11, 6709 PD Wageningen, The Netherlands.

1997 *Virus Research*, Vol. 47, 91-97. (E)

Analysis of genetic relationships among the silkworm *Bombyx mori* strains using RAPD-PCR.

Analyse des relations génétiques parmi les souches du ver à soie *Bombyx mori* par utilisation de RAPD et PCR.

HWANG J.S., LEE J.S., KANG H.A., LEE S.M., SUH D.S.

1995 *Korean J. Genet.*, Vol. 17(4), 291-300. (K)

Baculovirus-insect cell production of bioactive porcine FSH.

Production de FSH porcine bioactive à partir de baculovirus de cellules d'insectes.

INABA T. *et al.*

Department of Animal Reproduction, College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 593, Japan.

1997 Theriogenology, Vol. 47, 491-499. (E)

Isolation and characterization of a class II alpha-mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells.

Isolément et caractérisation d'un ADNc alpha-mannosidase classe II de cellules de lépidoptères.

JARVIS D.L. *et al.*

Department of Entomology, Texas A & M University, College Station TX 77843, USA.

1997 Glycobiology, Vol. 7(1), 113-127. (E)

Genetic analysis of the 'translucent-15' mutant in *Bombyx mori*.

Analyse génétique du mutant "translucide-15" de *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., YAMADA H., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H.

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan.

1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(2), 113-115. (Ej)

Isolation and characterization of an alpha 1,2-mannosidase cDNA from the Lepidopteran insect cell line Sf9.

Isolément et caractérisation d'un ADNc alpha 1,2-mannosidase à partir de la lignée cellulaire Sf9 de lépidoptères.

KAWAR Z., HERSCOVICS A., JARVIS D.L.*

* Texas A & M University, Department of Entomology, Genetic Program College Station, TX 77843, USA.

1997 Glycobiology, Vol. 7(3), 433-443. (E)

***Bombyx mori* single repeat telomeric DNA sequence forms a G-quadruplex capped by base triads.**

La séquence d'ADN télomérique à répétition simple de *Bombyx mori* forme un quadruplexe G couvert par des triades de base.

KETTANI A., BOUAZIZ S., WANG W., JONES R.A., PATEL D.J.*

* Mem Sloan Kettering Cancer Center, Cellular Biochem. & Biophysical Program, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, USA.

1997 Nature Structural Biology, Vol. 4(5), 382-389. (E)

A strong inhibitory element down-regulates SRE-stimulated transcription of the A3 cytoplasmic actin gene of *Bombyx mori*.

Un élément fortement inhibiteur régule la transcription stimulée par la SRE du gène de l'actine cytoplasmique A3 de *Bombyx mori*.

MANGE A., JULIEN E., PRUDHOMME J.C., COUBLE P.

CGMC, Université Claude Bernard Lyon I, CNRS-UMR 5534, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1997 J. Mol. Biol., Vol. 265, 266-274. (E)

Selection and genetics parameters of some basic traits of silkworm strains. Selection characteristics.

Sélection et paramètres génétiques de quelques caractères fondamentaux des souches de vers à soie. Caractéristiques de sélection.

NACHEVA J., PETKOV N.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 Journal of Animal Science, Vol. 33(4), 58-62. (B,g,e,r)

Selection and genetic parameters of basic traits of silkworm lines. II. Heritability.

Sélection et paramètres génétiques des caractères fondamentaux des lignées de ver à soie.
II. Héritabilité.

NACHEVA Y., PETKOV N.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(6), 69-72. (Bg,r,e)

Sex-determination and sex-limited traits in the silkworm, *Bombyx mori*: their applications in sericulture.

Détermination du sexe et caractères limités au sexe chez le ver à soie *Bombyx mori*: leurs applications en sériciculture.

NAGARAJU J.

Seribiotech Research Laboratory, Central Silk Board, W.C. Road, Bangalore 560 086, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 83-89. (E)

Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg-injection of foreign DNA.

Essai de transgénèse chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.) par injection d'ADN étranger dans les oeufs.

NAGARAJU J., KANDA T., YUKUHIRO K., CHAVANCY G., TAMURA T., COUBLE P.*

* CGMC, UMR 5534, CNRS, Université Lyon I, Bâtiment 741, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1996 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 31(4), 587-596. (E)

Recent developments in transgenic insect technology.

Développements récents dans la technologie des insectes transgéniques.

O'BROCHTA D.A., ATKINSON P.W.

Center for Agricultural Biotechnology, University of Maryland, Biotechnology Institute, College Park, MD 20742, USA.

1997 *Parasitology Today*, Vol. 13(3), 99-104. (E)

Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects.

Eléments transposables et transformation génétique chez les insectes non drosophilides.

O'BROCHTA D.A., ATKINSON P.W.

