

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
CROIZIER G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KRISHNASWAMY S. (Inde / *India*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PERSOONS C.J. (Pays-Bas / *The Netherlands*)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKAHASHI R. (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENČZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Revues / Reviews

Disinfection and hygiene in sericulture, a review	401
La désinfection et l'hygiène en sériciculture	417
S. N. PALLAVI & C. K. KAMBLE	

Articles scientifiques / Scientific papers

A new technique of transgenesis by PFGE	429
Une nouvelle technique de transgénèse par électrophorèse en champ pulsé	437
L. ZHENGANG, R. RUI & Z. ZHIGANG	

Effect of body weight on effectiveness of the Insect Growth Regulator (IGR) fenoxycarb applied to the male and female silkworm (<i>Bombyx mori</i>) (Lepidoptera: Bombycidae)	443
Effets du poids du corps sur l'efficacité du régulateur de croissance d'insecte (R.C.I.), le fenoxycarbe appliqué chez le ver à soie mâle et femelle (<i>Bombyx mori</i>) (Lepidoptera: Bombycidae)	453
L. CAPPELLOZZA, P. IANNE & S. CAPPELLOZZA	

The cytological evidence of chromosome deletion in silkworm	459
Preuve cytologique de délétion chromosomique chez le ver à soie	463
MENG Z. Q., Y. BANNO, H. DOIRA, LU J. & WENG H.B.	

Biochemical changes in the haemolymph of healthy and uzifly infested larvae of <i>Antheraea proylei</i> Jolly (Lepidoptera: Saturniidae)	465
Changements biochimiques dans l'hémolymphe des larves d' <i>Antheraea proylei</i> Jolly (Lepidoptera: Saturniidae) saines et infestées par la mouche Uzi	473
P. K. SINGH, P. N. SINGH & B. PRASAD	

Etablissement des méristèmes apicaux du mûrier, <i>Morus alba</i> L., in vitro.	477
<i>In vitro</i> culture of apical meristems of mulberry <i>Morus Alba</i> L.	487
T. C. FONSECA, M. L. C. VIEIRA & G. BANDEL	

Chromosomal variability in long term callus culture of mulberry (<i>Morus alba</i> L.) . .	491
Variabilité chromosomique dans les cultures prolongées de cals de mûrier (<i>Morus Alba</i> L.)	497
S. P. CHAKRABORTI, P. NARAYAN, K. VIJAYAN, B. N. ROY, S. M. H. QADRI & B. SARATCHANDRA	

Rapport techniques / Technical reports

Growth of Indian sericulture, an overview	501
Panorama de la croissance de la sériciculture indienne	507
P. K. SAHU, K. K. DAS & N. K. DAS	

Fats and fatty acids in the developmental stages of <i>Antheraea assama</i> and its host plants	511
Graisses et acides gras au cours des phases de développement d' <i>Antheraea Assama</i> et de ses plantes hôtes	517
A. KATAKY & L. K. HAZARIKA	

Rooting potential of mulberry genotypes in coastal saline areas	521
Potentiel de racinement de génotypes de mûriers dans des zones côtières salines	527
S. T. P. AGASTIAN & M. VIVEKANANDAN	

Screening of high yielding mulberry varieties against bacterial blight disease	529
Examen de la résistance de variétés de mûriers à haut rendement à la maladie de la rouille bactérienne	533
R. S. TEOTIA & S. K. SEN	

Some physio-biochemical changes in black mildew (<i>Meliola ampitricha</i> Fr.) affected leaves of mulberry varieties	535
Changements physio-biochimiques chez des feuilles de variétés de mûriers atteintes par le mildiou noir (<i>Meliola Amphitricha</i> Fr)	539
R. S. TEOTIA, T. SENGUPTA & C. DAS	

Field efficacy of some systemic fungicides in controlling mulberry leaf rust caused by <i>Aecidium mori</i> Berclay	541
Efficacité sur le terrain de fongicides systémiques contre la rouille de la feuille de mûrier provoquée par <i>Aecidium mori</i> Berclay	547
R. S. TEOTIA, C. ELANGO VAN, S. M. H. QUADRI & B. SHARATCHANDRA	

Effect of pruning time, genotypes and environmental factors on the development of <i>Aecidium mori</i> Berclay on mulberry	551
Effet de la période de taille, des génotypes et des facteurs agro-climatiques sur le développement d' <i>Aecidium mori</i> chez le mûrier	557
R. S. TEOTIA & S. K. SEN	

Note brève / Brief note

Breeding of a new artificial triploid mulberry variety 'Jialing 16'	561
Sélection d'une nouvelle variété artificielle triploïde de mûrier 'Jialing 16'	567
MAODE Y., CUNLI L., & ZHONGHUAI X.	

Bibliographie / Bibliography	571
---	------------

Instructions aux auteurs / Information for contributors	
--	--

DISINFECTION AND HYGIENE IN SERICULTURE - A REVIEW

S.N. PALLAVI & C.K. KAMBLE

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

The success in sericultural production depends much on the provision of 'germ free environment' and the credit goes to large extent to disinfection and hygiene. Disinfection is the major factor in determining the success, in the production of cocoon crop. Hygiene plays an important role in the maintenance of a pathogene free environment throughout the silkworm rearing and seed production processes. As per the saying 'prevention is better than cure', the disinfection measures and hygiene practices collectively presume the status of being prime parameters in the protection of silkworm crop, through prevention of pathogen attack. This paper describes the media and methods of disinfection, disinfecting practices as well as the measures of hygiene adopted in general, for appliances and places used for sericultural activities, to achieve the aim of prevention of silkworm diseases. Keeping in view that the diseases pose a serious threat to the sericulture industry influences the economics of cocoon crop and seed production. This paper could be of use to achieve the objective of realisation of the importance of disinfection and hygiene and implementation of the same for the faster development of the sericulture industry.

Keywords: Disinfection, physical means, chemical methods, rearing house, appliances, hygiene.

INTRODUCTION

Disinfection is the destruction and extermination of disease causing germs (Jolly, 1986). Proper disinfection is one of the key factors in determining the success of sericulture (Anonymous, 1990) and also essential in the prevention and control of silkworm diseases. (Liu and Zhong, 1988).

Hygiene implies the maintenance of cleanliness in the rearing room, rearing beds, the premises of rearing houses and egg production centres by adopting certain precautionary measures and by using physical and chemical means of disinfection measures. The aim of disinfection and hygiene is to create a pathogen free environment for cocoon production (Liu and Zhong 1988).

The type of cocoon and raw silk production, ultimately determines the quality of silk produced depends much on the success of silkworm rearing which in turn depends upon the virulent nature of the disease and affects the productivity of silkworm. In tropical conditions, out of 5 to 6 crops in a year, the sericulturists experienced 2 to 3 crop failures or poor yield due to silkworm diseases which are very high during rainy and dry months (Samson, 1985). Kotikal *et al.* (1989) studied the 'role of disinfection in silkworm management' and reported that the attack of various diseases to the silkworm leads to an annual crop loss of 30-40%, particularly in India. The diseases caused by viruses, bacteria, fungi and protozoa are known to occur in almost all the silkworm rearing areas of the world (Samson, 1992). Krishnaswamy (1993) reported that the disease together with the damage caused by pests account for 20-25% crop loss.

Thus, an effective means of increasing the production of silk and bring about an improvement in its quality, is the prevention and control of diseases. The problem of diseases can be largely overcome

by concentrating on prevention, rather than trying to control them after their outbreak (Baig, 1987). The important prophylactic measures followed are disinfection of rearing houses and equipment in addition to incubation care, feeding the larvae only with good quality mulberry leaves, management of young and late age to raise robust stock, so as to increase their vigour and level of disease resistance (Noamani *et al.*, 1989).

Keeping in view the extent of crop loss due to diseases which cause economic instability to the sericulturists, this review is made to combine all published information on disinfection and hygiene in silkworm rearing to effect more profitability in sericulture. It is expected that this review shall throw more light upon the need for disinfection and help the sericulturists, researchers, students and all those who deal with silkworms.

METHODS OF DISINFECTION

Disinfection with physical means:

The physical methods of disinfection include simple and effective physical treatments, for prevention and control of silkworm diseases (Jolly, 1986).

Disinfection by exploiting the natural sunlight can be considered as a supplementary measure for pathogen destruction. The germicidal effect of sunlight is derived from U.V. radiation which kills the pathogens (Chuan and Chang, 1988).

Another effective and economical method of disinfection for equipment is steaming. Steam under high pressure denatures the protein of the pathogen body, thereby effecting mortality (Chuan and Chang, 1988). Boiling is also a similar means. In this method, washed equipments are kept submerged in boiling water for a duration of 30 minutes and then dried (Chuan and Chang, 1988).

Burning or burying is the simplest method of disinfection wherein the diseased specimen (eggs, larvae, pupae and moths) or contaminated articles (seat paper and covering of the rearing bed with disease affected larvae) are burnt or buried deep underneath the soil (Jolly, 1986).

Several means and devices have been recommended for disinfecting the rearing house and appliances to create proper hygienic conditions suitable for successful silkworm rearing.

Use of disinfected tools and equipments, in addition to the disinfection of rearing rooms, helps to maintain a germ free environment which helps in keeping the infectious silkworm diseases under control (Jolly, 1986).

Subbaiah *et al.* (1990) reported that exposure of contaminated rearing appliances to sunlight resulted in lowering the diseases, indicating its efficacy in inactivating the pathogen. The role of disinfection followed by exposure to sunlight for the inactivation of pathogens of silkworm diseases was studied. The result showed that rearing room, trays stands and seat paper played a major role as a source of contamination and their effective disinfection resulted in reducing the disease incidence significantly.

Disinfection with chemical means:

It involves the use of different kinds of chemicals having varying effects as disinfectants. The chemicals affect the metabolism of pathogens through oxidation or reduction of tissues (Anonymous, 1975) or by denaturation and precipitation of proteins of causal organisms. It is the most effective method for elimination of germs (Chuan and Chang, 1988). Disinfection of the rearing house is done 8-10 days before starting the rearing operation (Anil Kumar, 1992).

The effectiveness of chemical disinfectant depends upon three factors i.e., the concentration, the duration and ambient temperature (Benjamin, 1987, Fujiwara *et al.*, 1992).

Some of the chemicals commonly used as disinfectants (Benjamin, 1987) are:

- Chlorine compounds - Bleaching powder and sodium hypochlorite
- Formalin
- Paraformaldehyde and
- Lime powder

Various formulations of these compounds with adjuvants are available as proprietary compounds in ready form to use (Jolly, 1986).

Disinfection with chemical substances is conducted in two methods either by spraying or through fumigation. The solutions of disinfecting chemicals are prepared as per the recommended concentrations and used as a spray for closed or open type of rearing houses depending on the chemical used whereas, fumigation is another method of disinfection involving use of the disinfecting chemicals in its volatile or gaseous form. The rooms to be fumigated should be necessarily made airtight, as the effect of fumigation depends on the swift diffusion of the vapours into all parts of air space (Jolly, 1986).

Bleaching powder also referred to as 'Chlorinated lime powder', is more useful for rearing houses or 'rearing-cum-dwelling houses' which cannot be made airtight (Jolly, 1986). It is the most suitable disinfectant for open type of rearing houses (Baig and Pradip Kumar, 1987). Subba Rao *et al.* (1992) used bleaching powder at the concentration of 5% (w/v), as spray for disinfection prior to silkworm rearing.

High power bleaching powder with 1% (w/v) of available chlorine (component with 80% chlorine) exerts a strong effect on many pathogens including Flacherie viruses, bacteria, Polyhedrosis virus, fungi causing Muscardine and Aspergillosis, as also the Pebrine spores (Chuan and Chang, 1988 and Fujiwara *et al.*, 1992).

The solution of bleaching powder for disinfection should be prepared a little before the use to ensure a satisfactory disinfecting effect, otherwise the active chlorine escapes readily reducing the efficiency of the chemical (Fujiwara *et al.*, 1992). The required volume of the solution according to the size of the rearing room and quantity of appliances, is prepared at the rate of 225 cc of 1% bleaching powder solution/sq.m (Chuan and Chang, 1988).

Sodium Hypochlorite is commonly used for washing of rearing houses and rearing equipment (Jolly, 1986, Baig and Pradip Kumar, 1987). It is reasonably stable when it contains excess of alkali (Block, 1983). Being a strong oxidising agent its disinfecting effect is due to the action of chlorine produced (Baig, 1987). Disinfection is conducted by spraying a solution of 0.5% of this chemical @ 800 cc/10 sq. m (Jolly, 1986).

Devaiah (1986) reported that of the several means for prevention, control and management of silkworm diseases, disinfection of the rearing houses and equipment, using 2% formalin at the rate of 800 cc/10 sq.m area is important.

Formalin is the most widely used disinfectant in sericulture which is effective as a spray and fumigant (Jolly, 1986, Baig and Pradip Kumar, 1987). It is also used as a medium for wash (Baig, 1987).

The commercial formalin with a strength of 35 - 38% formaldehyde has been used for disinfection of rearing room prior to brushing (rearing) because of its bactericidal and sporicidal effect and it is also used as a gaseous sterilising agent (Hoffman, 1971), but the process suffers from disadvantages, including stability of stock solutions, toxicity (threshold limit value 2 ppm/l of commercial formalin of 36%) and it is used to generate and evenly distribute the gas (Newson and Mathews, 1981).

Being an aqueous solution of formaldehyde, it has a strong reduction effect and the germicidal action caused by depriving the oxygen of the pathogens. The disinfecting efficiency of this chemical increases, as the temperature rises above 24° C (Jolly 1986, Baig and Pradip Kumar, 1987, Chuan and Chang, 1988). Its germicidal effect is mainly on nuclear polyhedrosis virus, Flacherie virus, fungi causing Muscardine, spores of Pebrine and bacteria. However, its effect is weak on cytoplasmic Polyhedrosis virus (Chuan and Chaung, 1988).

Formalin spread on the room's surface acts by contact at the same time as fumigant. The concentration of formalin required for disinfection through spraying is calculated based on the percentage of formaldehyde present (Jolly, 1986, Chuan and Chang, 1988). To disinfect an area of 10 sq. m., 800 cc of formalin is required with an addition of 250 cc for disinfection of equipment with a surface area of 9 sq. m in the same room (Jolly, 1986). A surface area of 10 sq. m requires 1000 cc of formalin solution (2%) or bleaching powder solution (5%) and a rearing room of size 6 m. length,

4.5 m. width and 3 m. height with a total surface area of 130 sq.m. requires 10.4 l of formalin or bleaching powder solution (Benjamin, 1987).

As the disinfecting efficacy of the chemical is proportional to the temperature, disinfection is conducted in the morning hours (Baig, 1987). The proper time for disinfection is 11 a.m. as the rise in temperature during the afternoon, helps in better disinfection. Formalin solution is used as a drenching spray, so that the rooms and appliances are made thoroughly wet. While preparing the formalin solution, addition of a wetting agent like 'detergent' (Teepol, Dodecyl diamino ethyl glycine, etc.) at a concentration of 0.1 - 0.2% helps in wetting, spreading and penetrating the spray solution (Jolly, 1986). The disinfection is conducted in rearing rooms made airtight (Chuan and Chang, 1988).

For disinfection through fumigation 10% solution of formaline is kept in a container, in the room to be disinfected and made airtight over a heating medium. It can also be used for fumigation by adding 8 parts of potassium permanganate to 10 parts of formalin and 13 parts of water. The boiling solution emanates the formaldehyde fumes which causes the pathogen destruction. Effective fumigation is conducted when the temperature is higher than 20° C. Higher the temperature and humidity, better is the fumigation (Jolly, 1986). Baig and Pradip Kumar (1987) have reported that the quantity of original solution of formalin required for disinfection of a particular room size is diluted 4 - 5 times and used for fumigation.

Wang *et al.* (1991) made a study on factors affecting pasteurised results of formalin, lime chloride and calcium oxide. Apart from the comparison between the stability of the organic and inorganic chloride disinfectant solution, the study also included the observation of comparative effects of solution temperature, concentration and pH value of the aforesaid chemicals and their effectiveness, individual and in combination as disinfectants for the floor of rearing rooms.

Paraformaldehyde is used for the disinfection of the rearing rooms and also as a rearing bed disinfectant. For rearing rooms, the disinfection is conducted through fumigation at the rate of 60 g of chemical per 100 cubic meter (also available as Neo pps) (Jolly, 1986). As a bed disinfectant, paraformaldehyde is used in powder form as a component of Resham Keet Oushadh or of other disinfecting chemicals (Benjamin and Nagaraj, 1987).

Fungal diseases:

Of the different kinds of muscardine, the commonest are White muscardine, Aspergillosis and Green Muscardine. Apart from disinfection of rearing rooms, the appliances particularly those where the 'White muscardine disease' has occurred are washed after disinfection and sundried before use. The diseased worms are incinerated or placed in lime jars before the conidial formation and the faeces are properly disposed off. Humidity of the rearing room is adjusted and an absorbent material is scattered around the rooms. As regards the Aspergillosis disease special attention is paid to the baking of rearing trays and appliances after disinfection as the source of pathogen is mainly mouldy objects. Trays for preserving the eggs are well ventilated and dehumidified. The preventive measures are the same as those for White muscardine (Lu Yp-lian, 1991).

Raghavaiah and Jayaramaiah (1988) reported on the efficiency of some essential oils as disinfectants of silkworm rearing equipment for the control of white muscardine fungus, (*B. bassiana* vail) besides their repellent nature to insects and phytotoxic to mulberry leaf. Of these the oil extracted from Geranium sps at the rate of 20% proved to be superior by offering 36% protection to silkworm against muscardine, followed by oil extract from the same source, at the rate of 15% and palm rose and lemon grass oil at the rate of 20% each. Coating of rearing trays with dung-slurry after treating with essential oils further helped to improve the percent protection against this disease.

Byra Reddy *et al.*, (1991), studied the comparative efficacy of rearing tray disinfectants in the prevention of white muscardine. It was revealed that artificial contamination of bamboo trays with conidia of *B. bassiana* followed by disinfection with Formalin of 1 - 1.5% concentration, bleaching powder 2% and dithane M-45 1 - 2% resulted in the lowest cumulative larval and pupal mortality (11 - 17.5%) compared to other disinfectants.

Viral diseases:

Viral diseases are the most disastrous of silkworms' diseases which could be brought under control, through integrated measures suitable to the existing conditions, such as destruction of pathogens through disinfection, breaking the transmission cycle, segregation of moulting worms, improvement in feeding and management to increase vigour and disease resistance, and selection of disease resistant varieties.

To prevent the spread of virus, disinfection is rigorously implemented immediately after harvesting the cocoons as dead worms are the most concentrated source of infection. To check the infection in the rearing trays which is the most important mode of transmission, the larval body as also the rearing trays are disinfected invariably. As regards 'Cytoplasmic polyhedrosis' and 'Infectious flacherie', disinfection of third and fourth instar larvae and rearing trays to prevent the outbreak in the fifth instar larvae is crucial. The technique of separating the moulting worms from those late moulting and rearing them in different batches is followed to reduce the risk of infection.

Selection of disease resistant silkworm varieties is of practical significance in preventing the occurrence and spread of viral disease as also reducing the economic loss. chloramphenicol feed additives have some effect in reducing the incidence of cytoplasmic polyhedrosis virus and infectious flacherie. Although research work has been done on viral interference and immunity on 'high temperature therapy' to inhibit the occurrence of cytoplasmic polyhedrosis and Infectious Flacherie in silkworm, further study is needed for these techniques before field application (Lu Yu-Lian, 1991).

Patil (1991) conducted experiments to study the efficacy of Calcium hydroxide against Cytoplasmic Polyhedrosis. He reported that 0.5% concentration of the chemical is significantly effective against cytoplasmic polyhedrosis and its effectiveness, as dependent on the concentration and duration of the treatment.

Barman (1991) studied the effect of some formulated chemical composites for controlling viral and bacterial diseases of silkworm *Bombyx mori*, L. through systematic application on the larval body and beds. Among such tested composites, combination of lime + paraformaldehyde + sodium benzoate (94:3:3) and lime + paraformaldehyde + benzoic acid (95:3:2) resulted in an overall decrease of 16.5% and 15.4% viral mortality over the control respectively. These two composites also significantly improved the effective rate of rearing.

Sarma *et al.* (1994) reported on the effect of different disinfectants, on the prevention of Nuclear Polyhedrosis of the silkworm. Five disinfectants used for the study were formalin 2%, bleaching powder 5%, asiphor 2%, steridol 2% and aldepol 2%.

The preventive efficacy of these chemicals against NPV contamination was tested in comparison with two controls i.e., (i) rearing tray with NPV contamination (and without disinfection) and (ii) tray without contamination or disinfection. All the disinfectants were effective in preventing NPV contamination with no adverse effect on larval and cocoon characters. Formalin was found to be more effective followed by bleaching powder, asiphor, steridol and aldepol. The conclusion was the suggestion of 5% bleaching powder, as an alternative to formalin for disinfection of 'rearing-cum-dwelling house' (open type) since formalin has an adverse effect on human health and is more suitable for rearing houses (closed type).