Center for Agricultural Biotechnology, University of Maryland, Biotechnology Institute, College Park, MD 20742, USA.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(8-9), 739-753. (E)

Selection of the silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds genetically labelled by sex in the egg and larva stages.

Sélection de races de vers à soie (*Bombyx mori* L.) marquées génétiquement par le sexe aux stades de l'oeuf et de la larve.

PETKOV N., NACHEVA Y.

Experimental Station of Silkworm Breeding, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(3), 64-69. (Bg,e,r)

Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin(TM) resistance gene for use as a dominant selectable marker in Dipteran and Lepidopteran insect cell lines.

Expression, par un promoteur précoce immédiat de baculovirus, du gène de résistance au Zeocin(TM) utilisé comme marqueur de sélection dominant chez des lignées cellulaires de diptères et de lépidoptères.

PFEIFER T.A., HEGEDUS D.D., GRIGLIATTI T.A.*, THEILMANN D.A.

* University of British Columbia, Department of Zoology, 6270 University Boulevard, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.

1997 *Gene*, Vol. 188(2), 183-190. (E)

Structure and spatial expression of the *Manduca sexta* MSCP14.6 cuticle gene.

Structure et expression spatiale du gène de la cuticule MSCP14.6 de *Manduca sexta*.

REBERS J.E., NIU J., RIDDIFORD L.M.

No Michigan University, Department of Biology, 1401 Presque Isle Avenue, Marquette, MI 49855, USA.

1997 *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 27(3), 229-240. (E)

Bmmar1: a basal lineage of the Mariner family of transposable elements in the silkworm moth, *Bombyx mori*.

Bmmar1 : une lignée de la famille Mariner des éléments transposables chez le papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

ROBERTSON H.M., ASPLUND M.L.

Department of Entomology, University of Illinois, 505 S. Goodwin, Urbana, IL 61801, USA.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(8-9), 945-954. (E)

Transcriptional silencing of a tRNA^{Gly} copy from within a multigene family is modulated by distal cis elements.

La non transcription d'une copie de l'ARN^{tGly} à l'intérieur d'une famille multigénique est modulée par des éléments distaux en cis.

SHARMA S., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

1997 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271(45), 28146-28153. (E)

Role of TATATAA element in the regulation of tRNA^{Gly} gene expression in *Bombyx mori* is position dependent.

Le rôle de l'élément TATATAA dans la régulation de l'expression du gène de l'ARN^{tGly} chez *Bombyx mori* dépend de la position.

SHARMA S., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

1996 *J. Mol. Biol.*, Vol. 262, 396-406. (E)

Studies on the chromosomes in mitosis of silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes sur les chromosomes lors de la mitose chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SHEN Y., XIANG Z.

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 42-46 (C,e)

A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*.

Une nouvelle famille de rétrotransposons spécifiques à un site SART1 est insérée dans les répétitions télomériques du ver à soie *Bombyx mori*.

TAKAHASHI H., OKAZAKI S., FUJIWARA H.*

* University of Tokyo, Graduate School of Sciences, Department of Biological Science, Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo 113, Japan.

1997 *Nucleic Acids Research*, Vol. 25(8), 1578-1584. (E)

Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*).

Clonage des récepteurs d'amine biogène à partir des papillons (*Bombyx mori* et *Heliothis virescens*).

VON NICKISCH-ROSENEGK E. et al.

University of Stuttgart-Hohenheim, Institute of Zoophysiology, Garbenstr. 30, 70599 Stuttgart, Germany.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(8-9), 817-827. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

The role of 20-hydroxyecdysone in stimulating DNA synthesis in corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori*.

Le rôle de la 20-hydroxyecdysone dans la stimulation de la synthèse de l'ADN dans les corpora allata du ver à soie *Bombyx mori*.

CHIANG A.S., CHEN S.F., CHANG L.H.

Department of Life Science, National Tsing-Hua University, Hsinchu, Taiwan 30043, Republic of China.

1997 General and Comparative Endocrinology, Vol. 105, 134-140. (E)

Caterpillars as social insects.

Les chenilles : des insectes sociaux.

COSTA J.T.

Department of Biology, Western Carolina University, Cullowhee, NC 28723, USA.

1997 American Scientist, Vol. 85, 150-159. (E)

Influence of simulated microgravity on the longevity of insect-cell culture.

Influence de la microgravité simulée sur la longévité d'une culture de cellules d'insectes.

COWGER N.L., OCONNOR K.C. *, BIVINS J.E.

*Tulane University, Department of Chemistry and Engineering, Boggs Center RM 300, New Orleans, LA 70118, USA.

1997 Enzyme and Microbial Technology, Vol. 20(5), 326-332. (E)

Glutathione S-transferases of *Bombyx mori* L. larvae.