Bacterial diseases:

The bacterial diseases of silkworm tend to occur in hot and humid summer and autumn rearing seasons. Improper disinfection, accumulation of faeces in the rearing tray and improper handling of mulberry leaves lead to bacterial contamination and unsafe utilisation of bacterial pesticides may take a heavy toll.

Bacterial diseases could be brought under control by the implementation of some important measures. 500 to 1000 international units of chloromphenicol or double this quantity of syntomycin is added to the feed. During serious outbreaks the feed additive is administered every eight hours and several doses are given successively.

Mulberry pests are controlled and the use of bacterial pesticides in silkworm rearing areas is prohibited. Ventilation is increased and dehumidification is implemented through scattering of lime powder or other water absorbent material on the rearing trays. Appropriate spacing is given and care is taken to avoid injury to the worms. Overstocking of mulberry in the leaf storage room is avoided and the leaves are stored dry. Timely isolation of sick worms and disinfection of rearing bed is essential. Overall improvement of feeding and rearing management helps to bring the disease under control (Lu Yup-Lian 1991).

Mulberry leaf supplemented with 0.1 percent concentration of gentamycin, cloxacillin, streptomycin sulphate and kanamycin as a feed were found to be effective in not only increasing the survival rate but also preventing the occurrence of bacterial as also the viral diseases. (Baig *et al.*, 1990).

Eight antibiotics i.e. neomycin, chloramphenicol, tetracycline, vanomycin, oxytetracycline, kanamycin, nalidixic acid and chloro—tetracycline @ 30 mcg each, were tested against *Serratia marcescens*; among these, chloramphenicol (30 mcg) was found to be the most effective, followed by nalidixic acid, kanamycin and neomycin. Among the five disinfectants i.e., formalin, bleaching powder, sodium hypochlorite, steridol and asphor at 1-2% against *S. marcescens*, formalin was found to be the most effective followed by bleaching powder and steridol (nonyl-alkyl phenoxy ethylene oxide-iodine complex (Sam Devadas, 1991).

Samson (1987) also studied the effect of four antibiotics and five disinfectants on the incidence of flacherie and other diseases. He reported that, chloramphenicol at 100 ppm (with an inhibition zone of 4.10-4.40 mm.) and erythromycin at 50 ppm concentration (with an inhibition zone of 4.10-4.20 mm) exhibited similar inhibition to two strains of *Bacillus thuringiensis*, when tested in vitro.

He also studied the effect of disinfectants such as formalin, sodium hypochlorite, calcium hypochlorite, potassium permanganate and dust formulation with components of paraformaldehyde and benzoic acid in lime or kaolin on the incidence of flacherie and other diseases. He reported that among the five disinfectants tested formalin (of 1% concentration) proved to be the most effective against two strains of *B. thuringiensis* as well as *S. marcescens*. He stated that besides choosing an antibiotic or disinfectant, correct formulation of the compound is also essential to control the silkworm diseases effectively.

Protozoan Disease:

The pebrine disease caused by the parasitic spore of the protozoan agent *Nosema bombycis* and transmitted through oral and maternal infection causes great damage if preventive measures are not implemented giving due importance. For securing disease free eggs and avoiding losses in production, measures have been worked out for checking the quality in egg production. The fundamental measure in the control of this disease is the production of innocuous eggs which would preclude embryonic infection. (Wang San-ming, 1989).

It can be supplemented by screening unfertilised and dead eggs, newly hatched larvae and empty egg shells. During larval instar the disease is detected by testing the tardy, unequal and unmoulted larvae, moulted skin, and faecal matter and also dust from seat paper and rearing rooms. (Baig and Pradip Kumar, 1987).

Supplementary examination is conducted to ensure that the parent silkworms and newly introduced breeds are free from pebrine and at times to correct errors in the mother moth examination. Mother moth examination is an important measure for prevention of transovarially transmitted pebrine. Regulation of disinfection and exclusion of infected material are observed to prevent oral infection (Wang San-ming *et al.*, 1989).

Individual moth examination is the most efficient method of mother moth examination and is apt for reproductive seed whereas, for commercial grainages, mass examination of mother moths is the most appropriate method (Biram Saheb and Puttaswamy Gowda, 1987).

The sampling test for inspection of pebrine in moths is given in Table I.

The quality of examination is ensured to maintain the identity of mother moths by regulating and by giving importance to the process of microscopic examination (Wang San-ming, 1989).

Kagawa (1980) studied the efficacy of formalin as disinfectant against the pebrine pathogen and reported an increased death rate of spores with an increase in formalin concentration and temperature.

For keeping the pebrine disease under control, surface disinfection of silkworm eggs after the mother moth examination is an important measure in addition to the application of prophylactic methods (Baig and Pradip Kumar, 1987).

The egg sheets are dipped in 2% formalin solution for a period of 15 minutes as this practice helps in eliminating the possible risk of surface contamination of eggs by various pathogens and also increases the adhering capacity of eggs to the sheets. The sheets are subsequently dried under shade and preserved under optimum temperature (25°C) and relative humidity (of 80%). (Biram Saheb and Puttaswamy Gowda, 1989).

Table 1. Sampling test for inspection of pebrine in moths.

Tableau 1. Test d'échantillonnage pour inspecter la pébrine des papillons.

No. of moths in lot	First inspection		Second inspection		Total incidence of pebrine for rejection
	No. of moths to be inspected	No. of pebrine samples for rejection	No. of moths to be examined	No. of pebrine samples for rejection	
<i>Nombre de papillons par lot</i>	<i>Première inspection</i>		<i>Deuxième inspection</i>		<i>Incidence totale de la pébrine pour rejet</i>
	<i>Nombre de papillons examinés</i>	<i>Nombre d'échantillons pébrinés pour rejet</i>	<i>Nombre de papillons à examiner</i>	<i>Nombre d'échantillons pébrinés pour rejet</i>	
390 or below / 390 ou moins	All / Tous	1	—	—	1
391 to 500 / 391 à 500	390	1	—	—	1
501 to 600 / 501 à 600	450	1	—	—	1
601 to 700 / 601 à 700	480	1	—	—	1
701 to 800 / 701 à 800	570	2	105	2	2
801 to 1,000 / 801 à 1000	620	2	130	2	2
1001 to 2,000 / 1001 à 2000	755	2	195	2	2
2,001 to 3,000 / 2001 à 3000	865	3	500	3	3
3,001 to 4,000 / 3001 à 4000	915	4	815	4	4
4,001 to 6,000 / 4001 à 6000	955	5	1,140	5	5
6,001 to 10,000 / 6,001 à 10,000	990	6	1,500	6	6
10,001 to 30,000 / 10001 à 30000	1,030	6	1,620	6	6
30,001 and above / 30001 et plus	1,060	6	1,730	6	6

By adopting the sampling method, 99.5% of the pebrine lots contaminated with pebrine by 0.5% and 100% of the lot contaminated by more than 0.8% can be excluded (Jolly, 1986).

En adoptant la méthode de l'échantillonnage, 99,5 % des lots contaminés par la pébrine à 0,5% et 100% du lot contaminé à plus de 0,8% peuvent être exclus.

Hitoshi and Ishihara (1981) tested nine kinds of chemicals as inhibitory agents against the hatch of the pathogen spores including Hilite, which showed high degree of inhibitory effect on the spores.

Baig *et al.* (1988) tested the comparative efficacy of four disinfectants i.e., Hilite (potassium dichloro isocyanurate), sodium hypochlorite, bleaching powder and formalin in 4 different concentration (0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) were tested as surface sterilants against the spread of pebrine (*Nosema bombycis*) in a colony of silkworms, *Bombyx mori*, hatched from surface contaminated layings.

All the tested concentrations were found to be effective in preventing spreading the disease. The rate of infection ranged between 1.34% to 4.11% in treated batches whereas in control batches the

Table II. Efficacy of disinfectants on pebrine spores.

Tableaux II. Efficacité des désinfectants sur les spores de pébrine.

Chemicals <i>Produits chimiques</i>	Concentration % <i>Concentration %</i>	Actual time of killing spores <i>Temps nécessaire pour tuer les spores</i>
Mercuric chloride <i>Chlorure mercurique</i>	0.1 0.05	Within 1 minute / <i>En l'espace d'1 minute</i> Several minutes / <i>Plusieurs minutes</i>
Chlorinated lime <i>Oxyde de calcium chloré</i>	0.1 0.5	Within 1 minute / <i>En l'espace d'1 minute</i> 30 minutes
Formalin / <i>formol</i>	2 1 0.5	10 minutes 20 minutes 30-35 minutes
Hot water (60 °C) / <i>Eau chaude</i>	-	1-2 minutes

infection was 62.52% in the moth stage. The four disinfectants tested can be effectively used as surface sterilants in all the concentrations, particularly 'Hilite' as it significantly reduced the spread of pebrine infection and can be a suitable alternative surface sterilant for formalin.

It has been reported that immersing silkworm eggs in hot water, high temperature treatment of the pupae, dipping the eggs in hot hydrochloric acid and using fumagillin, benlate and baolistan supplementation feed are all efficient in controlling pebrine (Lu Yup -lian, 1991).

Steam disinfection can be tried as an alternative measure for chemical disinfection, particularly in places where chemical disinfection is not possible and pebrine incidence has already occurred. Chemotherapy can be tried as a prophylactic measure. It has been reported that feeding of mulberry leaves smeared with suspension of bavistin, benomy or thiophanate at concentrations of 10,000 - 40,000 ppm three times a day can suppress or eliminate the infection from silkworms. The concentrations recommended although too high for field application, can be tried as a safety measure in seed farms (Sarat Chandra, 1992).

The efficacy of disinfectants on pebrine spores as studied by Yokoyama in 1962, is provided in Table II. Fujiwara *et al.* (1992) have also studied the effect of some of the above disinfectants on pebrine spores.

SELECTION OF DISINFECTANTS

A disinfectant is selected by taking into consideration various factors such as effectiveness against different pathogen, simplicity, ease and swiftness of application, harmless nature to human beings and domestic animals ready availability, cheap cost, without damaging buildings and equipment (Jolly, 1986, Baig, 1987, Benchamin 1987).

Practices of disinfection:

A wide variability is found in the practices of disinfection followed in different countries. Frequent disease incidence is a major problem in tropical sericulture, where high temperatures and high humidity provide a congenial atmosphere for the multiplication of pathogens, which is compounded by the increase in the rearing frequency. Moreover the kinds of rearing houses i.e. the (open type) dwelling-cum-rearing type do not permit airtight enclosure. Hence efforts have been made to evolve disinfection practices suitable to these conditions and thus a large variability is found in the practices. The traditional chemical 'formalin' at a concentration of 2-3% is used in large scale in most of the countries, but the chemical is not convenient in situations, where rearing houses cannot be closed airtight or rearing-cum-dwelling house, as it causes discomfort to the residents. Hence, greater emphasis is laid on the use of bleaching powder. Some disinfecting chemicals are used for dual purposes. Lime powder is used to check fungal spores and decrease the humidity of litter, thereby eliminating conditions favourable for fungal multiplication (Iyengar, 1988).

In China disinfection is conducted with the objective of 'offering protection to worms from exposure to pathogens'. The main disinfectants used are as under. A solution of 2% formalin and 0.3% lime is sprayed at the rate of 125 cc/sq. m. of the area to be disinfected. Lime solution containing 1% lime powder is sprayed at the rate of 225 cc/sq. m. of the area to be disinfected. Fumigation is used with a 'chlorine fumigant powder' heated to 40° C, with an exposure time of 24 hours. Lime powder either in pure form or mixed with bleaching powder is used for disinfection (Anonymous, 1980).

In Japan, although disinfection is generally conducted through spraying, in some prefectures fumigation is resorted to. Metallic instruments are disinfected through fumigation while for wooden appliances formalin is used as spray. Fumigation is carried out using Neo-pps (Neo-pps is a combination of 55% paraformaldehyde, 22% salicylic acid and 8% orthophenylphenol) (Subba Rao, 1989).

For fumigation of the rearing rooms the temperature and humidity of rooms are maintained at 20° C, or higher and 70% or above, respectively. The equipments used for sericultural activities are disinfected by the above method only considering the make of items/material used (textile and paper articles) as these cannot withstand spraying (Nagaraj, 1989).

Various chemicals and methods are employed for disinfection of rearing rooms and appliances as a precaution against Muscardine and Aspergillosis diseases. These are:

- Spraying a mixture of 2% formalin and 0.2% aliband (aliband: 3% benzalkonium chloride + 4% dodecyl diamino ethyl glycine).
- Spraying of 'sunace' (a fungicide which acts as a surfactant) with formalin (one c.c. of formalin with 200 gms of sunace).

As a control measure against muscardine apart from fumigation with Neo-pps, spraying of 200 times diluted calcium-hypochlorite is also carried out, at the rate of 36-50 g/cubic m. (Mukerjee, 1989). Formalin spray is at the rate of 1000 c.c./ cubic m. for the spray of aliband 200-1000 times diluted solutions is used (Kasiviswanathan, 1989).

Subba Rao (1989) reported that disinfection against the Aspergillus disease is carried out through spraying, 3% benzalkonium chloride + 4% dodecyl diamino ethyl glycine.

For the prevention of bacterial diseases disinfection of rearing rooms and appliances is given emphasis whereas, for viral disease prevention apart from disinfection, care on the management of environmental conditions is given importance to. Preventive measures against pebrine include in

addition to thorough disinfection, removal of the source of infection and strict examination of mother moth (Kasiviswanathan, 1989).

As reported by Rajan in 1994, in Japan disinfection is conducted twice using concentrated (3.7%) formalin. The first disinfecting operation is without cleaning the rearing rooms and equipment. Formalin is sprayed at high pressure for a period of 5-6 hours to permit the pathogens' spread outside the rearing house to the field. The equipments and rearing houses are later thoroughly washed with lime and bleaching powder to destroy the viral bodies followed by sundrying of the equipments. Cocooning frames - one of the most contaminated rearing equipments which are disinfected by piling up over a vinyl sheet in a container with formalin and covered with another vinyl sheet. The second disinfection is also done with concentrated formalin after washing and arrangement of equipment inside the rearing house. Later, a pathogen test on the dust collected from rearing house is conducted. If a pathogen presence is revealed, disinfection is conducted once more.

In Laos, Thailand and Philippines formalin plays the role of the most commonly used disinfectant while in Indonesia sodium hypochlorite mixed with formalin is used. The solution has the proportion of 2.5-3.0 litres of sodium hypochlorite per 200 litres of formalin and is used as spray for the rearing room and appliances.

In all sericultural countries, there is an increased tendency to use chlorine compounds as disinfectants to control silkworm diseases.

Bed disinfectants used in China:

Wang *et al.* (1991) studied the efficacy of 'Duomeijing' a muscardine preventing powder. The study indicated that 500 to 1000 ppm solution of the disinfectant could effectively destroy the pathogenic fungi of silkworm. At a concentration of 5%, 'Duomeijing' showed good effect on the rearing bed and its preventive efficacy on the fungi reached above 93%. It was also stated that through oral and dermal toxicity test the preparation had no corrosive property and also did not cause any harm to silkworms physiology and economic characters.

Huang *et al.* (1992) reported on the effect of an organic compound 'Quanshawei' on silkworm pathogens. The use of this disinfectant powder showed remarkable effect on the polyhedra fungi, bacteria and pebrine pathogen at 400 times, 800 times and 1600 times of aqueous solution respectively. Also it is widely used for the disinfection of rearing houses and appliances at 250 times aqueous solution and mulberry leaves at 800 times aqueous solution. It is recommended that although the powder is very powerful it should be used within 5 hours after preparation to avoid reducing its effect on the pathogen.

Bed disinfectants used in Japan:

Certain chemical substances are used as silkworm bed disinfectants. These are kabinoran powder (2% tetrachloroisophthalonitrile - TPN and 2% ethylen - bis - dithiocarbomatomanganese - Maneb), Pafsol powder (3.3% paraformaldehyde) and kinubon powder (5% of 8 hydroxy quinolinestrontium salt). Infected silkworms are picked up from the rearing bed and disinfected with chemicals or buried deeply in the ground before sporulation of the fungi on the mummified larvae. Apart from aliband and sunace, chemichlon (3.5% potassium hypochlorite and 96.5% calcium hydroxide), Shinsei dust (4% salicylic acid + 0.4% pentachlorobenzyl alcohol) and acid clay, sosan - S (5% H. benzoic acid and clay) are used for dusting on the silkworm beds.

Dosage of kabinoran powder is as given below:

I instar -	1 gm per 0.1 sq.m. before 1st feeding and once again.
II instar -	2 gm per 0.1 sq.m. after moulting
III instar -	3 gm per 0.1 sq. m. after moulting
IV instar -	4 gm per 0.1 sq.m. after moulting
V instar -	5 gm per 0.1 sq.m 2 to 3 times.

(Kasiviswanathan, 1989)

Table III. General prophylactic measures against silkworm diseases during rearing.

Tableau III. Mesures générales prophylactiques contre les maladies du ver à soie pendant l'élevage.

Mixture / chemicals	Method/concentration/time of application etc.	Purpose
Mélange / Produits chimiques	Méthode/concentration/période d'application	Usage
1. Formalin + Chaff <i>Formol + paille</i>	After one thin feeding in each instar I-III age 0.6%. IV-V age 0.8%. Quantity to cover the bed area uniformly <i>Après les avoir nourris légèrement à chaque âge</i> Age I-III 0.6%. Age IV-V 0.8%. <i>La quantité devant couvrir la litière de manière uniforme.</i>	Against Muscardine <i>Contre la muscardine</i>
2. Captan + Kaolin	After cleaning when there is no leaf in the bed. I-III age once, 1 g. captan + 99 g Kaolin. IV & V age, twice 2 g captan + 98 g Kaolin. 10 g mixture/sq.m. (I-III) 16.7 g mixture/sq.m. (IV & V age) <i>Après nettoyage quand il n'y a pas de feuilles dans la litière.</i> Age I-III une fois 1 g de captan + 99 g. Kaolin. Age IV & V, deux fois 2 g de captan + 98 g Kaolin, 10 g mélange/m ² . (Age I-III) 16.7 g de mélange/m ² . (Age IV & V)	Against Muscardine <i>Contre la muscardine</i>
3. Dithane M45 + kaolin	Time & method of application as captan + kaolin mixture. I-III age once. 10 g/sq.m. Age IV & V twice 16.7 g/sq.m. Apply just after moult. <i>Période et méthode d'application comme pour le mélange</i> <i>captan + kaolin. Age I-III une fois, 10 g/m².</i> <i>Age IV & V deux fois 16.7 g/m²</i> <i>Appliquer juste après la mue.</i>	Against Muscardine <i>Contre la muscardine</i>
4. Reshamkeet Oushadh	I-III age once. 10 g/sq.m. IV & V age twice 16.7 g/sq.m. Apply just after moult. <i>Une fois à l'âge I-III 10 g/m².</i> <i>Age IV & V : deux fois 16.7 g/m².</i> <i>Appliquer juste après la mue.</i>	Against Grasserie <i>Contre la grasserie</i>
5. Slaked lime Chaux détrempée	I-III age 10g/sq.m. IV & V age 16.7 g/sq. m during moult <i>Age I-III 10 g/m². Age IV & V: deux fois 16,7 g/m²</i> <i>pendant la mue.</i>	To keep the rearing beds dry <i>Pour conserver</i> <i>les litières sèches.</i>
6. Uziicide Insecticide contre la mouche uzi	III age, once, 25cc/sq.m. IV age, once (3rd day) 25 cc/sq.m. age, twice 25 cc/sq. m. (3rd & 5th day) <i>Age III, une fois, 25 cc/m².</i> <i>Age IV, une fois (3ème jour) 25 cc/m²</i> <i>Age V, deux fois 25 cc/m² (3ème et 5ème jours)</i>	Against uzi fly eggs on silkworms <i>Contre les oeufs de la</i> <i>mouche Uzi</i> <i>sur les vers à soie</i>

Bed disinfectants used in India:

Subba Rao *et al* (1992) used lime and lime + bleaching powder mixture as bed disinfectants on silkworm larvae inoculated with pathogens of grasserie and muscardine diseases. Lime and lime + bleaching powder effectively inactivated the NPV and increased the survival up to 16.6 and 17.5% respectively over the control. Similarly lime - bleaching powder (97:3) increased the survival by 20.75% over the control in the muscardine infected population.

The other bed disinfectants used in India are enlisted in Table 3.

Microbial control of bacterial and viral diseases:

In Japan, successful efforts have been made for microbial control of bacterial and viral diseases. Such efforts were concerned with the utilisation of pathogenic fungi. Since 1961, in addition to fungi and bacteria, viruses are also being used as effective tools. The utilisation of cytoplasmic polyhedrosis virus which causes cytoplasmic polyhedrosis in pine caterpillar is also experimented with successful results. *Bacillus thuringiensis* has shown effectiveness for the control of various injurious insects i.e., common cabbage worm, sweet potato leaf worm etc. *B. thuringiensis* serotype, 3a, 3b, 7, 9 and 10 showed various degrees of toxicity types to cotton leaf worm and the bioassay of silkworm revealed that the toxicity (LD:50) to the cotton leaf worm was 10^8 spores/c.c and in case of third instar silkworm larvae the LD:50 was 4.5×10^3 spores/larva. Four *Bacillus thuringiensis* serotypes which vary from low to high toxicity to silkworm are used in formulation of preparation (Nagaraj, 1989).