Glutathion S-transférases des larves de *Bombyx mori* L.

DEVI K.N., RAO A.D., HEMAVATHI B., THYAGARAJU K.

Department of Biochemistry, Sri. Venkateswara University, Tirupati 517 502, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(2), 114-116. (E)

Evidence for glycolysation of the juvenile-hormone-binding protein from *Galleria mellonella* hemolymph.

Mise en évidence de la glycolysation de la protéine liante à l'hormone juvénile à partir de l'hémolymph de *Galleria mellonella*.

DUK M. *et al.*

Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław, Polska.

1996 Eur. J. Biochem., Vol. 242, 741-746. (E)

An endogenous elevation of cGMP increases the excitability of identified insect neurosecretory cells.

Une élévation endogène de cGMP augmente l'excitabilité de cellules neurosécrétrices d'insectes identifiées.

GAMMI S.C., TRUMAN J.W.

University of Washington, Department of Zoology, Box 351800, Seattle, WA 98195, USA.

1997 *Journal of Comparative Physiology A- Sensory Neural and Behavioral Physiology*, Vol. 180(4), 329-337. (E)

Effect of some hormones and steroid on growth and development of mulberry silkworm *Bombyx mori* L. race Nistari (Bombycidae: Lepidoptera).

Effet de quelques hormones et de stéroïde sur la croissance et le développement du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* race Nistari (Bombycidae : Lepidoptera).

GHATAK S.S., RAFIQUZZAMAN Md.

1995 *Environ. Ecol.*, Vol. 13(4), 785-788. (E)

The distribution of PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide)-like immunoreactivity in the nervous system of the gypsy moth, *Lymantria dispar*.

Distribution de l'immunoréactivité analogue au PBAN (neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone) dans le système nerveux du papillon gipsy *Lymantria dispar*.

GOLUBEVA E., KINGAN T.G., MASLER E.P., RAINA A.K.*

* USDA ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Insect Biocontrol Laboratory, Building 306, Beltsville, MD 20705, USA.

1997 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 34(4), 391-408. (E)

Involvement of juvenile hormone in regulation of prothoracicotropic hormone transduction during the early last larval instar of *Bombyx mori*.

Implication de l'hormone juvénile dans la régulation de la transduction de l'hormone juvénile au cours du début du dernier âge larvaire de *Bombyx mori*.

GU S.H., CHOW Y.S., YIN C.M.

Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan, ROC.

1997 *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 127, 109-116. (E)

Activity of insulin growth factors and shrimp neurosecretory organ extracts on a lepidopteran cell line.

Activité des facteurs de croissance de l'insuline et des extraits d'organe neurosécréteur de la crevette sur une lignée cellulaire de lépidoptère.

HATT P.J., LIEBON C., MORINIERE M., OBERLANDER H., PORCHERON P.

* Lab. de Biochimie, Département de Biologie, E.N.S., 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.

1997 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 34, 313-328. (E)

Dyar's rule and the investment principle: optimal moulting strategies if feeding rate is size-dependent and growth is discontinuous.

Règle de Dyar et le principe d'investissement : stratégies d'optimisation de la mue si le taux de nourrissage dépend de la taille et si la croissance est discontinue.

HUTCHINSON J.M.C., MCNAMARA J.M., HOUSTON A.I., VOLLRATH F.

School of Biological Sciences, Univ. of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, United Kingdom.

1997 *Phil. Trans. R. Soc. Lond., Serie B*, Vol. 352, 113-138. (E)

Heat shock response in mulberry silkworm races with different thermotolerances.

Réponse au choc thermique chez différentes races de ver à soie du mûrier avec différentes tolérances thermiques.

JOY O., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

1995 *J. Biosci.*, Vol. 20(4), 499-513. (E)

Wing disc morphogenesis of fl mutant (flügellose) of *Bombyx mori* during the fifth larval instar.
Morphogénèse des disques alaires du mutant fl (flügellose) de *Bombyx mori* au cours du cinquième âge larvaire.

KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya 321, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(1), 48-53. (J,e)

Studies on the biological activities of phytoecdysone from *Acyranthes japonica*. 1. Effects of molting hormone extracted from *A. japonica* on moulting and cocoon characters of *Bombyx mori*.

Etudes sur les activités biologiques de la phytoecdysone d'*Acyranthes japonica*. 1. Effets de l'hormone de mue extraite d'*A. japonica* sur les caractères de mue et du cocon de *Bombyx mori*.

KIM J.G., KIM S.E., HAN S.J., NOH S.K.

Natl Sericulture & Entomol. Res. Inst., Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(2), 127-131. (Ko,e)

Effects of insect growth regulators on development and physiology of the silkworm, *Bombyx mori* L. 1. Effects of fenoxycarb, juvenile hormone analog, on larval growth, pupation and cocoon characters by oral application.

Effets des régulateurs de croissance d'insectes sur le développement et la physiologie du ver à soie *Bombyx mori* L. 1. Effets du fenoxycarbe en application orale, un analogue de la JH sur la croissance larvaire, la nymphose et les caractères du cocon

KIM S.E., HWANG S.J., KIM J.G., HWANG J.S.

Natl Sericulture & Entomol. Res. Institute, Rural Development Institute, Suwon, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(2), 121-126. (Ko,e)

Ecdysteroids and related molecules in animals and plants.

Les ecdystéroïdes et les molécules apparentées chez les animaux et les plantes.

LAFONT R.

ENS, Département de Biologie, Laboratoire de Biochimie, CNRS, EP Signaux & Régulation Endocrines 119, 46 rue Ulm, 75005 Paris, France.

1997 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 35(1-2), 3-20. (E)

Action cascade of an insect gonadotropin, testis ecdysiotropin, in male Lepidoptera.

Action en cascade d'une gonadotropine d'insecte, l'ecdysiotropine des testicules, chez les lépidoptères mâles.

LOEB M.J., BELL R.A., GELMAN D.B., KOCHANSKY J., LUSBY W., WAGNER R.M.

Insect Neurobiology and Hormone Laboratory, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.

1996 *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. 30(3), 181-190. (E)

Pheromone binding proteins of the moth *Mamestra brassicae*: specificity of ligand binding.

Protéines liantes à la phéromone du papillon *Mamestra brassicae* : spécificité de la liaison du ligand.

MAIBECHECOISNE M. et al.

Naguanlemeillour P., INRA, Unité de Phytopharmacologie et des Médiateurs chimiques, Route St Cyr,

78026 Versailles, France.

1997 *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 27(3), 213-221. (E)

Infection of a *Spodoptera frugiperda* cell line with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

Infection d'une lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda* par un nucléopolyédrovirus de *Bombyx mori*.

MARTIN O., CROIZIER G.

Unité de Génétique des Virus, Station de Pathologie comparée, INRA-URA CNRS 2209, 30380 Saint Christol les Alès, France.

1997 *Virus Research*, Vol. 47, 179-185. (E)

Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity.

Changements dans le métabolisme des protéines de l'hémolymphe et du corps adipeux du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) en réponse à la toxicité des insecticides organophosphorés.

NATH B.S., SURESH A., VARMA B.M., KUMAR R.P.S.

Central Silk Board, United Mansions, 2nd Floor, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, Karnataka, India.

1997 Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 36(2), 169-173. (E)

Life cycle expression of a bombyxin-like neuropeptide in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Expression vie d'un neuropeptide analogue à la bombyxine chez le sphinx du tabac *Manduca sexta*.

NOGUEIRA B.V., MUEHLEISEN D.P., WHISENTON L.R., GRAY R.S., BOLLENBACHER W.E.

Department of Biology, CB# 3280, Coker Hall 010A, University of North Carolina at Chapel Hill, NC 27599-3280, USA.

1997 J. Insect Physiol., Vol. 43(1), 47-53. (E)

Difference of inducible antibacterial activity in hemolymph among the silkworm, *Bombyx mori*, races.

Différence d'activité antibactérienne inductible dans l'hémolymphe chez les races du ver à soie *Bombyx mori*.

OKADA E., MASE K., NAGASAKA K., YAMAMOTO T.

Research Team of Silkworm Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-10-1 Agata, Matsumoto, Nagano 390, Japan.

1997 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 66(2), 116-122. (J,e)

Intracellular signal transduction of PBAN action in the silkworm, *Bombyx mori*.

Transduction du signal intracellulaire de l'action du PBAN chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

OZAWA R., MATSUMOTO S.

Insect Toxicology and Physiology, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan.

1996 Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 26(3), 259-265. (E)

Effect of gamma irradiation on the total nitrogen and protein content in body during different stages of silkworm development.

Effet des rayons gamma sur le titre total d'azote et de protéines dans le corps au cours des différents stades du développement du ver à soie.

PETKOV N., MALINOVA K., NGOUEN THI THANH BINH.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 Journal of Animal Science, Vol. 33(4), 68-71. (Bg,r,e)

Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells.

Effet des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur le potentiel membranaire des cellules de l'intestin moyen chez les lépidoptères.

PEYRONNET O., VACHON V., BROUSSEAU R., BAINES D., SCHWARTZ J.L., LAPRADE R.*

* University of Montreal, Groupe de Recherche Transport membranaire, POB 6128, Ctr Ville Stn, Montreal, Pq H3C 3J7, Canada.

1997 Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63(5), 1679-1684. (E)

Elevation of different ion-specific ATPase activities by L-thyroxine (T4) in different tissues of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) during developmental stages.