HYGIENE

Hygiene as mentioned earlier, implies the maintenance of cleanliness in and around the places where sericultural activities are conducted and also that of appliances used therein. It assumes greater importance from the view point of crop protection through disease prevention.

Maintenance of hygienic conditions during rearing helps in preventing the entry of disease causing germs from outside and also checks the spread of diseases (Jolly, 1986; Benchamin 1987; Lin and Zhong 1988; Anonymous, 1990). The general recommendations are:

Entry to the rearing house should be restricted to few members. Persons entering the rearing house should wipe their feet on a foot mat and wash their hands. During rearing the diseased and dead worms for disposal should be put into lime Vats as it could become a source of infection (Jolly, 1986; Benchamin, 1987; Chuan and Chang 1988). Disinfectants like formalin, disinfection of hands, bleaching powder or freshly prepared slaked lime is sprinkled on a gunny cloth placed on the foot mat at the entrance of the rearing house or the foot mat is kept wet by spraying 2% formalin solution. Fresh lime should be used to sprinkle all around the rearing house. Use of 1% solution of formalin should be avoided.

Cleaning of rearing beds should be done preferably with nets to prevent contamination. The nets should be disinfected in formalin solution, washed in water and dried. While bed cleaning care must be taken to prevent dropping of litter on the rearing floor. Immediately after cleaning the room should be swept and the rearer who performs this work should wash hands and feet. Trays in which disease worms are found in large numbers should be replaced with a disinfected tray followed by disinfection of the tray used earlier. Crevices of rearing room should be closed to check the entry and accumulation of litter along with the pathogens. The litter compost pit should be away from the rearing house. Rearing equipment should not be borrowed or lent and should be disinfected before use. The paraffin paper and seat paper used for rearing once should be burnt. The young worms and late age worms should not be reared in the same room and overlapping rearings should be avoided. (Jolly 1986; Benchamin 1987; Baig 1987).

To avoid the entry of pathogens, the floor, corridors, entrance/exit of the rearing rooms and leaf storage room are disinfected by spraying of bleaching powder solution containing 1% effective chlorine at 3-4 days interval. The containers for leaf transportation and litter disposal should be separate and disinfected with bleaching powder (Chuan and Chang, 1988).

In case of seed production centres, the cold room for moth preservation should be separated from the hibernation and incubation rooms and persons entering the egg preservation room and handling the disinfected seed should wash their hands (Jolly, 1986).

Practices of hygiene:

In India, a foot cleaning tray containing a disinfectant soaked pad is used to prevent pathogen's entry through foot wear. In addition, washing of hands in a mild disinfectant before entering the rearing house is also given emphasis.

In China, bleaching powder is sprayed on the floor, at the entry and exit of the rearing room, once in 3-4 days. A mat sprinkled with a mixture of lime and bleaching powder, is kept at the entrance, to disinfect the feet. Dead larvae are invariably disposed into a container with lime. In this country, lime plays a major role in maintaining hygienic conditions.

In Japan, hygiene practices are given due importance and attention. The surroundings like those of rearing room, litter disposal place, mulberry leaf storage etc., are disinfected with high power bleaching powder, formalin or the like. The workers follow strict hygiene practices before entry to the rearing room, or handling of worms etc. (Iyengar, 1988).

CONCLUSION AND PROSPECTS

Although formalin has the status of being used as the most common disinfectant in India and other countries, it has certain disadvantages where the complete disinfection is not possible as far as open type of rearing house is concerned. Similarly when used for disinfection of rearing equipment and closed type of rearing houses, it causes discomfort to the residents and livestock, specially breathing difficulty, and causing irritation to the eyes. Therefore 5% bleaching powder is utilised as an alternate effective disinfectant. It is used for closed type as well as dwelling cum rearing houses. However, the chemical has the disadvantage of being corrosive in nature, affecting the metallic appliances used for rearing as also the household articles in the latter type of rearing houses, while it is more suitable for wooden and plastic appliances.

Keeping in view the drawbacks of the common disinfectants as briefed above, the need of the day is to evolve a disinfectant which can be effectively used both in closed type as well as dwelling cum rearing houses which does not cause any health hazard and does not have corrosive properties.

Further, in order to make substantial achievement in the prevention and control of silkworm diseases in addition to practicing disinfection and hygiene stated above, it is essential to exploit the biological techniques such as immunological studies on silkworm diseases caused by bacteria, fungi, virus and protozoa etc.

REFERENCES

- ANIL KUMAR, K.H. (1992) Disinfection of the rearing house. *Indian Text. J.*, 103 (1), p 134.
- ANONYMOUS (1975) Text Book of tropical sericulture. Japan Overseas Co-operative Volunteers, Hiroo Sibuya-Ku, Tokyo, Japan, 4-2, 24.
- ANONYMOUS (1980) Report on FAO/UNDP study tour to People's Republic of China. FAO Agricultural Services Bulletin, p.46
- ANONYMOUS (1990) Handbook of pest and disease control of mulberry and silkworm. ESCAP UN - Thailand, p. 65.
- BAIG M. (1987) Silkworm diseases and their prevention. A hand book for Sericulture Extension Workers. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. p. 168 -183
- BAIG M., PRADIP KUMAR (1987) Silkworm diseases and pests. Chapter V: Appropriate Sericulture Techniques. International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Mysore. p. 127 -132

- BAIG M., SAMSON M.V., SHARMA S.D., BALAVENKATASUBBAIAH, SHASHIDHARAN T.O., JOLLY M.S. (1988) Effect of certain disinfectants as surface sterilants against pebrine in surface contaminated layings. *Sericologia* 28(1), p. 81 - 87.
- BAIG M., NATARAJU B., SAMSON M.V (1990), Studies on the effect of antibiotics performance and loss due to diseases in silkworm *Bombyx mori* L. *Ind. J. Seric.*, 29(1), 54 -58.
- BARMAN A.C., (1991) Effect of some formulated chemical composites for controlling bacterial and viral diseases of silkworm *Bombyx mori* L. Bangladesh Sericultural Research & Training Institute, Bangladesh, *Bull. Sericult Res.* 2, p 62-66.
- BENCHAMIN K.V. (1987) Disinfection and hygiene. A hand book for Sericulture Extension Workers. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p.87-92.
- BENCHAMIN K.V., NAGARAJ C.S. (1987) Silkworm Rearing Techniques, Chapter 4, Appropriate Sericulture Techniques. International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Mysore, p 100.
- BIRAM SAHEB, PUTTASWAMY GOWDA (1987) Silkworm seed technology, Chapter III, Appropriate Sericulture Techniques. International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Mysore, p. 36-60.
- BLOCK S.S. (1983) Antiseptics & Disinfectants. Part 2.: Book on Disinfection, sterilisation and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia, p 167.
- BYRA REDDY, DEVAIAH M.C, NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R., & SHYAMALA M.B. (1991). Comparative efficacy of some rearing tray disinfectants in prevention of silkworm white muscardine caused by *Beauveria bassiana*. *Sericologia*, 31(3), p. 533-535.
- CHUAN WU PANG, CHUNG CHENDA (1988) FAO Agricultural Services Bulletin, 73/2, Regional Sericulture Training Centre, Guangzhou, China, p.17-21.
- DEVAIAH M.C. (1986) Silkworm Diseases, Lectures on Sericulture. Suramya Publishers, Bangalore, p 157-165.
- FUJIWARA T., KUMARI KV.V.A.L., NAGESWARA RAO S. (1992) Pebrine and its control, disinfection for pebrine disease. Bivoltine Sericulture Technology Development Project in India, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 9.
- HITOSHI I., ISHIHARA R. (1981), Inhibitory effect of several chemicals against the hatch of *Nosema bombycis* spores. *J. Sericult. Sci.*, Japan 50, p. 276-281.
- HOFFMAN R.K. (1971) Toxic gases. IN: Inhibition and destruction of the microbial cell. Ed. Hugo U.B. London and New York. Academic Press, p. 226.
- HUANG-KW, LU-YU, QIN-UX, SHEN-ZY. (1992) Effect of disinfectant 'Quashawei' on the silkworm pathogens. *Canye Kexue*, Zhenjiang, China, 18(4), p 232-236.
- IYENGAR M.N.S., NAGARAJ C.S., REDDY S.S.(1988) Silkworm rearing techniques in tropics. International Congress on Tropical Sericulture Practices, Bangalore.
- JOLLY M.S. (1986) Disinfection and hygiene, Pebrine and its control. Bulletin No. 5, CSRTI, Mysore p.22-29.
- KAGAWA, T. (1980) The efficacy of formalin as disinfectant of *Nosema bombycis* spores. *J. Sericult. Sci. Japan*, 48, p. 218-222.
- KASIVISWANATHAN K. (1989) Sericulture in Japan. Training Report, Sericulture in Japan and South Korea, Central Silk Board, Bangalore Vol. II, p 1148-1151.
- KOTIKAL Y.K., REDDY D.N.R., SUBBARAYUDU B.V. (1989) Role of disinfection in silkworm management. *Indian Silk*, 27 (11), p.31-32.
- KRISHNASWAMY S. (1993) Special features of Tropical Sericulture and five crucial steps to successful silkworm rearing. *Indian Silk*, 31(9), p 27-34.
- LIU S.X., ZHONG W.B., (1988). The research channels in the prevention and control of silkworm diseases; review. *Sericologia*, 29(3), p 287-295.
- LU YUP-LIAN, LIU FU-AN (1991) Silkworm diseases. FAO Agricultural Services Bulletin: 73(4), p24-25.
- MUKERJEE P.K. (1989) Control of diseases and pests of silkworm. A technical report, Sericulture in Japan and South Korea, Central Silk Board, Bangalore, Vol. I, p.357-358.

- NAGARAJ C.S. (1989) Control of disease and pests. A technical report: Sericulture in Japan and South Korea, Central Silk Board, Bangalore, Vol. II, p. 1055-1058..
- NEWSON S.W.B., MATHEWS J. (1981) *In*: Disinfectants their role and evaluation of effectiveness. Ed: A.C.H. Collins, M.C. Alwood, Sally F. Bloom field and A. Fox London, New York, Academic Press, p. 61.
- NOAMANI M.K.R., BAIG M., PRADIP KUMAR & SENGUPTA K. (1989) Silkworm disease and pest control. Workshop on sericulture extension and management. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 159.
- PATIL C.S. (1991) Studies on the evaluation of 'Calcium hydroxide against cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm *Bombyx mori* L.' Entomon 16(2), p 147-150.
- RAGHAVIAH & JAYARAMIAH M. (1988) Efficacy of some essential oils as disinfectants of silkworm rearing equipment. Indian Perfumer, 32(2), p. 113-115.
- RAJAN R.K. (1994) Disease control measures during silkworm rearing. Report on technical training in Japan under JICA programme. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p. 38-44.
- SAMSON M.V. (1987) Silkworm rearing and diseases. Lead paper: In National Workshop on sericulture, Bangalore.
- SAMSON M.V. (1987) Bacterial diseases of silkworm and their control, Ph.D thesis submitted to the University of Mysore, p. 123-127.
- SAMSON M.V. (1992) Silkworm crop protection. 'National conference on mulberry sericulture research' at CSRTI, Mysore.
- SAMDEVADAS (1991) Some studies on the pathology of 'Serratia marcescens' in silkworm *Bombyx mori* L., Dissertation submitted to the International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture, Mysore, p. 35.
- SARAT CHANDRA T. (1992) A few suggestions for the control of pebrine. Indian silk. 30 (12) p.20-21.
- SARMA B.J., SAMSON M.V., SUBBAIAH M.B.V. & DATTA R.K. (1994) Effect of different disinfection on the prevention of nuclear polyhedrosis of the silkworm *B. mori* L., Indian Journal of Sericulture, 34(2), 265-270.
- SUBBAIAH, M.B.V., SHARMA S.D., BAIG M., SINGH B.D., VENKATAREDDY S., NOAMANI M.K.R. (1990) Role of disinfection of rearing appliances and sunlight exposure on the inactivation of disease causing pathogen of silkworm *B. mori* L., Indian Journal of Sericulture, 28 (2), 200-206.
- SUBBA RAO G. (1989) Report on Japanese Sericulture. Sericulture in Japan and South Korea, Vol. I, p. 302.
- SUBBA RAO G., CHANDRA A.K., BHATTACHARYA J. (1992) Effect of bleaching powder and lime against grasserie and muscardine diseases of the silkworm *B. mori* L. Indian J. Seri., 31(1), p.37-40.
- WANG SAN MING, LI PING-YI, PAN RUN-SHI, OU BING-SEN (1989) Examination for the prevention of pebrine disease. Chapter 6: Silkworm egg production. FAO Agricultural Services Bulletin, Vol. 111, 73(3), p. 39-42.
- WANG, YU-XING, MOU ZHI-MEI, WANG HONG LI, ZHANG LI DONG, LIU, SHU-QUI & YANG QUING (1991) Study on factors affecting pasteurised results of formalin, lime chloride and calcium oxide. Canye Kexue, 17(4): p. 212-216.
- YOKOYAMA T. (1962) Synthesised science of sericulture. Central Silk Board, Bombay, India.

LA DESINFECTION ET L'HYGIENE EN SERICICULTURE

S. N. PALLAVI & C. K. KAMBLE

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

Le succès de la production séricicole dépend en grande partie de l'obtention d'un environnement sans germes et le profit d'une désinfection et d'une hygiène à grande échelle. La désinfection est le facteur principal déterminant le succès dans la récolte de cocons. L'hygiène joue un rôle pour maintenir un environnement sans pathogènes pendant l'élevage du ver à soie et les étapes de la production de graines. Comme d'après le proverbe « Il vaut mieux prévenir que guérir », les mesures de désinfection et les pratiques d'hygiène sont sur le plan collectif des paramètres majeurs de protection des récoltes, par la prévention des attaques pathogènes. Cet article décrit les moyens et les méthodes de désinfection, les pratiques de désinfection tout comme les mesures d'hygiène adoptées en général pour les ustensiles et les endroits utilisés pour les activités séricicoles, dans le but de prévenir les maladies des vers à soie. Le fait que les maladies soient une menace sérieuse pour l'industrie séricicole influence l'économie de la production de cocons et de graines. Cet article pourrait être utile pour prendre conscience de l'importance de la désinfection et de l'hygiène et de leur application pour un développement plus rapide de l'industrie séricicole.

INTRODUCTION

La désinfection est la destruction et l'extermination de germes qui entraînent des maladies (Joli, 1986). Une véritable désinfection est l'un des facteurs clé déterminant le succès en sériciculture (Anonyme, 1990) et elle est essentielle dans la prévention et la maîtrise des maladies du ver à soie (Liu et Zhong, 1988).

L'hygiène implique le maintien de la propreté dans la pièce d'élevage, dans les litières d'élevage, les locaux d'élevage et les centres de production d'oeufs, par l'adoption de certaines mesures de précaution et l'utilisation de moyens physiques et chimiques comme mesures de désinfection. Le but de la désinfection et de l'hygiène est de créer un environnement sans pathogènes pour la production de cocons (Liu et Zhong, 1988).

Le type de production de cocons et de soie grège détermine en dernier lieu la qualité de la soie produite et dépend beaucoup du succès de l'élevage des vers, qui à son tour dépend de la virulence de la maladie qui affecte la productivité du ver à soie. Dans des conditions tropicales, sur 5 ou 6 récoltes par an, les sériculteurs connaissent 2 à 3 échecs ou une perte en rendement causés par les maladies sont très élevées pendant les mois pluvieux et les mois secs (Samson, 1985). Kotikal et coll. (1989) ont étudié le « rôle de la désinfection dans l'élevage des vers à soie » et ont signalé que les attaques de maladies variées sur les vers à soie provoquent une perte de récolte annuelle de 30-40 %, particulièrement en Inde. Les maladies provoquées par les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires sont répandues dans presque toutes les zones d'élevage du ver à soie du monde (Samson, 1992). Krishnaswamy (1993) a signalé que la maladie et les dommages causés par les insectes représentent 20 à 25 % des pertes de récolte.

Ainsi, un des moyens efficaces pour augmenter la production de soie et améliorer sa qualité consiste en la prévention et en la maîtrise des maladies. On peut largement régler le problème des maladies en se concentrant sur leur prévention plutôt qu'en essayant de les maîtriser après leur arrivée

(Baig, 1987). Les grandes mesures prophylactiques suivies sont la désinfection des magnaneries et de l'équipement, le soin apporté pendant l'incubation, la nourriture des larves à partir seulement de feuilles de mûrier de bonne qualité, la gestion des jeunes âges et des âges mûrs pour élever des lignées robustes, de manière à augmenter leur vigueur et leur niveau de résistance à la maladie (Noamani et coll., 1989).

Cette étude a été réalisée en vue de rassembler toute l'information publiée sur la désinfection et l'hygiène dans l'élevage du ver à soie, dans le but d'augmenter les profits en sériciculture, compte tenu de l'étendue des pertes de récoltes dues aux maladies entraînant une instabilité économique pour les sériciculteurs. Nous pensons que cette étude mettra en évidence le besoin de désinfection et aidera les sériciculteurs, les chercheurs, les étudiants et tous ceux qui s'occupent du ver à soie.

METHODES DE DESINFECTION

Désinfection avec des moyens physiques :

Les méthodes physiques de désinfection comprennent des traitements physiques simples et efficaces pour la prévention et le contrôle des maladies du ver à soie (Jolly, 1986).

La désinfection en exploitant la lumière solaire naturelle peut être considérée comme une mesure supplémentaire de destruction des pathogènes. Les effets germicides de la lumière solaire dérivent des radiations U.V., qui tuent les pathogènes (Chuan et Chang, 1988).

Une autre méthode efficace et économique de désinfection de l'équipement est l'étuvage à la vapeur sous haute pression qui dénature les protéines des pathogènes, ce qui entraîne leur mortalité (Chuan et Chang, 1988). L'ébullition est aussi un moyen similaire. Par cette méthode, l'équipement lavé est maintenu dans l'eau bouillante pendant une durée de 30 minutes puis séché (Chuan et Chang, 1988).

La méthode la plus simple de désinfection consiste à brûler ou enterrer profondément dans le sol les spécimens malades (oeufs, larves, chrysalides et papillon) ou les articles contaminés (papiers de siège, couvertures des litières d'élevage avec les larves malades) (Jolly, 1986).

Plusieurs moyens et techniques de désinfection des magnaneries et des ustensiles ont été recommandés pour créer de véritables conditions d'hygiène adaptées pour la réussite de l'élevage de vers à soie.

L'utilisation d'outils et d'équipements désinfectés, en plus de la désinfection des pièces d'élevage aide à maintenir un environnement sans germes, ce qui aide à contrôler les maladies infectieuses du ver à soie (Jolly, 1986).

Subbaiah et coll., (1990) ont signalé que l'exposition des ustensiles d'élevage contaminés au soleil provoque la baisse des maladies, ce qui témoigne de son efficacité à inactiver les pathogènes. Le rôle de la désinfection suivie par l'exposition au soleil quant à l'inactivation des pathogènes de maladies du ver à soie a été étudié. Les résultats montrent que la pièce d'élevage, les supports de plateaux, le papier des sièges sont une source majeure de contamination et leur désinfection efficace permet de réduire l'incidence de la maladie de manière significative.

Désinfection avec des moyens chimiques :

Cela implique l'utilisation de différents types de produits chimiques qui ont des effets variés comme désinfectants. Les produits chimiques affectent le métabolisme des pathogènes par l'oxydation ou la réduction des tissus (Anonyme, 1975) ou par la dénaturation et par la précipitation des protéines des organismes. C'est la méthode la plus efficace d'élimination des germes (Chuan et Chang, 1988). On procède à la désinfection de la magnanerie 8 à 10 jours avant le début du cycle d'élevage (Anil Kumar, 1992).

L'efficacité des désinfectants chimiques dépend de trois facteurs : la concentration, la durée et la température ambiante (Benchamin, 1987, Fujiwara et coll., 1992).

Certains des produits chimiques communément utilisés comme désinfectants sont (Benchamin, 1987) :

- Les composés de chlore - Chlorure de chaux et hypochlorite de sodium
- Le formol
- Paraformaldéhyde
- La poudre de chaux

Plusieurs formulations de ces composés avec adjuvants sont disponibles comme spécialités prêtes à l'emploi (Jolly, 1986).

La désinfection avec des substances chimiques s'effectue selon deux méthodes, soit par pulvérisation ou par fumigation. Les solutions de désinfectant chimique se préparent selon les concentrations recommandées et sont utilisées en vaporisation pour les magnaneries de type ouvert ou fermé en fonction des produits chimiques utilisés tandis que la fumigation est une autre méthode de désinfection, qui implique l'utilisation des désinfectants chimiques sous forme volatile ou gazeuse. Les pièces à fumiger doivent être rendues hermétiques, l'effet de la fumigation dépendant de la diffusion rapide des vapeurs dans l'air.

La chlorure de chaux que l'on appelle aussi «poudre de chaux chlorée », est plus utile pour les magnaneries ou les maisons d'élevage habitées qui ne peuvent être rendues hermétiques (Jolly, 1986). C'est le désinfectant le plus adapté pour les magnaneries de type ouvert (Baig et Pradip Kumar, 1987). Subba Rao et coll., (1992) ont utilisé du chlorure de chaux en concentration de 5 % (w/v) comme vaporisation de désinfection, avant l'élevage.

Le chlorure de chaux très puissant avec 1 % (w/v) de chlore disponible (composant avec 80 % de chlore) exerce un effet efficace sur de nombreux pathogènes y compris le virus de la Flacherie, les bactéries, le virus de la Polyedrose, les champignons causant la muscardine et l'aspergillose et aussi les spores de pébrine (Chuan et Chang, 1988 et Fujiwara et coll., 1992).

La solution de chlorure de chaux de désinfection doit être préparée peu avant d'être utilisée pour assurer un effet désinfectant satisfaisant, autrement le chlore actif s'échappe rapidement, ce qui réduit l'efficacité du produit chimique (Fujiwara et coll., 1992). Le volume de solution nécessaire par rapport à la taille de la pièce d'élevage et le nombre d'ustensiles, se calcule à la dose de 225 cc de solution de chlorure de chaux 1 % /m² (Chuan et Chang, 1988).

L'usage d'hypochlorite de sodium est répandu pour nettoyer les magnaneries et les équipements (Jolly, 1986 ; Baig et Pradip Kumar, 1987). Il est assez stable quand il contient un excédent d'alcali (Block, 1983). Comme c'est un oxydant puissant, son effet désinfectant est dû à l'action produite par le chlore (Baig, 1987). On procède à la désinfection en vaporisant une solution à 0,5 % de ce produit chimique à raison de 800 cc/10 m² (Jolly, 1986).

Devaiah (1986) a observé que parmi les différents moyens de prévention, de contrôle et de gestion des maladies du ver à soie, la désinfection des maisons d'élevage et de l'équipement, en utilisant de la formaline à 2 % selon la dose 800 cc/10 m² est importante.

Le formol est le désinfectant le plus utilisé en sériciculture et il est efficace en pulvérisation et en fumigation (Jolly, 1986 ; Baig et Pradip Kumar, 1987). On l'utilise aussi pour le nettoyage (Baig, 1987).

La formaline commerciale à 35-38 % de formaldéhyde est utilisée pour désinfecter les pièces d'élevage avant la levée des vers à soie (élevage) à cause de son effet bactéricide et sporicide et il est aussi utilisé comme agent stérilisateur gazeux (Hoffman, 1971) mais le procédé présente des inconvénients dont la stabilité des solutions mère, la toxicité (valeur limite de 2 ppm/l de formaline commerciale à 36 %) et est utilisé pour produire et distribuer le gaz de manière égale (Newton et Mattes, 1981).

En tant que solution aqueuse de formaldéhyde, il a un effet de réduction puissant et son action germicide s'effectue en privant les pathogènes d'oxygène. L'efficacité de la désinfection augmente quand la température dépasse 24 °C. (Jolly, 1986 ; Baig et Pradip Kumar, 1987 ; Chuan et Chang, 1988). Il a un effet germicide principalement sur le virus de la polyedrose nucléaire, le virus de la Flacherie, les champignons responsables de la Muscardine, les spores de Pébrine et les bactéries. Cependant, il a un faible effet sur le virus de la polyedrose cytoplasmique (Chuan et Chang, 1988).

La formaline répandue sur la surface de la pièce agit à la fois au contact et comme fumigant. La concentration de formaline nécessaire à la désinfection par vaporisation se calcule à partir du taux de formaldéhyde présent (Jolly, 1986 ; Chuan et Chang, 1988). Pour désinfecter une surface de 10 m², il faut 800 cc de formaline avec 250 cc supplémentaires pour la désinfection de l'équipement pour une surface de 9 m² dans la même pièce (Jolly, 1986). Il faut 1000 cc de solution de formaline (2 %) ou de solution de chlorure de chaux (5 %) pour une surface de 10 m² et il faut 10,4 l de formaline ou de solution de chlorure de chaux pour une pièce d'élevage de 6 m de long, 4,5 m de largeur et 3 m de haut pour une surface totale de 130 m² (Benchamin, 1987).

L'efficacité de désinfection du produit chimique étant proportionnelle à la température, la désinfection s'effectue le matin (Baig, 1987). L'heure de désinfection appropriée est 11 heures du matin car la température s'élève pendant l'après-midi et permet une meilleure désinfection. La solution de formaline est brumisée afin que les pièces et les ustensiles soient convenablement mouillés. Pendant la préparation de la solution de formol, l'adjonction d'un mouillant tel qu'un détergent (Teepol, Dodecyl diamino éthyle glycine, etc...) à une concentration de 0,1 -0,2 % facilite l'humidification, la répartition et la pénétration de la solution vaporisée (Jolly, 1986). On procède à la désinfection dans des pièces d'élevage rendues hermétiques (Chuan et Chang, 1988). Pour la désinfection par fumigation, on met 10 % de solution de formaline dans un récipient au-dessus d'une source de chaleur, dans la pièce à désinfecter rendue hermétique. On peut aussi l'utiliser pour la fumigation en ajoutant 8 parts de permanganate de potassium à 10 parts de formaline et 13 parts d'eau. La solution en ébullition répand des vapeurs de formaldéhyde qui provoque la destruction du pathogène. Une fumigation s'effectue quand la température est au-dessus de 20 °C. Plus la température et l'humidité sont élevées, meilleure est la fumigation (Jolly, 1986). Baig et Pradip Kumar (1987) ont signalé que la quantité de solution originelle de formaline nécessaire à la désinfection d'une pièce de grandeur particulière se dilue 4 - 5 fois et s'utilise pour la fumigation.

Wang et coll., (1991) ont fait une étude sur les facteurs affectant les résultats de la formaline, du chlorure de chaux et de l'oxyde de calcium. En plus de la comparaison de la stabilité de la solution désinfectante de chlore organique ou inorganique, l'étude inclut l'observation des effets comparatifs de la température de la solution, de la concentration et de la valeur pH des produits chimiques cités plus hauts et de leur efficacité individuelle et groupée comme désinfectants des sols des pièces d'élevage.

La paraformaldéhyde s'utilise comme désinfectant des pièces d'élevage et des litières. Pour les pièces d'élevage, on effectue la désinfection par fumigation avec une dose de 60 g de produit chimique pour 100 mètres cubes (disponible aussi comme Neo pps) (Jolly, 1986). La paraformaldéhyde s'utilise sous forme de poudre en tant que désinfectant de litière, comme composant de Resham Keet Oushadh ou d'autres produits chimiques désinfectants (Ranchamin et Nagaraj, 1987).

Maladies fongiques :

Parmi les différents types de muscardine, les plus courants sont la muscardine blanche, l'aspergillose et la muscardine verte. En plus de la désinfection des pièces d'élevage, les ustensiles en particulier ceux dans lesquels la maladie de la muscardine blanche s'est développée sont lavés après la désinfection et séchés au soleil avant utilisation. Les vers malades sont incinérés ou placés dans des bocaux de chaux avant la formation conidiale et on se débarrasse des excréments avec soins. On ajuste l'humidité de la pièce d'élevage et on saupoudre un matériau absorbant dans les pièces. Pour ce qui est de l'aspergillose, on fait très attention à l'étuvage des plateaux et des ustensiles après la désinfection, la source principale de pathogène étant les objets moisissus. Les plateaux pour conserver les oeufs sont bien ventilés et déshumidifiés. Les mesures préventives sont les mêmes que pour la muscardine blanche (Lu Yup-lian, 1991).

Raghavaiah et Jayaramaiah (1988) ont fait part de l'efficacité de certaines huiles essentielles comme désinfectants des équipements pour le contrôle du champignon de la muscardine blanche, (*B. bassiana* vuil) en plus de leur effet repoussoir sur les insectes et leur phytotoxicité pour la feuille de mûrier. Parmi elles, l'huile extraite de géranium sps au taux de 20 % s'avère supérieure en offrant

36 % de protection au ver à soie contre la muscardine, suivie par l'extrait d'huile de la même source, à une dose de 15 % et l'huile de palme et de l'essence de lemon-grasse au taux de 20 % chacun. Le revêtement des claies d'élevage avec une couche de boue mélangée à de la bouse après le traitement avec les huiles permet l'amélioration du pourcentage de protection contre cette maladie.

Byra Reddy et coll., (1991) ont étudié l'efficacité comparative de désinfectants de claies d'élevage en prévention contre la muscardine blanche. Ils ont observé que la contamination artificielle de plateaux en bambou avec les conidies de *B. bassiana* suivie par la désinfection avec de la formaline à 1 - 1,5 %, du chlorure de chaux à 2 % et du dithane M-45 à 1 - 2 % donne la mortalité cumulative la plus faible des larves et des chrysalides (11 - 17,5 %) par rapport aux autres désinfectants.

Maladies virales :

Les maladies virales, les plus désastreuses des maladies chez le ver à soie pourraient être maîtrisées par des mesures intégrées convenant aux conditions existant telles que la destruction des pathogènes par la désinfection, la rupture du cycle de transmission, la ségrégation des vers en mue, l'amélioration de l'alimentation et la prise de mesures pour améliorer la vigueur et la résistance à la maladie et la sélection de variétés résistantes aux maladies.

Pour éviter que le virus ne se propage, on procède à une désinfection rigoureuse immédiatement après la récolte des cocons, les vers morts étant la source d'infection la plus concentrée. Pour contrôler l'infection des claies d'élevage qui est le mode de transmission le plus important, le corps des larves et les plateaux d'élevage sont désinfectés invariablement. En ce qui concerne la « polyedrose cytoplasmique » et la « flacherie infectieuse », la désinfection des larves des troisième et quatrième âges et des plateaux d'élevage est crucial pour prévenir le déclenchement au cinquième âge. On suit la technique de séparation des vers en mue de ceux en phase de mue tardive et d'élevage en lots différents pour réduire le risque d'infection.

La sélection de variétés de vers à soie résistantes à la maladie a une portée pratique pour prévenir l'arrivée et la propagation de la maladie virale tout comme pour réduire les pertes économiques. Des additifs à base de chloramphenicol ont un effet sur la réduction de l'incidence du virus de la polyedrose cytoplasmique et sur la flacherie infectieuse. Bien que des recherches aient été entreprises sur l'interférence virus - immunité dans la thérapie par hautes températures pour inhiber l'occurrence de la polyedrose cytoplasmique et la flacherie infectieuse chez le ver à soie, des recherches supplémentaires sur ces techniques doivent être entreprises avant qu'elles puissent être appliquées sur le terrain (Lu Yu-Lian, 1991).

Patil (1991) a mené des expériences pour étudier l'efficacité de l'hydroxyde de calcium contre la polyedrose cytoplasmique. Il a rapporté qu'une concentration à 0,5 % du produit chimique est efficace contre la polyedrose cytoplasmique et que son efficacité dépend de la concentration et de la durée du traitement.

Barman (1991) a étudié les effets d'agréats chimiques formulés pour contrôler les maladies virales et bactériennes du ver à soie *Bombyx mori* L. par application systématique sur le corps des larves et sur les litières. Parmi les composés testés, la combinaison de chaux + paraformaldehyde + benzoate de sodium (94:3:3) et de chaux + paraformaldehyde + acide benzoïque (95:3:2) entraîne une baisse générale respectivement de 16,5 % et 15,4 % de la mortalité par rapport au témoin. Ces deux composés améliorent aussi le taux de réussite de l'élevage de manière significative.

Sarma et coll., (1994) ont rapporté l'effet de différents désinfectants, sur la prévention de la polyedrose nucléaire du ver à soie. Les cinq désinfectants utilisés pour l'étude sont la formaline - 2 %, la chlorure de chaux 5%, l'asiphore 2%, stéridole 2 % et l'aldepol 2%.

L'efficacité préventive de ces produits chimiques contre la contamination NPV a été testée par rapport à deux témoins c'est à dire, (i) claie d'élevage avec contamination NPV (et sans désinfection) et (ii) claie sans contamination ou désinfection. Tous les désinfectants sont efficaces pour prévenir la contamination par NPV sans effet adverse sur les caractéristiques des larves et des cocons. Le formol est le plus efficace, suivis par la chlorure de chaux, l'asiphore, le stéridole et l'aldepol. La conclusion est la suggestion de chlorure de chaux à 5 %, comme alternative à la formaline, pour la désinfection

des « maisons d'élevage et d'habitation » (type ouvert) la formaline ayant un effet adverse sur la santé humaine et est plus adaptée pour les magnaneries de type fermé.

Maladies bactériennes :

Les maladies bactériennes du ver à soie tendent à se produire en automne et en été saisons d'élevage, chaudes et humides. Une désinfection incorrecte, l'accumulation d'excréments sur les plateaux d'élevage, et une manipulation non adaptée des feuilles de mûrier conduisent à la contamination bactérienne et l'utilisation hasardeuse de pesticides bactériens peut avoir un prix élevé.

Les maladies bactériennes pourraient être maîtrisées par l'application de mesures importantes. On ajoute 500 à 1000 unités internationales de chloromphenicol ou deux fois cette quantité de syntomycine à l'alimentation. Pendant de fortes poussées, on administre l'additif alimentaire toutes les huit heures et on donne plusieurs doses successives.

On contrôle les pestes du mûrier et l'utilisation de pesticides bactériens dans les zones d'élevage du ver à soie est interdit. On augmente la ventilation et on procède à la déshumidification en saupoudrant de la poudre de chaux ou un autre matériau absorbant l'eau sur les plateaux d'élevage. On laisse assez d'espace et l'on fait attention de ne pas blesser les vers à soie. Il ne faut pas stocker trop de feuilles de mûrier dans la pièce où l'on stocke les feuilles au sec. L'isolement à temps des vers à soie malades et la désinfection des litières sont essentiels. L'amélioration générale de l'alimentation et de la gestion de l'élevage facilite la maîtrise de la maladie (Lu Yup-Lian 1991).

L'alimentation avec des feuilles de mûrier supplémentées avec une concentration à 0,1 % de gentamycine, de cloxacilline, de sulfate de streptomycine et de kanamycine s'avère efficace dans cet ordre non seulement pour augmenter le taux de survie mais aussi pour prévenir l'apparition des maladies bactériennes et virales (Baig et coll., 1990).

Huit antibiotiques, la néomycine, le chloramphenicol, la tétracycline, la vancomycine, l'oxytétracycline, la kanamycine, l'acide nalidixique et la chloro-tétracycline à raison de 30 mcg pour chacun ont été testés contre *Serratia marcescens* : parmi eux, on trouve que le chloramphenicol (30 mcg) est le plus efficace, suivi par l'acide nalidixique, la kanamycine et la néomycine. Parmi les cinq désinfectants, la formaline, le chlorure de chaux, l'hypochlorite de sodium, le stérilol et l'asiphore à 1-2 %, la formaline est la plus efficace contre *Serratia marcescens* suivie par le chlorure de chaux et par le stérilol (composé de nonyl-alkyl phenoxy éthylène oxyde-iodine) (Sam Devadas, 1991).

Samson (1987) a aussi étudié les effets de quatre antibiotiques et cinq désinfectants sur l'incidence de la flacherie et d'autres maladies. Il a rapporté que le chloramphenicol à 100 ppm (avec une zone d'inhibition de 4,10-4,40 mm) et l'érythromycine à une concentration de 50 ppm (avec une zone d'inhibition de 4,10-4,20 mm) présentent la même inhibition que deux souches de *Bacillus thuringiensis* testés in vitro.

Il a aussi étudié l'effet de désinfectants tels que la formaline, l'hypochlorite de sodium, l'hypochlorite de calcium, le permanganate de potassium et la formulation de poudres fines avec des composants de paraformaldehyde et d'acide benzoïque dans de la chaux ou du kaolin sur l'incidence de la Flacherie et d'autres maladies. Il a rapporté que parmi les cinq désinfectants testés, la formaline (à une concentration de 1 %) s'avère la plus efficace contre deux souches de *B. thuringiensis* et de *S. marcescens*. Il a établi que non seulement le choix d'un antibiotique ou d'un désinfectant est essentiel à la lutte contre les maladies du ver à soie, mais aussi la formulation correcte du composé.

Maladies à protozoaires :

La maladie de la pébrine provoquée par les spores parasites de l'agent protozoaire *Nosema bombycis* et transmise par voie orale et par l'infection maternelle provoquent de grands dommages si aucune mesure préventive ne sont prises avec soin. Pour être sûr d'obtenir des oeufs non atteints par la maladie et éviter les pertes de production, des mesures pour vérifier la qualité de la production des oeufs ont été mises au point. Une des mesures fondamentales pour lutter contre cette maladie est la production d'oeufs non atteints sans infection de l'embryon (Wang San-ming, 1989).

Elle peut être complétée par l'élimination des oeufs non fécondés et morts des larves néonates et des coques d'oeufs vides. Pendant la période larvaire, la maladie est détectée en observant les larves paresseuses, inégales et non mues, les mues, les excréments, ainsi que la poussière des papiers et des pièces d'élevage (Baig et Pradip Kumar, 1987).

On effectue un examen supplémentaire pour s'assurer que les vers à soie parents et les nouvelles lignées introduites sont exemptes de pébrine et parfois pour corriger les erreurs de l'examen du papillon femelle. L'examen du papillon mère est une mesure importante de prévention de la pébrine transmise de manière transovarienne. On observe qu'une désinfection régulée et l'exclusion du matériel infesté préviennent l'infection par voie orale (Wang San-ming, et coll., 1989).

L'examen individuel du papillon est la méthode la plus efficace d'examen du papillon mère et convient pour les graines reproductives tandis que pour les grainages commerciaux, l'examen en masse des papillons mères est la méthode la plus adaptée (Biram Sahab et Puttaswamy Gowda, 1987).

L'échantillonnage pour l'inspection de la pébrine dans les papillons est présenté dans le Tableau I.

On s'assure de la qualité de l'examen pour maintenir l'identité des papillons mère en fixant les règles du procédé d'examen microscopique et en y accordant de l'importance (Wang San-ming, 1989).

Kagawa (1980) a étudié l'efficacité de la formoline comme désinfectant contre le pathogène de la pébrine et a rapporté un taux de mortalité des spores en hausse avec l'augmentation de la concentration en formoline et de la température.

Pour maîtriser la maladie de la pébrine, la désinfection des oeufs de vers à soie en surface après l'examen du papillon mère est une mesure importante en plus de l'application de méthodes prophylactiques (Baig et Pradip Kumar, 1987).

Les feuilles sur lesquelles reposent les oeufs sont plongées dans une solution de formoline pendant une période de 15 minutes, cette pratique permettant d'éliminer le risque éventuel de contamination en surface des oeufs par divers pathogènes et renforce aussi la capacité d'adhésion des oeufs aux feuilles. Les feuilles sont ensuite séchées à l'ombre et conservées à une température optimale (25 °C) et une humidité relative (de 80 %) (Biram Sahab et Puttaswamy Gowda, 1989).

Hitoshi et Ishihara (1981) ont testé neuf types de produits chimiques comme agent inhibiteurs contre l'éclosion des spores pathogènes y compris l'Hilite, qui a montré un effet inhibiteur élevé sur les spores.

Baig et coll., (1988) ont testé l'efficacité comparative de quatre désinfectants, l'Hilite (isocyanurate de dichloro potassium), l'hypochlorite de sodium, le chlorure de chaux et la formoline à quatre concentrations différentes (0,5 %, 1 %, 1,5 % et 2 %). Ils ont été testés comme stérilisants de surface contre la propagation de la pébrine (*Nosema bombycis*) sur une colonie de vers à soie, *Bombyx mori*, provenant de l'éclosion de pontes contaminées en surface.

Toutes les concentrations testées se sont révélées efficaces pour réduire l'étendue de la maladie. Le taux d'infection des lots traités était compris entre 1,34 % et 4,11 % tandis que pour les lots témoins l'infection s'élevait à 62,52 % au stade du papillon. Les quatre désinfectants testés peuvent être efficacement utilisés comme stérilisants de surface à toutes les concentrations, en particulier l'Hilite car il réduit sensiblement l'étendue de l'infestation par la pébrine et peut être une alternative convenable à la formoline comme stérilisant de surface.

On a rapporté que l'immersion d'oeufs de vers à soie dans de l'eau chaude, le traitement des chrysalides à de hautes températures, l'immersion des oeufs dans de l'acide chlorhydrique chaud et l'utilisation comme suppléments alimentaires de fumagilline, benlate et baolistan sont tous efficaces pour maîtriser la pébrine (Lu Yup-lian, 1991).