Augmentation par la L-thyroxine (T4) de différentes activités de l'ATPase spécifique des ions dans différents tissus du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) au cours des stades du développement.

REDDY K.D., CHAUDHURI A., THANGAVELU K.*

* Silkworm and Mulberry Germplasm Station, PB 44, Thally Road, Hosur 635109, Dharmapuri District, India.

1997 *Comp. Biochem. and Physiol. B - Biochem. and Molec. Biol.*, Vol. 116(4), 459-466. (E)

Levels of biogenic amines in the brain during pupal and adult development of the silkworm, *Bombyx mori*.

Niveaux des amines biogènes dans le cerveau au cours du développement pupal et adulte du ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMIZU T., TAKEDA N., YAGI S.

Zemba 380, Ischara, Kanagawa 25911, Japan.

1997 *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences*, Vol. 52(3-4), 279-282. (E)

Digestive sites of dietary proteins and absorptive sites of amino acids along the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*.

Sites de digestion des protéines alimentaires et sites d'absorption des acides aminés le long de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*.

SHINBO H., KONNO K., HIRAYAMA C., WATANABE K.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42(11-12), 1129-1138. (E)

Hormonal regulation of JP29 in the epidermis during larval development and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Régulation hormonale de JP29 dans l'épiderme au cours du développement larvaire et de la métamorphose chez le sphinx du tabac *Manduca sexta*.

SHINODA T., HIRUMA K., CHARLES J.P., RIDDIFORD L.M.*

* University of Washington, Department of Zoology, POB 351800, Seattle, WA 98195, USA.

1997 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 34(4), 409-428. (E)

Identification of a novel virus-specific in vitro translation product in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with *B. mori* densovirus type 2.

Identification d'un nouveau produit de traduction in vitro spécifique du virus dans l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori* infesté par le densovirus *B. mori* de type 2.

SOTOSHIRO H., IKEDA M., KOBAYASHI M.

Laboratory of Sericulture & Entomoresources, Nagoya Univ., Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(1), 38-47. (E,j)

***Bombyx* acid cysteine proteinase.**

Protéinase à cystéine acide de *Bombyx*.

TAKAHASHI S.Y., YAMAMOTO Y., ZHAO X.F., WATABE S.

Yamaguchi Univ., College Agric., Lab. Biochemistry & Radiation Biology, Yamaguchi 753, Japan.

1996 *Invertebrate Reproduction & Development*, Vol. 30(13), 265-281. (E)

***In vitro* phagocytosis of *Escherichia coli* and release of lipopolysaccharide by adhering hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*.**

Phagocytose *in vitro* d'*Escherichia coli* et libération de lipopolysaccharides par les hématocytes adhérents du ver à soie *Bombyx mori*.

TANIA K., WAGO H., YAMAKAWA M.

Lab. Biological Defense, Natl Inst. Seric. & Entomol. Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 231, 623-627. (E)

Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*.

Purification et propriétés d'une particule de transfert des lipides chez *Bombyx mori* : comparaison avec la particule de transfert des lipides chez *Manduca sexta*.

TSUCHIDA K., SOULAGES J.L., MORIBAYASHI A., SUZUKI K., MAEKAWA H., WELLS M.A.

Division of Radiological Protection, National Institute of Health, 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162, Japan.

1997 *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1337, 57-65. (E)

The strain difference and polymorphic nature of phosphatases during ontogenic development of the silkworm, *Bombyx mori*.

La différence de souches et la nature polymorphique des phosphatases au cours du développement ontogénique du ver à soie *Bombyx mori*.

URS S.R., KRISHNAMURTHY N.B., HEDGE S.N.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Bangalore 560 068, Karnataka, India.

1997 *Biochemical Archives*, Vol. 13(1), 13-20. (E)

Spinneret - The spinning apparatus of silkworm, *Bombyx mori* L.

Filière - L'appareil à filer du ver à soie *Bombyx mori* L.

VINEET KUMAR, SINGH G.P., DATTA R.K.

Electron Microscopy Unit, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Journal of Animal Science*, Vol. 33(4), 50-53. (Bg,r,e)

Characterization of reaper- and FADD-induced apoptosis in a lepidoptera cell line.

Caractérisation de l'apoptose induite par Reaper et FADD dans une lignée de cellules de lépidoptères. VUCIC D., SESHAGIRI S., MILLER L.K.

Department of Genetics, The University of Georgia, Athens, Georgia 30602, USA.

1997 *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 17(2), 667-676. (E)

Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) inactivation by ecdysteroids and an agonist, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine (RH-5849).

Induction des enzymes impliquées dans l'activation de l'hormone de mue (ecdystéroïde), par les ecdystéroïdes et un agoniste, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine (RH-5849).

WILLIAMS D.R., CHEN J.H., FISHER M.J., REES H.H.*

* University of Liverpool, Department of Biochemistry, Life Science Building, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, Merseyside, England.