On peut employer la désinfection à la vapeur comme alternative à la désinfection chimique, en particulier dans les endroits où la désinfection chimique n'est pas possible et où l'éruption de pébrine a déjà pris place. La chimiothérapie peut être utilisée comme mesure prophylactique. Il a été rapporté que l'alimentation avec des feuilles de mûrier enduites d'une suspension de bavistine, de benomic ou de thiophanate à des concentrations de 10 000 - 40 000 ppm trois fois par jour peut supprimer ou éliminer l'infestation des vers à soie. Les concentrations recommandées, bien que trop élevées pour

une application sur le terrain, peuvent être essayées en mesures de sécurité dans les fermes de grainage (Sarat Chandra, 1992).

L'efficacité des désinfectants sur les spores de pébrine d'après l'étude de Yokoyama en 1962 est présentée dans le Tableau II. Fujiwara et coll., (1992) ont aussi étudié l'effet de certains des désinfectants ci-dessus sur les spores de pébrine.

SELECTION DES DESINFECTANTS

Un désinfectant est sélectionné en prenant en compte plusieurs facteurs tels que l'efficacité contre différents pathogènes, la simplicité, la facilité et la rapidité d'application, sa nature inoffensive aux êtres humains et aux animaux domestiques, sa disponibilité immédiate, son faible coût, son absence de dommage sur les bâtiments et l'équipement (Jolly, 1986 ; Baig, 1987, Benchamin, 1987).

Pratiques de désinfection :

Il existe une grande variabilité des pratiques de désinfection en fonction des différents pays.

L'incidence fréquente des maladies est un problème majeur de la sériciculture tropicale, où les hautes températures et l'humidité élevée fournissent une atmosphère qui convient à la multiplication des pathogènes auxquelles s'ajoute la fréquence des élevages. De plus, le type de magnaneries, c'est à dire le type élevage-maison d'habitation (type ouvert) ne permet pas une enceinte hermétique. Ainsi, des efforts ont été entrepris pour mettre au point des pratiques de désinfection adaptées à ces conditions, et il existe une grande variabilité des pratiques. Le produit chimique traditionnel, la formaline, à une concentration de 2-3 % est utilisé à grande échelle dans la plupart des pays, mais le produit chimique n'est pas adapté dans les situations, où les maisons d'élevage ne peuvent pas être fermées hermétiquement car cela cause une gêne aux résidents. Ainsi, l'accent est plus mis sur l'utilisation de chlorure de chaux. Certains produits chimiques désinfectants sont utilisés à deux fins. La poudre de chaux est utilisée pour contrôler les spores fongiques et diminuer l'humidité des litières, ce qui élimine les conditions favorables à la multiplication des champignons (Iyengar, 1988).

En Chine, on pratique la désinfection dans le but « d'offrir une protection aux vers à soie contre l'exposition aux pathogènes ». Les principaux désinfectants utilisés sont :

Une solution de formaline à 2 % et de poudre de chaux à 0,3 % que l'on vaporise à raison de 125 cc/m² sur la zone à désinfecter. Une solution de chaux contenant 1 % de poudre de chaux que l'on vaporise à raison de 225 cc/m² sur la surface à désinfecter. On utilise la fumigation avec un « fumigant en poudre à base de chlore » chauffé à 40 °C avec un temps d'exposition de 24 heures. La poudre de chaux sous forme pure ou mélangée à du chlorure de chaux est utilisée comme désinfectant (Anonyme, 1980).

Au Japon, bien que la désinfection s'effectue en général par vaporisation, on a recours à la fumigation dans certaines préfectures. Les instruments métalliques sont désinfectés par fumigation tandis que pour les ustensiles en bois la formaline est utilisée sous forme de vaporisation. La fumigation est pratiquée en utilisant du Neo-pps (le Neo-pps est une combinaison de 55 % de paraformaldehyde, de 22 % d'acide salicylique et de 8 % d'orthophénylphénol) (Subba Rao, 1989).

Pour la fumigation des pièces d'élevage, la température et l'humidité des pièces sont maintenues respectivement à 20 °C et 70 % ou au-dessus. Les équipements utilisés pour les activités séricicoles sont désinfectés par cette méthode en prenant en compte la composition des articles matériels utilisés (articles en papier et en tissu) car ceux-ci ne supportent pas la vaporisation (Nagaraj, 1989).

Plusieurs produits chimiques et méthodes sont employés pour la désinfection des pièces d'élevage et des ustensiles comme précaution contre la muscardine et l'aspergillose. Ils comprennent :

- Vaporisation d'un mélange de 2 % de formaline et de 0,2 % d'aliband (Aliband : 3 %, chlorure de benzalkonium + 4 % de dodécyl diamino éthyle glycine)

- Vaporisation de sunace (un fongicide qui agit comme un tensioactif) avec de la formaline (un c.c. de formaline avec 200 g de sunace).

Comme mesure de contrôle contre la muscardine, en plus de la fumigation avec du neo-pps, on procède à une vaporisation d'hypochlorite de calcium dilué 200 fois, à raison de 36-50 g/mètres cubes) (Mukerjee, 1989). La vaporisation de formaldéhyde se fait à raison de 1000 c.c./mètres cubes, pour la vaporisation d'Aliban, des solutions diluées 200-1000 fois sont utilisées (Kasiviswanathan, 1989).

Subba Rao (1989) a rapporté que la destruction d'*Aspergillus* s'effectue en vaporisant 3 % de chlorure de benzalkonium + 4 % de dodecyl diamino ethyle glycine.

Pour la prévention des maladies bactériennes, l'accent est mis sur la désinfection des pièces d'élevage et des ustensiles ; pour la prévention des maladies virales, non seulement il faut désinfecter, mais aussi accorder de l'importance à la maîtrise des conditions environnementales. Les mesures préventives contre la pébrine comprennent, en plus d'une désinfection soignée, le retrait de la source d'infestation et un examen strict des papillons mères (Kasiviswanathan, 1989).

Ainsi que l'a rapporté Rajan en 1994, au Japon on procède à deux désinfections en utilisant de la formaldéhyde concentrée (3,7 %). La première opération de désinfection s'effectue sans nettoyer les pièces d'élevage et les équipements. De la formaldéhyde est vaporisée à haute pression pendant une période de 5-6 heures pour permettre aux pathogènes de se propager en dehors de la maison d'élevage vers l'extérieur. Les équipements et les magnaneries sont ensuite soigneusement lavés avec de la poudre de chaux et du chlorure de chaux pour détruire les organismes viraux et les équipements sont ensuite séchés au soleil. Les encabanages (un des équipements d'élevage les plus contaminés) sont désinfectés en les empilant sur un morceau de vinyle dans un récipient avec de la formaldéhyde et recouverts avec un autre morceau de vinyle. La deuxième désinfection est aussi faite avec de la formaldéhyde concentrée après le nettoyage et la disposition des équipements à l'intérieur de la maison d'élevage. Plus tard, on effectue un test de pathogène sur la poussière recueillie dans la magnanerie. S'il révèle une présence pathogène, on procède à une désinfection supplémentaire.

Au Laos, en Thaïlande et aux Philippines, la formaldéhyde est le désinfectant le plus utilisé tandis qu'en Indonésie l'hypochlorite de sodium mélangé à de la formaldéhyde est utilisé. La solution a une proportion de 2,5-3 litres d'hypochlorite de sodium pour 200 litres de formaldéhyde et est utilisée en vaporisation pour les pièces d'élevage et les ustensiles.

Dans tous les pays séricicoles, il y a une tendance croissante à utiliser des composés de chlore comme désinfectants pour contrôler les maladies du ver à soie.

Désinfectants pour litières utilisés en Chine :

Wang et coll., (1991) ont étudié l'efficacité de « Duomeijing » une poudre de prévention contre la muscardine. L'étude indique qu'une solution de 500 à 1000 ppm de désinfectant peut détruire efficacement les champignons pathogènes du ver à soie. A une concentration de 5 %, « Duomeijing » a un bon effet sur les litières et son efficacité préventive sur les champignons atteint plus de 93 %. Il a aussi été établi par des tests de toxicité orale et dermique que la préparation n'a pas de propriétés corrosives et ne cause aucun dommages à la physiologie et aux caractères économiques du ver à soie.

Huang et coll., (1992) ont étudié l'effet d'un composé organique, « Quanshawei », sur les pathogènes du ver à soie. L'utilisation de cette poudre désinfectante a montré un effet remarquable sur les champignons, les polyèdres, les bactéries et les pathogènes de pébrine à des dilutions aqueuses respectivement de 400, 800 et 1600 fois. Aussi, il est largement utilisé pour la désinfection des maisons d'élevage et des ustensiles à une dilution de 250 fois et sur les feuilles de mûrier à une dilution de 800 fois. Il est recommandé, bien que la poudre soit très puissante, de l'utiliser 5 heures après la préparation pour éviter de réduire ses effets sur le pathogène.

Désinfectants de litières utilisés au Japon :

Certaines substances chimiques sont utilisées comme désinfectants de litières du ver à soie. Ils comprennent la poudre Kabinoran (2 % de tetrachlorosophtalonitrile - TPN et 2 % d'éthylène - bis - dithiocarbomatomanganèse - Maneb), la poudre Pafsol (3,3 % de paraformaldéhyde) et la poudre Kinubon (5 % de 8 hydroxy-quinolinstrontium). Les vers à soie infestés sont retirés des litières et désinfectés avec des produits chimiques ou enterrés en profondeur dans le sol avant la sporulation des

champignons sur les larves momifiées. En plus de l'aliband et de la sunace, du chemichlon (3,5 % d'hypochlorite de potassium et 96,5 % d'hydroxyde de calcium), la poudre Shinsei (acide salicylique 4 % + 0,4 % d'alcool de pentachlorobenzyle) et de l'argile acide, Sosan - S (5% d'acide benzoïque et d'argile) sont utilisés sur les litières en saupoudrage.

Le dosage de poudre kabinoran est indiqué ci-dessous :

Age I - 1 gm pour 0,1 m² avant le premier nourrissage et une fois de plus.

Age II - 2 gm pour 0,1 m² après la mue

Age III - 3 gm pour 0,1 m² après la mue

Age IV - 4 gm pour 0,1 m² après la mue

Age V - 5 gm pour 0,1 m² 2 à 3 fois

(Kasiviwanathan, 1989)

Désinfectants pour litière utilisés en Inde :

Subba Rao et coll. (1992) utilisent la chaux et de la chaux + mélange de chlorure de chaux comme désinfectants de litières sur les larves de vers à soie inoculées avec des pathogènes des maladies de la grasse et de la muscardine. La chaux et la chaux + chlorure de chaux désactivent efficacement le NPV et augmentent la survie jusqu'à 16,6 et 17,5 % respectivement par rapport au témoin. De même, la chaux - chlorure de chaux (97:3) augmente la survie de 20,75 % de la population infestée par la muscardine par rapport au témoin.

Les autres désinfectants de litières utilisés en Inde sont cités dans le Tableau III.

Contrôle microbien des maladies bactériennes et virales :

Au Japon, des efforts couronnés de succès ont été faits pour le contrôle des maladies bactériennes et virales. De tels efforts concernent l'utilisation des champignons pathogènes. Depuis 1961, en plus des champignons et des bactéries, on utilise les virus comme outils efficaces. L'utilisation du virus de polyedrose cytoplasmique qui cause la polyedrose cytoplasmique sur la chenille du pin est aussi expérimentée avec de bons résultats. *Bacillus thuringiensis* s'est révélé efficace pour le contrôle de divers insectes nuisibles, c'est à dire le ver commun du chou, le ver de la feuille de patate douce etc..., Les sérotypes *B. thuringiensis*, 3a, 3b, 7, 9 et 10 présentent des types de degrés de toxicité variés au ver de la feuille de coton et le titrage biologique chez le ver à soie révèle que la toxicité (DL:50) au ver à soie de la feuille de coton est 10⁸ spores/c.c et dans le cas des larves de ver à soie au troisième âge, le DL:50 est de 4,5 × 10⁵ spores/larve. Quatre sérotypes *Bacillus thuringiensis* dont la toxicité sur le ver à soie va de faible à élevée sont utilisés dans la formulation de la préparation (Nagaraj, 1989).

HYGIÈNE

L'hygiène comme il a été mentionné plus haut, consiste à maintenir les endroits dans et autour desquels se déroulent les activités séricoles et les ustensiles utilisés à l'intérieur propres. Elle est très importante car elle permet de protéger les récoltes en prévenant les maladies.

Le maintien de conditions d'hygiène pendant l'élevage permet de prévenir l'entrée de maladies provenant de l'extérieur entraînant des germes et de contrôler aussi l'étendue des maladies (Jolly, 1986 ; Benchamin 1987 ; Lin et Zhong 1988 ; Anonyme, 1990). Les recommandations générales sont les suivantes :

L'entrée de la maison d'élevage doit être restreinte à quelques membres. Les personnes entrant dans la magnanerie doivent essuyer leurs pieds sur un paillason et laver leurs mains. Pendant l'élevage, les vers à soie malades et morts doivent être mis dans des récipients contenant de la chaux car ils peuvent devenir une source d'infection (Jolly, 1986 ; Benchamin, 1987 ; Chuan et Chang, 1988). Des désinfectants comme la formaline, la désinfection des mains, le chlorure de chaux ou la chaux venant d'être mouillée est répandue sur une toile de jute placée sur le paillason à l'entrée de la maison d'élevage ou on garde le paillason humide en le vaporisant avec une solution de formaline

à 2%. De la chaux fraîche doit être répandue tout autour de la maison d'élevage. L'utilisation de solution de formaline à 1 % doit être évitée.

Le nettoyage des litières doit être fait de préférence avec des filets pour prévenir la contamination. Les filets doivent être désinfectés avec une solution de formaline, lavés à l'eau et séchés. Pendant le nettoyage des litières, il faut faire attention à ne pas faire tomber de débris sur le sol d'élevage. Immédiatement après le nettoyage, la pièce doit être balayée et l'éleveur effectuant ce travail doit laver ses mains et ses pieds. Les claies avec un grand nombre de vers malades doivent être remplacées par une claie désinfectée suivi par la désinfection de la claie utilisée avant. Les fissures de la pièce d'élevage doivent être fermées pour contrôler l'entrée et l'accumulation de débris et de pathogènes. Le compost des ordures doit être éloigné de la maison d'élevage. L'équipement d'élevage ne doit pas être emprunté ou prêté et doit être désinfecté avant usage. Le papier de paraffine et la protection en papier des sièges utilisés pour l'élevage doivent être brûlés. Les jeunes vers et les vers d'âge mûr ne doivent pas être élevés dans la même pièce et il faut éviter de faire chevaucher les élevages (Jolly, 1986 ; Benhamin 1987 ; Baig 1987).

Pour éviter l'entrée des pathogènes, le sol, les couloirs, l'entrée/sortie des pièces d'élevage et la pièce de stockage des feuilles sont désinfectées par la vaporisation d'une solution de chlorure de chaux contenant 1 % de chlore effectif à 3-4 jours d'intervalle. Les récipients pour le transport des feuilles et l'évacuation des ordures doivent être séparés et désinfectés avec du chlorure de chaux (Chuan et Chang, 1988).

Dans le cas de centres de production de graines, la chambre froide de conservation des papillons doit être séparée des pièces d'hibernation et d'incubation et les personnes entrant dans la pièce de conservation des oeufs, manipulant les graines désinfectées doivent laver leurs mains (Jolly, 1986).

Pratiques d'hygiène :

En Inde, un bac pour se nettoyer les pieds contenant un coussinet imprégné de désinfectant est utilisé pour prévenir l'entrée des pathogènes par les chaussures. De plus, on s'attache aussi au lavage des mains avec un désinfectant doux avant d'entrer dans la maison d'élevage.

En Chine, on vaporise du chlorure de chaux sur le sol, à l'entrée et à la sortie de la pièce d'élevage, tous les 3-4 jours. On dispose un paillason aspergé avec un mélange de chaux et de chlorure de chaux à l'entrée pour désinfecter les pieds. On se débarrasse continuellement des larves mortes dans un récipient avec de la chaux. Dans ce pays, la chaux joue un rôle majeur pour le maintien de conditions hygiéniques.

Au Japon, on accorde beaucoup d'importance et d'attention aux pratiques d'hygiène. Les environs de la salle d'élevage, le lieu d'évacuation des ordures, la pièce de stockage des feuilles etc., sont désinfectés avec du chlorure de chaux puissant, de la formaline ou autres. Les employés suivent des pratiques d'hygiène strictes que ce soit pour l'entrée dans la pièce d'élevage ou le maniement des vers ...etc... (Iyengar, 1988).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Bien que la formaline soit le désinfectant le plus utilisé en Inde et dans d'autres pays, il a certains désavantages car la désinfection complète n'est pas possible pour les magnaneries de type ouvert. De même que lorsqu'il est utilisé pour la désinfection de l'équipement d'élevage et les magnaneries de type fermé, il cause des gênes pour les habitants et le bétail, en particulier des difficultés respiratoires et des irritations aux yeux. Ainsi on utilise du chlorure de chaux à 5 % comme désinfectant alternatif efficace. Il est utilisé pour les magnaneries de type fermé de même que pour les magnaneries servant d'habitation. Cependant, le produit chimique a l'inconvénient d'être corrosif par nature, et affecte les ustensiles métalliques utilisés pour l'élevage et les articles ménagers ; il est plus adapté pour les ustensiles en bois et en plastique.

Compte tenu des inconvénients des désinfectants habituels, résumés plus haut, il est aujourd'hui nécessaire de mettre au point un désinfectant pouvant être utilisé de manière efficace à la fois dans

les magnaneries de type fermé et les magnaneries servant d'habitation, ne présentant aucun danger à la santé et n'ayant pas de propriétés corrosives.

A NEW TECHNIQUE OF TRANSGENESIS BY PFGE

L. ZHENGANG*, R. RUI & Z. ZHIGANG

Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China.

*The fertilised egg of silkworm, **Bombyx mori**, is surrounded by a hard shell (Lu H.S. et al. 1990) and has a high intraovular pressure within the egg (Kanda, T. et al., 1991) so that it is difficult to inject the exogenous DNA solution into the egg. Up to now, the routine way is still to bore the shell, and then microinject the exogenous DNA into the egg (Kanda T. & Tamura T., 1991; Nikolaev, A.I. et al. 1993; Li Zhengang et al. 1991, 1997); it is damaging and labourious. Here we advance a new technique that makes the exogenous DNA pass through the tortuous tunnels of the egg air-pores (about 5000-10,000 air pores for each egg) by the means of PFGE (Pulsed field gel electrophoresis). Southern dot blot and transformation experiments indicate that the exogenous DNAs were transferred into the egg plasm successfully. Consequently, this is a technique available for treating a mass of eggs simultaneously and harmlessly, and it is suitable for all insects' eggs or fish eggs for transgenesis, even plant cells with cell wall.*

Keywords : *Bombyx mori*, eggs'shell, PFGE, transgenesis (gene transfer), dot blot, transformation.

INTRODUCTION

Domestic silkworm, *Bombyx mori*, is a profitable economic insect and an ideal model for researches of eukaryotic genes expression and regulation. So the study of transgenic silkworm is important both in theory and in practice. But like other insects, the fertilised egg of silkworm, *B. mori*, is surrounded by a hard shell which is the first obstacle of gene transfer for a long time. Moreover, there is a high intraovular pressure within the egg, so that it is difficult to inject the exogenous DNA solution into the egg (Kanda, T. et al. 1991). The transgenesis approaches (Cheng, W.Z. et al. 1995) developed so far include microinjection, sperm carrier, BmNPV mediation (Maeda S. et al., 1985), genegun (Klein T.M. et al., 1987) and so on, but few of them are simple, easy and available for the transgenesis of the silkworm egg. The major problems still remaining to be solved are laboriousness, cost, infection and damage, even death (e.g. BmNPV). Up to now, the routine way is still to bore the shell, and then microinject the exogenous DNA into the egg (Kanda T., & Tamura T., 1991; Nikolaev A. I. et al., 1993; Li Zhengang et al., 1997).

In order to overcome the obstacles and shortcomings described above, we developed a convenient and effective technique to transfer exogenous DNA through the egg air pores by PFGE (Pulsed field gel electrophoresis). Our new method is based on the following facts: first, each egg has about 5000-10,000 air pores, each one has a tortuous tunnel with a 1-4 μm diameter leading to the ovoplasm (Lu, H.S. et al., 1990), secondly, under the alternatively switched or pulsed electric field provided by PFGE (Sambrook, et al. 1989), the exogenous DNA molecules should penetrate the pores and pass through the tortuous tunnels into the egg. Southern dot blot indicated that the exogenous DNA (up to 12.2 Kb in length) were transferred into the ovoplasm successfully. The survival rate was high up to

* To whom correspondence should be addressed.