1997 *Journal of Biological Biochemistry*, Vol. 272(13), 8427-8432. (E)

Factors affecting the activity of superoxide dismutase in haemolymph of the silkworm.

Les facteurs affectant l'activité de la superoxyde dismutase dans l'hémolymphe du ver à soie.

WU X., XU J., CUI W.

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

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 38-41. (C,e)

A preliminary research on fluorescence pigment of the sex-limited fluorescence silkworm race.

Une recherche préliminaire sur le pigment fluorescent de la race de ver à soie à fluorescence limitée au sexe.

YU Z. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), Vol. 23(1), 64. (C)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Hormonal control of the follicular epithelium during vitellogenin uptake.

Contrôle hormonal de l'épithélium folliculaire pendant la consommation de vitellogénine.

DAVEY K.G.

York University, Department of Biology, 4700 Keele Street, N York, on M3J 1P3, Canada.

1996 Invertebrate Reproduction & Development, Vol. 30(1-3), 249-254. (E)

Male insect accessory glands: functions and control of secretory activity.

Glandes accessoires chez les insectes mâles : fonctions et contrôle de l'activité sécrétrice.

GILLOT C.

Univ. of Saskatchewan, Department of Biology, 112 Science Place, Saskatoon, SK S7N 5E2, Canada.

1996 Invertebrate Reproduction & Development, Vol. 30(1-3), 249-254. (E)

Cloning of cDNAs encoding *Bombyx* homologues of Cdc2 and Cdc2-related kinase from eggs.

Clonage des ADNc des oeufs codant pour les homologues chez *Bombyx* de Cdc2 kinase.

IWASAKI H., TAKAHASHI M., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.*

* Laboratory of Sericulture and Entomoresources, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1997 Insect Molecular Biology, Vol. 6(2), 131-141. (E)

Prediction of the biologically active sites in eclosion hormone from the silkworm, *Bombyx mori*.

Prévision des sites biologiquement actifs dans l'hormone d'éclosion du ver à soie *Bombyx mori*.

KIKUCHI T. *et al.*

Ciba Geigy Ltd, International Research Labs, 10-66 Miyuki Cho, Takarazuka, Hyogo 666, Japan.

1997 Protein Engineering, Vol. 10(3), 217-222. (E)

Comparative studies of the methods of parthenogenetic development in *Bombyx mori* L.

Etudes comparatives des méthodes du développement parthénogénétiques chez *Bombyx mori* L.

MALINOVA K., NACHEVA I., PETKOV N., GREKOV D.

Research Institute of Animal Science, Kostinbrod, Bulgaria.

1996 Journal of Animal Science, Vol. 33(4), 54-57. (Bg,r,e)

Study on the duration of diapause and wintering of silkworm seed.

Etude sur la durée de la diapause et l'hivernage des graines de ver à soie.

MLADENOV G., TSENOV P.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 Journal of Animal Science, Vol. 33(4), 72-74. (Bg,r,e)

Spermatids formation in two kinds of genetic trimoulters, *Bombyx mori*.

Formation des spermatides chez deux sortes de trimuants génétiques, *Bombyx mori*.

NAKAGAKI M., HE L., NAKAMURA M., KAJIURA Z., TAKEI R.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(1), 17-22. (J,e)

Hatchability in triploid silkworms of sex-linked chocolate.

Taux d'éclosion chez les vers à soie triploïdes porteurs du gène chocolat lié au sexe.

SAHARA K. *et al.*

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 141-144. (J)

Analysis of gene expression during embryonic development in mulberry silkworm *Bombyx mori*.

Analyse de l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire chez le ver à soie du mûrier *Bombyx mori*.

SINGH A., GOPINATHAN K.P.

Microbiology and Cell Biology Department, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India.

1997 *Current Science*, Vol. 72(3), 214-218. (E)

Silkworm egg handling techniques.

Techniques de manipulation des oeufs de ver à soie.

VEMANANDA REDDY G., VIJAYALAKSHMI RAO, SAMSON M.V.

SSTL, Kodathi, Bangalore, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 35(11), 15-17. (E)

Prostaglandins do not release egg-laying behaviour in the silkworm, *Bombyx mori*.

Les prostaglandines n'éliminent pas le comportement de ponte chez le papillon *Bombyx mori*.

YAMAUCHI M., FUGO H.*, DEDOS S.G.

* Tokyo University of Agriculture & Technology, Faculty of Agriculture, Department of Biological Production, Fuchu, Tokyo 183, Japan

1997 *Zoological Science*, Vol. 14(1), 135-140. (E)

Glandes séricigènes

Silk glands

Differential binding of the *Bombyx* silk gland-specific factor SGFB to its target DNA sequence drives posterior-cell-restricted expression.

La liaison différentielle du facteur SGFB spécifique de la glande séricigène de *Bombyx* avec sa séquence d'ADN cible commande l'expression spécifique des cellules du sécréteur.

HORARD B., JULIEN E., NONY P., GAREL A., COUBLE P.

CGMC, UMR 5534, CNRS, Université Lyon I, Bâtiment 741, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1997 Molecular and Cellular Biology, Vol. 17(3), 1572-1579. (E)

Transcriptional regulatory elements in the upstream and intron of the fibroin gene bind three specific factors POU-M1, Bm Fkh and FMBP-1.

Les éléments régulateurs de transcription en amont et dans l'intron du gène de la fibroïne fixent trois facteurs spécifiques POU-M1, Bm Fkh et FMBP-1.

TAKIYA S., KOKUBO H., SUZUKI Y.*

* National Institute for Basic Biology and Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji, Okazaki 444, Japan.

1997 Biochem. J., Vol. 321, 645-653. (E)

Soie

Silk

NMR study of silk I structure of *Bombyx mori* silk fibroin with ¹⁵N- and ¹³C-NMR chemical shift contour plots.

Etude RMN de la structure I de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* avec les courbes de niveaux ¹⁵N et ¹³C.

ASAKURA T., DEMURA M., DATE T., MIYASHITA N., OGAWA K., WILLIAMSON M.P.
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei,
Tokyo 184, Japan.

1996 Biopolymers, Vol. 41, 193-203. (E)

The study on the sericin fixation mechanism.

Etude du mécanisme de fixation de la sérécine.

BAE D.G.

College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea Republic.

1995 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 37(2), 137-141. (Ko,e)

Extraordinary conservation of cysteines among homologous *Chironomus* silk proteins sp185 and sp220.

Conservation extraordinaire des cystéines parmi les protéines de soie homologues sp185 et sp 220 de *Chironomus*.

CASE S.T., BELL W.C., HOFFMAN R T, MARTIN J., HAMILTON R.

University of Mississippi, Medical Center, Department of Biochemistry, 2500 North State Street,
Jackson, MS 39216, USA.

1997 Journal of Molecular Evolution, Vol. 44(4), 452-462. (E)

Defects in tussah (tasar) silk yarn.

Défauts dans le fil de soie tussah (tasar);

CHATTOPADHYAY R., DAS S., GULRAJANI M.L., SEN K.

Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, New Delhi, India.

1995 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 37(2), 191-196. (Ko,e)

Charged properties of silk-fibroin membranes.

Propriétés de charges des membranes de fibroïne de soie.

CHEN J.

1995 Fangzhi Xuebao, Vol. 16(6), 4-6. (C)

Dyeing behavior of silk/CDP mixed filament with a cationic dye.

Comportement tinctorial d'un fil de soie mélangé à du CDP, avec une teinture cationique.

CHOE J.M., KWEON H.Y., PARK Y.H.

Tongkook Synthetic Fibers Company, Seoul, Korea Republic.

*1995 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 37(2), 161-166. (Ko,e)***Preparation and structural characterization of silk fibroin powder and film.**

Préparation et caractérisation structurale de la fibroïne de soie en poudre et en film.

CHOI H.K., NAHM J.H.

National Seric. and Entomol. Res. Inst., Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

*1995 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 37(2), 142-153. (Ko,e)***Dyeing of silk and ramie fabric with natural dye. 1. The traditional dyeing method of safflower.**

Teinture des tissus de soie et de ramie avec un colorant naturel. 1. La méthode traditionnelle de teinture du carthame.

CHUNG I.M., WOO S.O., LEE Y.W., CHOI H.K.

National Sericulture and Entomology Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

*1995 Korean Journal of Sericultural Science, Vol. 37(2), 161-166. (Ko,e)***Studies on thermal behavior of sericin in cocoon shell.**

Etude sur le comportement thermique de la sérécine dans la coque soyeuse.

DAS S.

*1995 Colourage, Vol. 42(11), 47-48. (E)***The pigments in the callus of *Rubia akane* and their dyeing properties.**Les pigments des cals de *Rubia akane* et leurs propriétés tinctoriales.

ENDO M., SAKATA K., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University, 1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 713, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(2), 107-112. (J,e)***Influence of fibroin fine structure on dyeing property.**

Influence de la structure fine de la fibroïne sur la propriété tinctoriale.

FENG Z., LI M., ZHOU H.

*1995 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 12(1), 34-37. (C)***Immobilization of alkaline phosphatase onto aminated silk fabrics.**

Immobilisation de la phosphatase alcaline sur des tissus de soie aminés.

FURUHATA K.I., DENO S., SAKAMOTO M.

Department of Organic and Polymeric Materials, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan.