40-50%. This new approach is available for treating a mass of eggs simultaneously and harmlessly. It is applicable to all insects' eggs or fish eggs for gene transfer, even plant cells with cell walls.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials:

All the eggs were raised from pupae in a laboratory. The pupae of *B. mori* is a courtesy of the Sericulture Research Institute, National Academy of Agricultural Sciences of China, Zhenjiang. Plasmid pAy6.8 (containing the core region of the fibroin gene of *Antheraea yamamai* fragment pAy, 6.8Kb, in pUC13) and plasmid pFb100 (containing an upstream modulating region and the 1st exon as well as its partial intron of the fibroin gene of *B. mori* fragment Fb, 1.4 Kb, in pBR322) was a gift from Dr Suzuki (National Fundamental Bioscience Research Institute, Japan). DY-4A CHEF type of PFGE apparatus. Random Primer-labeling kit and nylon filters (BRA). α -³²P-dATP (Yahui Medical Engineering Company, Beijing).

2. Preparation of exogenous DNA:

According to the routine procedures in 'Molecular cloning' (Sambrook, J. *et al.*, 2nd edit, 1989), plasmid pFb-Ay DNA were reconstructed and then were transformed into competent cell *E. coli* (DH5 α) and then were amplified, extracted, purified and detected. The main body of the reconstructed plasmid pFb-Ay is pBR322; besides, that contains the main part of Fb fragment (about 1.1Kb) and the fragment of Ay6.8 (a small fragment between the Xma I and Xho I sites within pFb100 is removed and the Ay6.8 fragment is inserted), the total length is 12.2 Kb.

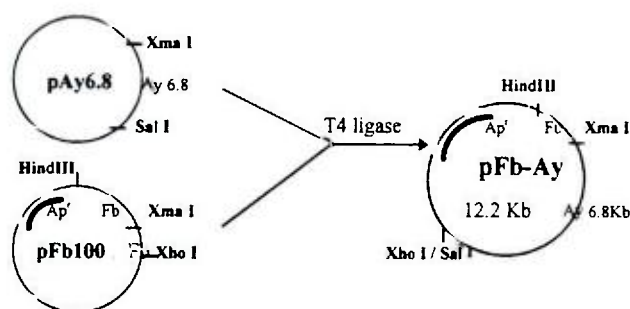


Fig 1:Diagram of the reconstruction of pFb-Ay from pAy6.8 and pFb100. The pFb100 and pAy6.8 were cut by XmaI, XhoI/SalI respectively and then ligated by T4 ligase.

Fig 1: Diagramme de la reconstruction de pFb-Ay à partir de pAy6.8 et pFb100. pFb100 et pAy6.8 sont coupés par XmaI, XhoI/SalI respectivement puis ligaturés par la ligase T4.

3. Transfer of exogenous DNA:

3.1. Transfer of the pFb-Ay into the eggs by PFGE:

We collected the eggs two hours after oviposition. The whole procedure of PFGE should be completed within the first 8 hours after oviposition during the single cell period. We imbedded the mixture of eggs (about 1000 eggs) and the desired genes (pFb-Ay) in low melting point agarose (LMA), (or in another way, we only imbedded the eggs in the gel and added the desired DNAs into a sample trough), then we performed PFGE until DNA travelled across the eggs imbedded gel region. Electrophoresis was proceeded on 1.5% agarose gel (supporting gel) and 1.0% LMA (imbedding gel) in 0.5 × TBE solution at 5v/cm and 4° C with 1s or 2s switch time (Rickwood, D. *et al.* 1990) for 3-4 hours.

3.2. Transfer of the pFb-Ay by electrophoresis of the constant direct-current field:

In the meantime, we took another mixture of eggs (about 1000 eggs) and desired DNA to carry out the normal electrophoresis as a control separately. The electrophoresis was also proceeded on 1.5% agarose gel (supporting gel) and 1.0% LMA (imbedding gel) in 0.5 × TBE solution at 5v/cm

and 4°C, but was conducted under the constant direct-current field for an hour or so, while the DNA travelled across the eggs imbedded gel region (non-PFGE eggs).

3.3. Washing of the electrophoretic eggs:

After electrophoresis, we removed the PFGE eggs and the control eggs (no-PFGE eggs) from the gel respectively. We washed stringently the eggs ten times with PBS buffer and deionized water alternately. We used a wide-bore pipette to rinse completely each time in order to rinse the potential contaminant from the shells' surface. We divided the PFGE eggs into three groups (each of about 300 eggs) by stochastic sampling for DNA extraction and examining the survival rate.

3.4. Incubation of eggs after PFGE:

After electrophoresis, about 300 PFGE eggs were taken at random, then were incubated at 25°C (Lu H.S. *et al.*, 1990) to examine their survival rate.

4. Preparation of the DNA from the electrophoretic eggs:

4.1 Isolation of the DNA from the non-PFGE eggs:

We took 300 and 700 non-PFGE eggs at random respectively. We pressed the eggs with a glass homogenizer in an extraction buffer, discarded the shells by centrifuge at 100g for 5 min. We collected the remaining solution to extract the DNA by the method of Yancopoulos & Alt. (1990) that is suitable to isolate DNA from small amounts of cells or tissue. The DNA of 300 eggs will be used for the Southern dot blotting; the DNA of 700 eggs will be used for the transformation to *E. coli* (DH5 α).

4.2. Isolation of the total DNA from the PFGE eggs:

We took 300 PFGE eggs at random. We homogenised the eggs with a glass homogenizer and extracted the total DNA as mentioned in 4.1., which contains the DNA both of the ovoplasm and shell.

4.3. Isolation of the ovoplasm DNA and the shell DNA separately from the PFGE eggs:

We took 300 PFGE eggs at random. We prepared glass microelectrodes with a tip of about 30 μ . We electrolysed the tungsten filament in a saturated NaOH solution, make it with a sharp tip approximates to 50 μ . Under the dissecting microscope, we drilled the eggs one by one with the tungsten needle which was driven by a micro-motor, and then sucked the ovoplasm by the glass microelectrode, and transferred it into the extraction buffer. We extracted the DNA as mentioned in 4.1. Therefore, such DNA is only the ovoplasm DNA without the contaminant of shell DNA. For all the remaining shells we also extracted the DNA by the prescribed method.

5. Dot blotting and hybridisation:

5.1 Preparation of radiolabelled DNA probes:

The desired DNA were purified from LMA by gel electrophoresis. The probes (pAy6.8*) were labelled by random primers extension with α -³²P-dATP (Sambrook, J. *et al.*, 1989).

5.2. Southern dot blotting:

We took the ovoplasm DNA, the shell DNA, the total DNA of PFGE eggs and the DNA of non-PFGE eggs as the samples waiting for detection. We took the desired DNA (pAy6.8) as a positive control, the *B. mori* DNA and TE buffer as a negative control (in order to obviate the possibility of homologous sequences of probe existing in *B. mori* as well as of contaminant in buffer under the same condition), denatured and immobilised all the samples on nylon membranes. According to the procedures of prehybridization, we incubated the nylon membrane containing the target DNA in prehybridization solution (6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's reagent, 0.5% SDS, 50% deionized formamide, 0.1mg/ml C.T. DNA) at 42°C for 4 hours. We replaced the prehybridization solution with

hybridization solution ($6 \times$ SSC 0.5% SDS, 50% deionized formamide, 0.1 mg/ml C.T. DNA 25ng/ml radiolabeled probe), incubated it at 42 °C for 24 hours. We took the nylon membrane and washed twice stringently with $2 \times$ SSC/0.1% SDS at room temperature for 15 min, and then washed twice with 0.1 X SSC/0.1% SDS at 55 °C for 30 min. We exposed the nylon membrane to X-ray film to obtain an autoradiographic image and took photos.

6. A quantitative test for transforming pFb-Ay within the egg:

6.1. Recirculization of the PFGE DNA :

We carried out PFGE for 1500 eggs mixed with pFb-Ay as mentioned in 3.1, and then divided it into two equal parts (each of about 700 eggs) by stochastic sampling. We took 700 eggs for the extraction of total DNA as in 4.2, and took another 700 eggs for extraction of the ovoplasm DNA and shell DNA as in 4.3. About 0.5 Weiss unit of bacteriophage T4 DNA ligase was added to the ovoplasm DNA, shell DNA and total DNA respectively. The reaction was incubated for 8 hours at 16° C, and stored at 4° C for use.

6.2. Recirculization of the non-PFGE DNA:

About 0.5 Weiss unit of bacteriophage T4 DNA ligase was added to the non-PFGE DNA as did in 4.1, from 700 non-PFGE eggs. The reaction was incubated for 8 hours at 16°C, and stored at 4°C for use.

6.3. Transformation of the competent *E. coli* with PFGE DNA :

According to the routine procedures (in 'Molecular Cloning', by Sambrook, *et al.* 2nd ed.), we carried out the transformation reaction of the competent *E. coli* (DH5 α) with the recirculized PFGE DNA of the ovoplasm, the shell and the whole egg respectively. We took 1ng pFb-Ay DNA as standard positive control. We took the DNA of non-PFGE eggs as a negative control. Then each of the transformation reactant were dispersed on the plate medium containing the amino penicillin separately. After incubation overnight at 37° C, we counted the number of colonies on each plate.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Analysis of dot blotting:

The pFb-Ay was chosen as exogenous DNA. Plasmid pFb-Ay contains the core region of the fibroin gene of *A. yamamai* (6.8 Kb), the main part of pFb 100 (about 1.1 Kb) and the pBR322, so it is a fragment up to 12.2kb. As shown in Fig.2, the positive dot of total DNA indicates the exogenous DNA have not bypass the eggs but pass through them. We stained the gel with EB (Ethidium Bromide) and scanned it by UV during PFGE, that showed the running DNA slow down within the eggs imbedded region, the continuation of DNA movement along the eggs imbedded region was interrupted. All these suggested that most of the exogenous DNA were caught by the eggs and were detained in the eggs embedded region. Moreover, the positive dot of the ovoplasm which is sucked from the interior of the egg without the DNA contamination from shell, proved the exogenous DNA have gone into the ovoplasm really. The positive dot of the shell suggests that the exogenous DNA is passing through the tortuous tunnels of air-pores, and then entering the ovoplasm. However, the negative result of the non-PFGE DNA (E) suggested that the exogenous DNA (pAy6.8) were not only unable to transfer into the ovoplasin, but also have not gone into the tortuous tunnels of eggs under the constant direct-current field electrophoresis. The most of the contaminated DNA on the egg surface or in the shallow level of airpores are easily removed by rinse; a few remaining DNA were unable to be detected by the dot blotting.

2. A quantitative test of transformed egg:

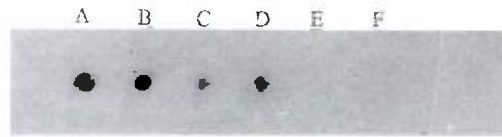


Fig 2. Southern dot blotting of egg DNA after PFGE

Fig 2: Hybridation Southern sur tâche de l'ADN d'oeuf après PFGE

Took the desired DNA (pAy6.8) as positive control (A), the total DNA of PFGE eggs (B), the ovoplasm DNA (C), the shell DNA (D) and the DNA of non-PFGE eggs (E) as the samples waiting for detection, the native DNA of *B. mori* (F) and TE buffer (G) as negative control (in order to obviate the possibility of homologous sequences of probe existing in *B. mori* as well as of contaminant in buffer under the same condition)

L'ADN (pAy6.8) est pris comme témoin positif (A), l'ADN total des oeufs PFGE (B), l'ADN de l'ovoplasme (C), l'ADN de la coque (D) et l'ADN des oeufs non-PFGE (E) comme échantillons en attente de détection, l'ADN natif de *B. mori* (F) et le tampon TE (G) comme témoins négatifs (de manière à écarter la possibilité de séquences homologues de sonde existant dans *B. mori* tout comme de contaminant dans le tampon dans les mêmes conditions).

The transformation reaction of the recirculized DNA (6.1 and 6.2) to the competent *E. coli* (DH5 α) was completed as mentioned in 6.3., and then each of the transformation reactants were dispersed on the plate medium containing the amino penicillin separately. If the recirculized DNAs

Table 1. The transformation of *E. coli* (DH5 α) with transgenic (pFb-Ay) eggs DNA.

Tableau 1. Transformation d'*E. coli* (DH5 α) avec l'ADN d'oeufs transgéniques (pFb-Ay).

	PFGE eggs / Oeufs PFGE			Positive control / Témoin positif	Negative control / Témoin négatif
	Total DNA / ADN total	Ovoplasm DNA / ADN de l'ovoplasme	Shell DNA / ADN de la coque	(1ng pFb-Ay) / (1ng pFb-Ay)	(non-PFGE DNA) / (ADN non-PFGE)
Used eggs / Oeufs utilisés	700	700	700		700 (non -PFGE DNA)
Clone dots / Clones marqués	200	20	30	6000	0

consist of a certain pFb-Ay fragments which contains an aminopenicillin resistant gene (Ap^r), it will make the *E. coli* able to colonise on the selective medium containing aminopenicillin. Therefore, the more clones suggest more pFb-Ay have transformed into the egg ovoplasm or shell. The results of the various clones containing transformed pFb-Ay are showed in Table 1.

According to the result of positive control, if we have extracted 1ng pFb-Ay (a part of the extracted DNA) from 700 transgenic eggs, it will make the transformed DH5 α growing up 6000 clones on the selective medium. Therefore, we can compute the amount of the pFb-Ay had transferred into the egg by PFGE, according to the clone dots result from the transformation test on *E. coli* (DH5 α).

1. The amount of transferred pFb-Ay within whole eggs' DNA (ovoplasm DNA plus shell DNA):
In 700 eggs: $200/6000 \times 1\text{ng} \approx 30\text{ pg} \approx 30 \times 10^{-12}\text{g}$.

In one egg: $(30 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ eggs}) / 1.3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 3000 \text{ plasmids}$

[notes] As known the DNA length of pFb-Ay is 12.2kb (Fig 1.), namely, about 4 μm , and also known the DNA of 1 μm length has a M.W. of 2×10^6 daltons, and 1g DNA has a M.W. of 6×10^{-23} .

Therefore, one plasmid of pFb-Ay (12.2 Kb) is:

$$4 \times (2 \times 10^6) / 6 \times 10^{23} \equiv 1.3 \times 10^{-17} \text{ g}$$

2. The amount of transferred pFb-Ay within eggs'shell:

In 700 eggs: $30/6000 \times 1 \text{ ng} \equiv 5 \text{ pg} \equiv 5 \times 10^{-12} \text{ g}$

In one egg: $(5 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ eggs}) / 1.3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 500 \text{ plasmids}$

3. The amount of transferred pFb-Ay within eggs' ovoplasm:

In 700 eggs: $20/6000 \times 1 \text{ ng} \equiv 3 \text{ pg} \equiv 3 \times 10^{-12} \text{ g}$

In one egg: $(3 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ eggs}) / 1.3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 300 \text{ plasmids}$

As mentioned above, the amount of transformed pFb-Ay of the whole egg is more than the sum of the ovoplasms' and the shells', that may be because of the enzymic hydrolysis or the losses during the operating process. For example, the ovoplasm will suffer many losses because it adheres to the shell and the microelectrode, so that the shells' pFb-Ay appears more than the ovoplasms.

3. Incubation of the eggs after PFGE:

The key of the new technique's applicability is whether the eggs will survive and develop normally after PFGE. In general, the normal eggs will turn into black from light yellow two days after oviposition owing to the cellulos membrane under the shell which is well developed, whereas the undeveloped eggs will remain light yellow still. This is a reliable index to check the eggs' survival rate. The encouraging phenomenon was that partial eggs turned black (Fig. 3. right) from light yellow (Fig 3. left) after 2 days incubating at 25 °C. The survival rate was high up to 40%.

However, all the results indicated that the PFGE might make the exogenous (pFb-Ay) pass through the airpores, cling to the membrane first and then be transferred into the ovoplasm by an unknown mechanism concerning cellular metabolism (Ganeva, V. *et al.*, 1995). In addition, the results of dot blotting and transformation of DH5 α suggested that there were multicopied DNAs in each transgenic egg. It is in accordance with the general rule by which the exogenous DNA will string together and integrate into the genomic DNA (Liu Qinghui *et al.*, 1994). Moreover, such a technique

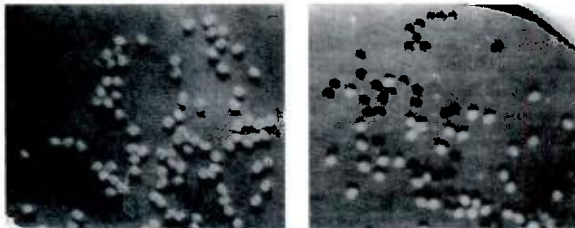


Fig 3: New born eggs (left) and incubated eggs after PFGE (right).

Fig 3: Oeufs nouveau-nés (à gauche) et oeufs incubés après PFGE (à droite)

will enable to transfer still longer DNA fragments than other methods. It is known to all, the longer the transfer DNA fragments are, the better the integrity of the desired gene containing its regulative sequences is kept, which is helpful for integration and expression of the desired gene (Tang Hengli *et al.*, 1995).

In conclusion, the technique of PFGE transgenesis may provide an efficient way to transfer large DNA fragments. It is a technique of genes transfer available for treating a mass of eggs simultaneously and harmlessly, such as insects' eggs, fish eggs, even the plant cells without preparing the protoplast. So it has a great applied value in gene transfer, especially for the silkworm *B. mori*.

REFERENCES

- CHENG W.Z., LIU Y.B., YU Q.X. (1995) The genetic modification and application of transgenic animals, *Hereditas* 17(2), 42-48; 17(3), 46-48.
- GANEVA V. *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214(3), 825-832
- KLEIN T. *et al.* (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, *Nature*, 327, 70-73.
- KANDA T. and TAMURA T. (1991) Microinjection method for DNA in early embryos of the silkworm *Bombyx mori*, using air-pressure. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, 2, 31-46.
- LI ZHENGANG, ZHOU CONGZHAO, TANG HENGLI, FAN JIUGE (1997) YAC-based transfer for fibroin gene from *Antheraea yamamai* to *Bombyx mori* — II. Expression of the YAC Clone containing *A. yamamai* Fibroin Gene in *B. mori*, *Acta Entomologica Sinica*, 40(1), 1-5.
- LI ZHENGANG *et al.* Transfer of exogenous genes by microbeam laser between *Antheraea yamamai* and *Antheraea pernyi*, *Wild silkmoth* 89-90, (1991), H. Akai & M. Kiuchi eds. Inter. Society for wild silkmoths.
- LIU QINGHUI, LIU DEPEI, GUO ZHICHEN *et al.*, (1994) Construction of a transgenesis mouse line with homozygous human β -globin gene. *Chinese Science Bulletin*, 39(22), 2101-2102.
- LU H.S. *et al.* (1990) *The Sericultural Science in China*. 1st edit., Shanghai Scientific & Technical Publishers, Shanghai 129-135.
- MAEDA S. *et al.* (1985) Production of human alpha interferon in silkworms using a baculovirus vector. *Nature*, 315, 502-504.
- NIKOLAEV A.I. *et al.* (1993) *MGG* 236, 326-334.
- RICKWOOD D. & HAMES B.D. (1990) *Gel electrophoresis of nucleic acids*. 2nd edit. Oxford University Press, Oxford, 101-123.
- SAMBROOK J. *et al.* (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edit. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- TANG HENGLI, CAI JIANHUA & LI ZHENGANG (1995) YAC-based transfer of fibroin gene from *Antheraea yamamai* to domestic silkworm *Bombyx mori*. Identification of fibroin clones from a YAC library of *A. Yamamai* constructed from its posterior silk gland. *Science in China (Series B)*, 1995, 38(5) 590-595.
- YANCOPOULOS G.D., ALT F.W. Isolation of DNA from small amounts of cells or tissue. *In: Method for cloning and analysis of eukaryotic genes*, (1990), eds By Bothwell, A. Yancopoulos G.D. & Alt F.W., Jones & Bartlett Publishers, 6-7.

UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE TRANSGENESE PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE

LI ZHENGANG*, RENG RUI & ZHANG ZHIGANG

Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Chine.

L'oeuf fécondé du ver à soie, Bombyx mori, est entouré d'une coque dure (Lu H.S. et coll., 1990) et a une pression interne élevée (Kanda, T. et coll., 1991), de sorte qu'il est difficile d'injecter une solution d'ADN exogène dans l'oeuf. Jusqu'à présent, la manière habituelle est de percer la coque et de micro-injecter de l'ADN exogène dans l'oeuf (Kanda T., Tamura T., 1991 ; Nikolaev, A. I. et coll., 1993 ; Li Zhengang et coll., 1991, 1997) ; cela est préjudiciable et laborieux. Nous proposons une nouvelle technique qui fait passer l'ADN exogène par les canaux tortueux des pores aérifères des oeufs (environ 5000-10 000 pores par oeuf) au moyen de la PFGE (électrophorèse sur gel en champ pulsé). L'hybridation Southern sur taches et les expériences de transformation indiquent que les ADN exogènes sont transférés dans le plasmide de l'oeuf avec succès. Par conséquent, c'est une technique utilisable pour traiter une masse d'oeufs simultanément et sans dommage applicable à tous les oeufs d'insectes ou de poisson pour la transgénèse et même aux cellules de plantes à paroi cellulaire.

INTRODUCTION

Le ver à soie domestique, *Bombyx mori*, est un insecte économique profitable et est un modèle idéal pour les recherches sur l'expression et la régulation des gènes eucaryotiques. L'étude du ver à soie transgénique est importante à la fois en théorie et en pratique. Mais comme les autres insectes, l'oeuf fécondé du ver à soie, *B. mori* est entouré par une coque qui a longtemps été un obstacle au transfert de gènes. De plus, il y a une pression interne élevée à l'intérieur de l'oeuf, qui rend difficile l'injection de solution d'ADN exogène (Kanda T. et coll., 1991). Les approches transgéniques mises au point jusqu'à présent comprennent la micro-injection, le portage par sperme, la médiation BmNPV (Maeda S. et coll., 1985), la biolistique (Klein T.M. et coll., 1987) et ainsi de suite mais peu sont simples, et utilisables pour la transgénèse de l'oeuf de ver à soie. Les principaux problèmes à surmonter sont le côté laborieux, le coût, la propension à être infesté et à être abimé et même la mort (e. g. BmNPV). Jusqu'à présent la manière habituelle de procéder est de percer la coquille puis de micro-injecter l'ADN exogène dans l'oeuf (Kanda T. & Tamura T., 1991 ; Nikolaev A. I. et coll., 1993 ; Li Zhengang et coll., 1997).

Pour surmonter de tels obstacles et imperfections, nous avons mis au point une technique efficace et pratique de transfert de l'ADN exogène à travers les pores aérifères de l'oeuf par PFGE (électrophorèse sur gel en champ pulsé). Notre nouvelle méthode s'appuie sur les faits suivants : en premier lieu, chaque oeuf a environ 5000-10000 pores aérifères, dont chacun a un canal tortueux de 4-10 µm de diamètre conduisant à l'ovoplasme (Lu H.S. et coll., 1990). En deuxième lieu, sous courant alternatif ou sous gel en champ pulsé fourni par PFGE (Sambrook et coll., 1989), les molécules d'ADN exogène devraient pénétrer les pores et passer au travers des canaux tortueux dans l'oeuf. L'hybridation Southern sur taches indique que l'ADN exogène (jusqu'à 12,2 Kb en longueur) est transféré dans l'ovoplasme avec succès. Le taux de survie est élevé, jusqu'à 40-50 %. Cette nouvelle

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

approche est utilisable pour traiter une masse d'oeufs simultanément et sans dommage. Elle peut s'appliquer à tous les oeufs d'insectes ou de poissons pour le transfert de gènes et même aux cellules de plantes à paroi cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels :

Tous les oeufs sont obtenus à partir de chrysalides en laboratoire. Les chrysalides ont été fournies gracieusement par le *Sericultural Research Institute, National Academy of Agricultural Sciences of China*, Zhenjiang. Le plasmide pAy6.8 (contenant le cœur du gène de la fibroïne d'*Antheraea yamamai*, fragment pAy, 6.8Kb, dans pUC13) et le plasmide pFb100 (contenant une zone modulatrice en amont, le premier exon et son intron partiel du gène de fibroïne *B. mori* fragment Fb 1,4 Kb, dans pBR322) est un don du Dr Suzuki (*National Fundamental Bioscience Research Institute*, Japon). L'appareil PFGE est de type DY-4A CHEF. Le kit Random Primer et filtres nylon proviennent de BRA. L' α -³² PdATP a été obtenue de Yahui Medical Engineering Company, Beijing.

2. Préparation de l'ADN exogène :

Les plasmides pFb-Ay ont été reconstruits, puis transformés dans les cellules compétentes de *E. coli* (DH5 α) puis amplifiés, extraits, purifiés et détectés selon les procédures habituelles décrites dans *Molecular Cloning* (Sambrook, J. et coll., 2ème edit., 1989). La principale partie du plasmide reconstitué pFb-Ay est le pBR322 : de plus, il contient la partie principale du fragment Fb (environ 1.1Kb) et le fragment de Ay6,8 (un petit fragment entre les sites Xma I et Xho I à l'intérieur de pFb100 est retiré et le fragment Ay6,8 est inséré) ; la longueur totale est 12,2 Kb.

3. Transfert de l'ADN exogène :

3.1. Transfert de pFb-Ay dans les oeufs par électrophorèse sur gel en champ pulsé :

Nous avons collecté les oeufs deux heures après la ponte. La procédure complète d'électrophorèse sur gel en champ pulsé doit être réalisée dans les huit premières heures après la ponte pendant la période unicellulaire. Nous enveloppons le mélange d'oeufs (environ 1000 oeufs) et de gènes désirés (pFb-Ay) dans un agarose à point de fusion bas (LMA) (ou d'une autre manière, nous introduisons les oeufs dans le gel d'agarose et ajoutons les ADN désirés dans un bac à échantillon), puis avons pratiqué la PFGE jusqu'à ce que l'ADN circule dans la zone de gel contenant les oeufs. L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% (gel de support) et LMA à 1% (gel d'emballage) dans une solution 0,5 $\times$ TBE à 5v/cm et 4° C avec 1s ou 2s de temps de transition (Rickwood D. et coll., 1990) pendant 3-4 heures.

3.2. Transfert du pFb-Ay par électrophorèse dans un champ constant en courant direct :

Entre-temps, nous prenons un autre mélange d'oeufs (environ 1000 oeufs) et d'ADN désiré pour réaliser l'électrophorèse normale comme témoin séparément. On pratique aussi l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (gel de support) et LMA à 1 % (gel d'emballage) dans une solution 0,5 $\times$ TBE à 5v/cm et 4° C, mais réalisée sous champ constant à courant direct pendant environ une heure, tandis que l'ADN se déplace vers la zone du gel contenant les oeufs (oeufs non-PFGE).

3.3. Lavage des oeufs :

Après l'électrophorèse, nous retirons les oeufs PFGE et les oeufs témoin (oeufs non PFGE) du gel. Les oeufs sont lavés dix fois avec une solution tampon PBS et de l'eau déionisée alternativement. Nous utilisons une pipette à grand trou pour un rinçage complet à chaque fois, afin d'éliminer le contaminant potentiel de la coque. Les oeufs PFGE sont divisés en trois groupes (chacun d'environ 300 oeufs) par échantillonnage stochastique pour extraire l'ADN ou examiner le taux de survie.

3.4. Incubation des oeufs après PFGE :

Après l'électrophorèse, 300 oeufs sont pris au hasard, puis incubés à 25 °C (Lu H.S. et coll., 1990) pour examiner leur taux de survie.

4. Préparation de l'ADN des oeufs :

4.1. Isolement de l'ADN des oeufs non-PFGE :

300 et 700 oeufs non-PFGE sont pris au hasard respectivement. Les oeufs sont broyés dans un homogénéiseur en verre dans le tampon d'extraction, les coques sont éliminées par centrifugation à 100g pendant 5 min. La solution qui reste est recueillie pour en extraire l'ADN selon la méthode de Yancopoulos & Alt (1990) qui convient pour isoler l'ADN de petites quantités de cellules ou de tissus. L'ADN de 300 oeufs est utilisé pour la technique d'hybridation Southern sur tache ; l'ADN de 700 oeufs est utilisé pour la transformation d'E. coli (DH5 α)

4.2. Isolement de l'ADN total des oeufs PFGE :

300 oeufs PFGE sont pris au hasard. Les oeufs sont homogénéisés dans un broyeur de verre et l'ADN total, contenant à la fois l'ADN de l'ovoplasme et de la coque, est extrait comme il est spécifié en 4.1.

4.3. Isolement séparé de l'ADN de l'ovoplasme et de l'ADN de la coque des oeufs PFGE :

300 oeufs PFGE sont collectés au hasard. Des microélectrodes de verre avec un embout d'environ 30 μ sont préparées. Le filament de tungstène est électrolysé dans une solution NaOH saturée, avec un embout pointu d'environ 50 μ . Les oeufs sont percés un à un avec une aiguille de tungstène actionnée par un micro-moteur sous un microscope de dissection, puis l'ovoplasme est aspiré par la microélectrode de verre, et transféré dans le tampon d'extraction. L'ADN est extrait comme il est indiqué en 4.1. Ainsi, cet ADN est l'ADN de l'ovoplasme sans le contaminant de la coque. Pour le reste des coques, il faut aussi extraire l'ADN par la méthode indiquée.

5. Buvardage et hybridation sous tâches:

5.1 Préparation des sondes ADN marquées isotopiquement :

Les ADN désirés sont extraits de LMA par électrophorèse sur gel. Les sondes (pAy6.8*) sont marquées par extension d'amorces aléatoires avec de l' α -³²P-dATP (Sambrook, J. et coll., 1989).

5.2 Hybridation Southern sur tâches :

L'ADN de l'ovoplasme, l'ADN de la coque, l'ADN total des oeufs PFGE et l'ADN des oeufs non-PFGE sont pris comme échantillons. L'ADN désiré (pAy6.8) est pris comme échantillon positif, l'ADN de *B. mori* et le tampon TE comme témoin négatif (de manière à éliminer la possibilité d'homologies de séquences existant dans *B. mori* tout comme la présence de contaminant dans le tampon dans les mêmes conditions) et tous les échantillons sont dénaturés et immobilisés sur des membranes de nylon. Selon les procédures de préhybridation, la membrane de nylon contenant l'ADN cible est incubée dans une solution de préhybridation (6 $\times$ SSC, 5 $\times$ réactif Denhardt, 0,5 % SDS, 50% de formamide déionisée, 0,1 mg/ml C.T.ADN) à 42 °C pendant 4 heures. La solution de préhybridation est remplacée par une solution d'hybridation (6 $\times$ SSC, 0,5% SDS, 50 % de formamide déionisée, 0,1 mg/ml C.T. ADN, 25 ng/ml de sonde marquée isotopiquement) incubée à 42 °C pendant 24 heures. La membrane de nylon est lavée deux fois de manière stringente avec 2 $\times$ SSC/0,1 % dodécylsulfate de sodium à température ambiante pendant 15 minutes, et finalement lavée deux fois avec 0,1 $\times$ SSC/0,1% dodécylsulfate de sodium à 55 °C pendant 30 minutes. La membrane de nylon est déposée sur un film à rayons-X pour obtenir une image autoradiographique et prendre des photos.

6. Test quantitatif pour mesurer pFb-Ay à l'intérieur de l'oeuf :

6.1 Recirculisation de l'ADN PFGE :

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé est réalisée pour 1500 oeufs mélangés avec pFb-Ay comme il est mentionné en 3.1 et divisés en deux part égales (chacune d'environ 700 oeufs) par échantillonnage aléatoire. 700 oeufs sont pris pour l'extraction de l'ADN total comme en 4.2. et 700 oeufs sont pris pour extraire l'ADN de l'ovoplasme et l'ADN de la coque comme en 4.3. Environ 0,5 unité d'ADN ligase de bactériophage T4 est ajoutée à l'ADN de l'ovoplasme, de la coque et à l'ADN total respectivement. Le mélange est incubé pendant 8 heures à 16° C, et stocké à 4° C.

6.2. Recirculisation de l'ADN non-PFGE :

Environ 0,5 unité d'ADN ligase de bactériophage T4 est ajoutée à l'ADN non-PFGE comme en 4.1 de 700 oeufs non-PFGE. Le mélange est incubé pendant 8 heures à 16° C, et stocké à 4°C.

6.3 Transformation de *E. coli* compétent avec de l'ADN PFGE :

La réaction de transformation de l'*E. coli* compétente (DH5 α) est réalisée selon les procédures habituelles (in 'Molecular cloning', par Sambrook et coll., 2nd ed) avec l'ADN PFGE recircularisé de l'ovoplasme, de la coque et de l'oeuf entier respectivement. Ing de pFb-Ay d'ADN est pris comme témoin positif. L'ADN des oeufs non-PFGE est pris comme témoin négatif. Puis chacun des échantillons de transformation est dispersé séparément sur une boîte de milieu contenant l'ampicilline. Après incubation pendant la nuit, on compte le nombre de colonies sur chaque boîte.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse de l'hybridation sur taches :

pFb-Ay est choisi comme ADN exogène. Le plasmide pFb-Ay contient la partie centrale du gène de fibroïne de *A. yamamai* (6,8Kb), la partie principale de pFb100 (environ 1,1 Kb) et le pBR322 ; c'est donc un fragment de 12,2 kb. Comme le montre la Figure 2., la tache positive obtenue avec l'ADN total indique que les ADN exogènes n'ont pas contourné les oeufs mais les ont traversés. Le gel est coloré avec de l'EB (bromure d'éthidium) et scanné aux UV pendant l'électrophorèse en champ pulsé, ce qui montre que l'ADN est ralenti dans la région contenant les oeufs le mouvement de l'ADN le long de la région des oeufs étant interrompu. Tout cela suggère que la plupart de l'ADN exogène est capté par les oeufs et retenue dans la zone contenant les oeufs. De plus, la tache positive obtenue avec l'ovoplasme correspondant à l'intérieur de l'oeuf sans contamination d'ADN de la coque, prouve que l'ADN exogène est vraiment rentré dans l'ovoplasme. La tache positive obtenue avec la coque suggère que l'ADN exogène passe par les canaux tortueux des pores aérifères, puis entre dans l'ovoplasme. Toutefois, le résultat négatif obtenu avec l'ADN non-PFGE (E) suggère que l'ADN exogène (pAy6.8) n'est pas seulement incapable de se transférer dans l'ovoplasme, mais ne rentre pas dans les canaux tortueux de l'oeuf sous électrophorèse en champ constant de courant direct. La plus grande partie de l'ADN contaminant la surface de l'oeuf ou contenue au niveau supérieur des pores aérifères peut facilement être éliminée au rinçage ; certains ADN qui restent ne peuvent pas être détectés par hybridation sur tache.

2. Test quantitatif des oeufs transformés :

La réaction de la transformation de l'ADN recircularisée (6.1 et 6.2) dans la cellule compétente de *E. coli* (DH5 α) est réalisée (voir 6.3), puis chaque échantillon de transformation est dispersé sur une boîte de milieu contenant l'ampicilline. Si les ADN sont formés de fragments pFb-Ay contenant un gène de résistance à l'aminopénicilline (Ap^r) les bactéries *E. coli* sont capables de former des colonies sur le milieu sélectif contenant de l'aminopénicilline. Ainsi, plus le nombre de clones est élevé plus de pFb-Ay se sont transformés dans l'ovoplasme ou la coque des oeufs. Les résultats des différents clones contenant des pFb-Ay transformés sont présentés dans le Tableau I.

En accord avec le témoin positif, si nous avons extrait 1ng pFb-Ay (une partie de l'ADN extrait) de 700 oeufs transgéniques, cela permet au DH5 α transformé de développer 6000 colonies sur le milieu sélectif. On peut donc calculer la quantité de pFb-Ay transférée dans l'oeuf par PFGE.

1. Quantité de pFb-Ay transférée à l'intérieur des oeufs entiers (ADN de l'ovoplasme plus ADN de la coque) :

$$\text{Dans 700 oeufs : } 200/6000 \times 1\text{ng} \equiv 30\text{pg} \equiv 30 \times 10^{-12} \text{ g.}$$

$$\text{Dans un oeuf : } (30 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ oeufs}) / 1,3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 3000 \text{ plasmides}$$

[notes] Comme on sait que la taille de l'ADN de pFb-Ay est 12,2kb (Fig. 1), en l'occurrence, environ 4 μm , et que l'ADN d'une longueur de 1 μm a un poids moléculaire de 2×10^6 daltons, et 1g d'ADN a un poids moléculaire de 6×10^{23} .

Donc un plasmide de pFb-Ay (12,2Kb) correspond à :

$$4 \times (2 \times 10^6) / 6 \times 10^{23} \equiv 1,3 \times 10^{-17} \text{ g}$$

2. Quantité de pFb-Ay transférée à l'intérieur de la coquille :

$$\text{Dans 700 coques : } 30/6000 \times 1\text{ng} \equiv 5 \text{ pg} \equiv 5 \times 10^{-12} \text{ g}$$

$$\text{Dans un oeuf : } (5 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ oeufs}) / 1,3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 500 \text{ plasmides}$$

3. Quantité de pFb-Ay transféré à l'intérieur de l'ovoplasme des oeufs :

$$\text{Dans 700 oeufs : } 20/6000 \times 1\text{ng} \equiv 3\text{pg} \equiv 3 \times 10^{-12} \text{ g}$$

$$\text{Dans un oeuf : } (3 \times 10^{-12} \text{ g} \div 700 \text{ oeufs}) / 1,3 \times 10^{-17} \text{ g} \equiv 300 \text{ plasmides.}$$

Ainsi qu'il a déjà été mentionné plus haut, la quantité de pFb-ay transférée dans l'oeuf entier est supérieure à la somme ovoplasmes + coques : cela peut être dû à l'hydrolase ou aux pertes pendant l'opération. Par exemple, l'ovoplasme parce qu'il adhère à la coque et aux microélectrodes, de sorte que les quantités de pFb-Ay des coques apparaissent plus élevées que celles des ovoplasmes.

3. Incubation des oeufs après électrophorèse sur gel en champ pulsé :

La clé quan à l'application de cette nouvelle technique est de savoir si les oeufs survivent et se développent normalement après la PFGE. En général, les oeufs normaux passent du jaune clair au noir deux jours après la ponte à cause de la membrane cellulaire sous la coquille qui est bien développée, tandis que les oeufs qui ne se développent pas restent jaune clair. C'est un indice fiable pour vérifier le taux de survie des oeufs. Le fait que les oeufs passent partiellement du jaune clair au noir (Fig. 3 droite) après deux jours d'incubation à 25° C est un phénomène encourageant. Le taux de survie s'élève à 40 %.

Cependant, tous les résultats indiquent que la PFGE peut faire passer les (pFb-Ay) exogènes par les pores aérifères, les coller en premier lieu à la membrane et ensuite les transférer dans l'ovoplasme par un mécanisme inconnu (Ganeva V. et coll., 1995). De plus, les résultats d'hybridation sur tâches et de transformation de DH5 α suggèrent qu'il y a des copies d'ADN en nombre dans chaque oeuf transgénique. Cela est en accord avec la règle générale selon laquelle les ADN exogènes s'enchaînent et s'intègrent à l'ADN génomique (Liu Qinghui et coll., 1994). De plus, cette technique doit permettre de transférer de plus longs fragments d'ADN que les autres méthodes. Comme on le sait, plus les fragments d'ADN sont longs, plus l'intégrité du gène désiré contenant ses séquences régulatrices est préservée, ce qui est utile pour l'intégration et l'expression du gène désiré (Tang Hengli et coll., 1995).

En conclusion, il se peut que la technique de transgénèse PFGE fournisse une manière efficace de transférer d'importants fragments d'ADN. C'est une technique de transferts de gènes utilisable pour traiter une masse d'oeufs simultanément et sans dommage pour les oeufs d'insectes, les oeufs de poisson et même les cellules de plantes sans préparer les protoplastes. Elle a donc une importante valeur d'application dans le transfert de gènes, surtout pour le ver à soie *B. mori*.

EFFECT OF BODY WEIGHT ON EFFECTIVENESS OF THE INSECT GROWTH REGULATOR (I.G.R) FENOXYCARB APPLIED TO THE MALE AND FEMALE SILKWORM (*BOMBYX MORI*) (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

L. CAPPELLOZZA¹, P. IANNE² & S. CAPPELLOZZA¹

1. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova, via dei Colli 28, 35143 Padova, Italy.

2. Silkworm laboratory, Ratti technologies, via Madonna 30, 22070 Guanzate (Como), Italy.

*Experiments were performed to determine the role of sex and body weight in the response of the last instar silkworm, **Bombyx mori**, to the topically applied Juvenile Hormone Analogue (JHA) fenoxycarb. The effect of the chemical was studied on the larval body weight, on the weight of cocoons, cocoon shells, pupae, on the silk percentage, on the time of spinning, on the spinning duration and on the mortality rate. All the above-mentioned parameters were affected in a different way according to the sex and body weight, which, therefore, seem to be important variables in determining the sensitiveness of the silkworm to the JHA.*

Keywords: *Bombyx mori*, silkworm, fenoxycarb, sex, larval weight.

INTRODUCTION

The I.G.R. fenoxycarb (ethyl[2-(p-phenoxy-phenoxy)ethyl]carbamate) has many effects on the silkworm *Bombyx mori*. The tremendous impact of the active ingredient (a.i) on silkworm metamorphosis is better-known as the 'non-spinning syndrome' and has been studied since 1989-90 in France, Italy and Japan, where the phenomenon was first recorded in silkworm rearing for cocoon production.

Apart from the very high sensitiveness of *B. mori* to infinitesimal doses of the chemical (Cappellozza *et al.*, 1990; Kamimura, 1995; Leonardi *et al.*, 1996) various experiments showed the time at which exposure to fenoxycarb begins is critical to the activity observed, as the last larval instar (Kamimura, 1995) and the last part of the fifth larval instar are the most affected by the a.i (Cappellozza *et al.* 1995). Recently, Dedos and Fugo (1996) reported that fenoxycarb strongly inhibits the secretory activity of the prothoracic glands (PGs) early in the fifth instar, as well as at the onset of the pupal commitment. Nevertheless, the chemical is not able to induce a developmental arrest after the pupal commitment and, on the contrary, it has a positive effect on the secretory activity of the PGs after the wandering behaviour.