*1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(1), 11-16. (E,j)***Chemical modification of the arginyl residue in silk fibroin. 2. Reaction of 1,2-cyclohexanedione in aqueous alkaline medium.**

Modification chimique du résidu arginyl dans la fibroïne de soie. 2. Réaction du 1,2-cyclohexadione en milieu aqueux alcalin.

GOTOH Y., TSUKADA M., MINOURA N.

*1996 International J. Biol. Macromolecules, Vol. 19(1), 41-44. (E)***Reeling of melted cocoons.**

Dévidage des cocons fondus.

HARIRAJ G., NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, Madivala, CSB Complex, Bangalore 560 068, India.

1997 Indian Silk, Vol. 35(11), 35-37. (E)

Fibrillation of silk fibers, its treatment method and producing of silk paper.

Fibrillation des fibres de soie, méthode de traitement et production du papier de soie.

HATA T., KATO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 132-135. (J,e)

Plasticizing of silk fibroin film.

Plastification de film de fibroïne de soie.

HIRAIDE S.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 138-140. (J)

Physico-mechanical properties and dyeing behaviors of Tussah silk fabrics coated with chitosan.

Propriétés physico-mécanique et comportements tinctoriaux des tissus de soie tussah enduits de chitosan.

KAKO T., KATAYAMA A.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 145-148. (J)

Influence of bleaching with hydrogen peroxide on characteristics of Chinese tussah silk fibers.

Influence du blanchiment à l'eau oxygénée sur les caractéristiques des fibres de soie tussah de Chine.

KAWAHARA Y.

Tokyo Metropolitan Textile Research Institute, Sumida-ku, Tokyo 130, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(1), 31-33. (J,e)

Hydrolysis behavior of methacrylamide grafted mulberry silk fibers and Japanese oak silk fibers.

Comportement d'hydrolyse des fibres de soie mûrier greffées au méthacrylamide et des fibres de soie du chêne japonais.

KAWAHARA Y.

Tokyo Metropolitan Textile Research Institute, Sumida-ku, Tokyo 130, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(1), 34-37. (J,e)

Effect of some swelling agents on soaking treatment of raw silk.

Effet de quelques agents gonflants sur le trempage de la soie grège.

KIM Y.D., KIM N.J.

National Sericulture and Entomology Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

1995 *Korean Journal of Sericultural Science*, Vol. 37(2), 132-136. (Ko,e)

A study on preparation of flax-like silk yarn with some sericin fixatives.

Une étude sur la préparation du fil de soie analogue au lin avec quelques fixatifs de la séricine.

LEE Y.W., LEE K.G., CHUNG I.M., CHOI H.K., WOO S.O.

National Sericulture and Entomology Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.

1995 *RDA Journal of Agricultural Science (Korea Republic)*, Vol. 38(2), 787-792. (Ko,e)

Production of new multi-core and multi-layered spun silk yarn.

Production d'un nouveau fil de schappe à plusieurs couches et plusieurs noyaux.

MATSUMOTO Y., SAITO H., SAKAGUTI A., TORIUMI K., MOROOKA H., HARAKAWA K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(2), 92-98. (J,e)

Production of novel multilayered spun silk yarns.

Production de nouveaux fils de soie filés en plusieurs couches.

MATSUMOTO Y., SAKAGUCHI A., TORIUMI K., MOROOKA H., HARAKAWA K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(1), 6-10. (J,e)

Analysis of the construction process of cocoon shape by *Bombyx mori*.

Analyse du processus de construction de la coque soyeuse par *Bombyx mori*.

MIURA M., MORIKAWA H., KATO H., IWASA M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(1), 23-30. (E,j)

Denier indicator device for silk reeling machine.

Dispositif d'indicateur de denier pour les dévideuses de cocons.

RAVINDRA BHANDIWAD, SOMASHEKAR T.H., DANDIN S.B.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560 062, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(2), 132-137. (E)

Effect of added metal ions on the interaction of silk and an azo dye carrying hydroxyl groups.

Effet de l'addition d'ions métal sur l'interaction de la soie et des groupements hydroxyles portant un colorant azo.

SHIMIZU Y., TAKAGISHI T.

School of Engineering, University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(1), 1-5. (E,j)

Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk.

Cristaux treillisés non périodiques dans la microstructure hiérarchique de la soie (grande ampoule) d'araignée.

THIEL B.L., GUESS K.B., VINEY C.*

* University of Washington, Center of Bioengineering, Box 357962, Seattle, WA 98195, USA.

1997 *Biopolymers*, Vol. 41(7), 703-719. (E)

Studies on the physical properties of silk sericin gel.

Etude sur les propriétés physiques du gel de sérécine.

ZHU L., YAO J., LI Y., HIRABAYASHI K., ARAI M.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(1), 47-52. (C,e)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.

- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) 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.

* * *