The effectiveness of fenoxycarb depends also on the *B. mori* strain (Assal *et al.*, 1994) and on the method of its application (Cappellozza & Cappellozza, 1994).

This paper aims to determine the role of the body weight of male and female silkworm larvae in their response to the topical application of fenoxycarb at the beginning of the fifth instar; in fact susceptibility of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae) to fenoxycarb suggests both

weight and sex may be considered as possible relevant variables in the quantification of JHA effects on Lepidoptera (Robertson, 1982).

MATERIALS AND METHODS

Animals:

In the silkworm the sex of the larvae is not easy to discriminate until the beginning of the fifth instar, when the Herold and Ishiwata imaginal buds become visible on the ventral side of the posterior abdominal segments. A convenient method for larval sexing was established by Tazima by tagging one of the sex chromosomes with genetic markers (Sakaguchi, 1978). A dominant gene, which is distinct in larval marking, was translocated to the W chromosome; sexing is possible by checking for this marker trait. In a strain (RG 36) belonging to the germoplasm collection of the 'Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova', the translocation to the W chromosome was applied to a marker gene expressed early in the larval stage and which causes the black coloration of the skin of female larvae. This strain was used for the study, in order to easily separate male from female larvae at the beginning of the fifth instar.

Rearing:

A great deal of larvae was bulk reared on an artificial diet until the fourth moulting, in the 'Ratti's Silkworm Laboratory'. The artificial diet 'Katakura' for pure strains was imported from Japan; the larvae were reared in standard conditions of temperature, humidity and light. Then the larvae were transferred to the 'Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova', where the experiment was carried out during the last instar. Here larvae were divided in groups according to their weight and sex in order to create two different classes of weight for each sex, every class being separate from the next by at least 50 mg (see Tables I-II, hour 0).

Since on average female larvae are heavier than male, the following groups were created:

- 1) Male High Weight (M.H.W.) : body weight heavier than 0.650 g at the beginning of the last instar.
- 2) Male Low Weight (M.L.W) : body weight lighter than 0.600 g at the beginning of the last instar.
- 3) Female High Weight (F.H.W) : body weight heavier than 0.750 g at the beginning of the last instar.
- 4) Female Low Weight (F.L.W) : body weight lighter than 0.700 g at the beginning of the last instar.

The larvae were individually reared on an artificial diet also in the fifth instar in plastic transparent boxes, under 12:12 hours Light : Dark photoperiod, at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and 60% R.H (Relative Humidity).

Treatments:

All the four groups above-mentioned were divided into three equal parts of 40 larvae each and the different lots (A,B,C) of each group were treated as follows:

- A) 2.5 μg of fenoxycarb (of commercial grade) diluted in 1 μl of ethanol (topical treatment after the fourth moulting)
- B) 2.5 ng of fenoxycarb diluted in 1 μl of ethanol (topical treatment after the fourth moulting)
- C) 1 μl of ethanol (topical treatment after the fourth moulting)

The treatments were applied to the thoracic dorsum of each insect.

In previous experiments it had been proved that there were no differences between control and ethanol (1 μl) treated insects with regard to the parameters tested in this study (larval body weight, weight of cocoons, cocoon shells and pupae, day of spinning, duration of spinning, rate of mortality).

Statistical analysis :

Daily measurements of the weights of larval bodies were recorded as well as cocoon, cocoon shell and pupa weights. Furthermore, the day of spinning of each group, the duration of spinning and the larval, pupal and adult mortality rates were evaluated. Corrected mortality of each lot was calculated according to the Schneider-Orelli formula (Tremblay, 1982).*

ANOVA with Duncan's test was used to determine the statistical significance of the effects of fenoxycarb on the weight of larval bodies in the fifth instar, on the weight of cocoons, cocoon shells and pupae. χ^2 test was performed on mortality rates. To evaluate the effects of the dosages of fenoxycarb on mortality rates with regard to sex and weight classes the variables were analysed by grouping the data into 2×2 contingency tables and by making different comparisons. The Yate's correction was used in the calculation of the χ^2 value, for one freedom degree.

The statistical analysis was done using a computer software (Statgraphics plus 2).

RESULTS

Effect of fenoxycarb on the larval body weight in the fifth instar:

Tables I-II show the larval growth of male and female larvae of the two classes of weight. Daily measurements of body weights and their standard deviations are recorded; in addition, the results of the Duncan's test are shown. The values of each group and hour which have no small letters in common differ significantly for $P = 0.05$. Values which have no capital letters in common differ significantly for $P = 0.01$.

The weight gained by the control insects of both the sexes during the fifth instar and measured immediately before the spinning stage depended on the weight of the larval bodies at the beginning of the fifth instar. The same trend was recorded in the treated insects, which showed an identical pattern of growth as the control larvae, but with a delay in time when they showed the maximum peak in their weight. However, this peak was recorded about 24 hours before the spinning time also for the treated animals.

As can be seen in the above-mentioned tables, the effect of the topical treatment with fenoxycarb on the larval body weight began to be statistically significant at the 48th hour of the fifth instar for the L.W. larvae of both sexes, and at the 72nd hour of the fifth instar for the H.W. larvae of both sexes. The treatment with fenoxycarb caused a delay in the growth of the larvae in the early part of the last instar; this delay was balanced by an anomalous increase of the larval weight in the late part of the instar, which was prolonged by several days (Tables I-II). Moreover, in the L.W. male and female lots the inhibitory effect of fenoxycarb on larval weight remained significant until the day of spinning of the control group (for both 2.5 pg and 2.5 ng treatments), while in the H.W. male lots it lasted only until the 120-144th hour and in H.W. female lots it remained relevant until the 144-168th hour but less remarkable than in the low weight class. Because of the prolongation of this inhibitory effect on the M.L.W. larvae treated with 2.5 pg, their body weight did not increase much more than in the control M.H.W. lot (3.225 vs. 3.135) and the body weight of F.L.W. larvae treated with 2.5 pg remained even lower than in the control F.H.W. lot (4.302 vs. 4.828) (Table I-II).

Effects of fenoxycarb on the weight of cocoons, cocoon shells, pupae and on silk percentage:

The weights of cocoons, shells and pupae depended on the body weights of the larvae at the beginning of the fifth instar (Table III). Furthermore, cocoons, shells and pupae produced by female

* Corrected mortality = $\frac{\text{Mortality of the dosage} - \text{Mortality of the control group}}{100 - \text{Mortality of the control group}} \times 100$

Table I. Average larval weights (g) and standard deviation (g) of larval bodies in the fifth instar (male)

Taleau I. Poids moyen (g) et écart type (g) des larves au cinquième âge (mâles).

Hours of the 5th instar <i>Heures au cinquième âge</i>	M.H.W 1 µl ethanol	M.H.W. 2.5 pg fenoxycarb	M.H.W 2.5 ng fenoxycarb	M.L.W 1µl ethanol	M.L.W 2.5 pg fenoxycarb	M.L.W 2.5 ng fenocycarb
0	0.759 0.091 Aa	0.764 0.104 Aa	0.752 0.121 Aa	0.536 0.050 Aa	0.531 0.047 Aa	0.522 0.046 Aa
24th	1.169 0.195 Aa	1.193 0.230 Aa	1.166 0.236 Aa	0.784 0.078 Aa	0.744 0.086 Aa	0.753 0.097 Aa
48th	1.515 0.298 Aa	1.535 0.330 Aa	1.498 0.329 Aa	1.022 0.135 Aa	0.921 0.122 Bb	0.914 0.146 Bb
72nd	2.053 0.356 Aa	1.985 0.385 AaBb	1.985 0.393 Bb	1.399 0.197 Aa	1.237 0.187 Bb	1.204 0.232 Bb
96th	2.606 0.346 Aa	2.533 0.422 Bb	2.318 0.422 Cc	1.900 0.293 Aa	1.668 0.266 Bb	1.505 0.259 Cc
120th	2.986 0.308 Aa	2.876 0.418 AaBb	2.802 0.440 Bb	2.378 0.328 Aa	1.995 0.329 Bb	1.922 0.325 Bb
144th	3.135 0.340 Aa	3.239 0.459 Aa	3.232 0.433 Aa	2.752 0.359 Aa	2.391 0.372 Bb	2.257 0.336 Cc
168th	spinning <i>filage</i>	3.536 0.459 Aa	3.531 0.452 Aa	spinning <i>filage</i>	2.705 0.350 Aa	2.473 0.374 Bb
192nd		3.809 0.478 Aa	3.768 0.459 Aa		3.044 0.373 Aa	2.743 0.398 Bb
216th		3.941 0.523 Aa	4.008 0.447 Aa		3.225 0.367 Aa	3.021 0.418 Bb
240th		spinning <i>filage</i>	4.284 0.424 Aa		spinning <i>filage</i>	3.252 0.441 Bb
264th			4.571 0.428 Aa			3.577 0.420 Bb
288th			4.833 0.413 Aa			3.892 0.444 Bb
312th			4.905 0.430 Aa			4.023 0.496 Bb
336th			4.961 0.430 Aa			4.062 0.467 Bb
360th			spinning			spinning

Table II. Average larval weights (g) and standard deviation (g) of larval bodies in the fifth instar (female).*Tableau II.* Poids moyen des larves (g) et écart type (g) des larves au cinquième âge (femelles).

Hours of the fifth instar	F.H.W 1 µl ethanol	F.H.W 2.5 pg fenoxycarb	F.H.W 2.5 ng fenoxycarb	F.L.W 1 µl ethanol	F.L.W 2.5 pg fenoxycarb	F.L.W 2.5 ng fenoxycarb
<i>Heures au cinquième âge</i>						
0	0.845±0.084 Aa	0.838±0.084 Aa	0.836±0.069 Aa	0.621±0.045 Aa	0.626±0.069 Aa	0.627±0.049 Aa
24th	1.242±0.160 Aa	1.254±0.209 Aa	1.255±0.183 Aa	0.913±0.092 Aa	0.905±0.075 Aa	0.864±0.092 Aa
48th	1.677±0.292 Aa	1.657±0.343 Aa	1.631±0.299 Aa	1.214±0.111 Aa	1.176±0.135 Ab	1.113±0.139 Bc
72nd	2.382±0.373 Aa	2.233±0.464 Bb	2.115±0.427 Bc	1.648±0.194 Aa	1.570±0.201 Bb	1.497±0.235 Bc
96th	3.240±0.452 Aa	3.050±0.648 Bb	2.788±0.490 Cc	2.419±0.279 Aa	2.015±0.276 Bb	2.046±0.302 Bb
120th	3.983±0.484 Aa	3.601±0.648 Bb	3.276±0.518 Cc	3.024±0.324 Aa	2.423±0.331 Bb	2.476±0.364 Bb
144th	4.549±0.507 Aa	4.249±0.706 Bb	3.715±0.579 Cc	3.548±0.378 Aa	2.899±0.386 Bb	2.795±0.408 Bc
168th	4.828±0.478 Aa	4.646±0.662 Ab	4.080±0.612 Bc	3.820±0.328 Aa	3.355±0.400 Bb	3.096±0.467 Cc
192nd	spinning <i>filage</i>	4.956±0.619 Aa	4.431±0.615 Bb	spinning <i>filage</i>	3.756±0.396 Aa	3.375±0.520 Bb
216th		5.067±0.596 Aa	4.825±0.654 Aa		4.031±0.423 Aa	3.678±0.611 Bb
240th		5.051±0.600 Aa	5.133±0.673 Aa		4.302±0.364 Aa	4.116±0.674 Aa
264th		spinning <i>filage</i>	5.557±0.687		spinning <i>filage</i>	4.592±0.705
288th			5.896±0.738			4.942±0.762
312th			6.227±0.761			5.357±0.781
336th			6.357±0.791			5.666±0.708
360th			6.381±0.700			5.844±0.820
384th			6.413±0.754			6.028±0.790
408th			spinning <i>filage</i>			spinning <i>filage</i>

were generally heavier than those by male larvae (comparing the same weight class for both the sexes), but the silk percentage (cocoon shell weight/whole cocoon weight) was lesser in the female groups (Table III). The weight of the cocoons increased according to the increase of the fenoxycarb dosages and likewise the weight of the cocoon shells and of the pupae rose; on the other hand, the effects of increasing dosages on the silk percentage were not so relevant. For example, Table III shows that the dosage of 2.5 ng caused an increase in silk percentage, in comparison to the lesser dosage of 2.5 pg, only in the M.L.W. group; instead, in the M.H.W. the treatment with the higher dosage resulted in a decrease in the silk percentage in comparison to the lower dosage. Furthermore, it is easy to assess

that the increase in the weight of the cocoon shell is proportional to the days of the prolongation of the fifth instar.

Table III. Average weights of cocoons, pupae, silk shells, silk percentage in the different groups of larvae.

Table 3. Poids moyen des cocons, des chrysalides, des coques soyeuses et pourcentage de soie des différents groupes de larves.

Groups	Cocoon weight (g)	Pupal weight (g)	Silk shell weight (g)	Silk percentage (%)
Groupes	Poids du cocon (g)	Poids nymphal (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
M.H.W. 1µl ethanol	1.277 Cc	1.047 Cc	0.230 Cc	18
M.H.W. 2.5 pg fenoxycarb	1.528 Bb	1.209 Bb	0.319 Bb	21
M.H.W. 2.5 ng fenoxycarb	1.982 Aa	1.616 Aa	0.366 Aa	18
M.L.W. 1µl ethanol	1.186 Cc	0.986 Cc	0.200 Cc	17
M.L.W. 2.5 pg fenoxycarb	1.353 Bb	1.081 Bb	0.272 Bb	20
M.L.W. 2.5 ng fenoxycarb	1.652 Aa	1.308 Aa	0.344 Aa	21
F.H.W. 1 µl ethanol	1.950 Cc	1.624 Cc	0.326 Cc	16
F.H.W. 2.5 pg fenoxycarb	2.029 Cb	1.695 Cb	0.344 Cc	16
F.H.W. 2.5ng fenoxycarb	2.508 Ba	2.105 Ba	0.398 Bh	16
F.L.W. 1µl ethanol	1.649 Cc	1.385 Cc	0.264 Cc	16
F.L.W. 2.5 pg fenoxycarb	1.731 Bb	1.441 Cb	0.290 Cb	17
F.L.W. 2.5 ng fenoxycarb	2.101 Aa	1.744 Ba	0.357 Ba	17

Values of each group and time which have no small letters in common differ significantly for $P = 0.05$.

Values which have no capital letters in common differ significantly for $P = 0.01$. Les valeurs de chaque groupe et heure qui n'ont pas de lettres minuscules en commun varient de manière significative ($P = 0.05$). Les valeurs qui n'ont pas de lettres majuscules en commun varient de manière significative ($P = 0.01$).

Effects of fenoxycarb on the time of spinning and spinning duration:

The topical treatment with fenoxycarb caused a delay in cocoon spinning which was different according to the group and dosage: spinning occurred on the same day for non-treated larvae of different weight classes and of the same sex. On the other hand, female control groups showed a delay in spinning of one day in comparison to the male control ones. In other words, there were no apparent relationships between the body weight and the duration of the larval instar, but there were between the sex and the duration of the instar.

In this experiment a delay in spinning shorter than 24 hours was not considered.

It should be outlined that the spinning behaviour in treated groups had the same pattern of the control groups: no differences were recorded among the days of spinning of different weight classes in the same sex, which were treated with identical amounts of the chemical; however, the female lots showed a delay in spinning with respect to the male ones, which rose with increasing dosages (see Table I-II). Nevertheless, even if the delay of the spinning time in treated animals was different according to the sex, it was of the same length in comparison to their respective controls in 2.5 pg

Table IV. Mortality percentage recorded in the different lots from the beginning of the fifth instar to the eclosion of the moths

Tableau IV. Pourcentage de mortalité enregistré pour les différents lots du début du cinquième âge jusqu'à l'éclosion des papillons.

	LOTS	Corrected mortality (%)
		<i>Mortalité corrigée (%)</i>
2.5 pg fenoxycarb	M.H.W.	46
	M.L.W.	13
	F.H.W.	38
	F.L.W.	11
2.5 ng fenoxycarb	M.H.W.	65
	M.L.W.	31
	F.H.W.	78
	F.L.W.	83

fenoxycarb-treated male and female insects, while it was 24 hours longer in 2.5 ng fenoxycarb-treated female lots than in the corresponding male ones (Table I-II). Therefore, the difference between the sexes was relevant only at the highest dosage. In addition, the duration of the spinning process was generally longer for the fenoxycarb-treated female larvae than for the male ones and was strictly dependent on the dosage. In fact, it lasted 24 hours in the M.L.W. group, 72 hours in the M.H.W. and F.L.W. groups and 120 hours in the F.H.W. group.

Effect of fenoxycarb on mortality rate of the different lots:

The evaluation of corrected mortality rates is shown in table IV.

Furthermore the following comparisons were made:

- 1) Control vs treated groups: **Highly significant ($P = 0.01$)
- 2) Male lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb vs male lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb: * Significant ($P = 0.05$)
- 3) Female lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb vs

female lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb: ** Highly significant ($P=0.01$)

- 4) M.H.W. lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb vs
M.L.W. lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb: ** Highly significant ($P=0.01$)
- 5) M.H.W. lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb vs
M.L.W. lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb: ** Highly significant ($P=0.01$)
- 6) F.H.W. lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb vs
F.L.W. lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb: n.s. ($P=0.05$) but significant ($P=0.10$)
- 7) F.H.W. lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb vs
F.L.W. treated with 2.5 ng of fenoxycarb: n.s. ($P=0.05$)
- 8) Male lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb vs
female lots treated with 2.5 pg of fenoxycarb: n.s. ($P=0.05$)
- 9) Male lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb vs
female lots treated with 2.5 ng of fenoxycarb: * Significant ($P=0.05$).

DISCUSSION

Juvenile hormone analogues (JHA) affect voluntary food ingestion and larval body weight in fifth instar silkworm larvae (Assal *et al.*, 1994; Anonymous). The investigations which had been carried out to evaluate the effect of fenoxycarb on the larval gut, ascertained a dose-dependent relationship between the chemical and the changes in the ultrastructure of the epithelium in the midgut (Leonardi *et al.*, 1994). Moreover, low dosages (10 fg) of fenoxycarb, which were topically applied on fifth instar silkworm larvae, showed a stimulatory effect on the leucine uptake both in the midgut and in the foregut of the insects, while higher doses (10 ng) had an inhibitory effect on the amino acid uptake (Leonardi *et al.*, 1994). It has yet not been clarified how these physiological events act on larval growth and why after an inhibitory action on body weight in the early instar, the administration of fenoxycarb results in an anomalous increase in weight (Tables I-II). Probably this phenomenon is due to the prolongation of the fifth instar itself rather than to a stimulatory effect of the chemical (Tables I-II); in fact, a similar effect was observed with methoprene (Anonymous).

The inhibitory action of the fenoxycarb also affected silk production (silk percentage), which was not proportional to the prolongation of the last instar, as stated in the Results. Digestion efficiency is expected to decline with the growth, since an animal increases its weight and volume more than the surface area of the digestive tract (Gordon, 1959). Probably for this reason, the insects were less efficient in transforming food into silk matter during the anomalous prolongation of the fifth instar; moreover, it should be considered that the physiological disorder caused by the chemical may be responsible for the diminished efficiency in the silk production. This different trend of the weight of cocoon, cocoon shell and pupae on the one hand and of the silk percentage on the other have been already outlined by Ogiso *et al.* (1993) and by Leonardi *et al.* (1996). A similar trend was described in silkworm larvae topically treated with concentrations of the J.H.A. methoprene over 10 p.p.m. (Anonymous).

With regard to the spinning behaviour it should be outlined that in the silkworm strain under consideration in this experiment, the control larvae of the different classes of weight and of the same sex spun the cocoons at the same time. These data are in agreement with the findings of Robertson (1982) on *C. occidentalis*. On the other hand, there was no apparent relationship between sex and instar duration in the above-mentioned data, while in *B. mori* a delay in the spinning time of the control female in comparison to the control male larvae was observed. Nevertheless, Morohoshi (1970) mentioned that in his experiments male larvae usually spun silk earlier than the female. The delay in

the spinning time, which was recorded in the fenoxycarb-treated group, was more remarkable with the higher treatment (2.5 ng) than with the lower treatment in all the lots: this result was foreseen by the authors on the basis of the previous research carried out (Kamimura, 1995).

The mortality rate of the different lots depended mostly on the fenoxycarb dosage but also on the sex and on the weight class. In this experiment the sex showed no significant links with the mortality rate for dosages of 2.5 μg , while the female were more sensitive than the male larvae for dosages of 2.5 ng. Moreover, fenoxycarb was more effective on the high class than on the low class of weight both in 2.5 μg and 2.5 ng male treated insects, while the class of weight had no significant relationships with the mortality rate in female treated lots. However, it should be highlighted that for the 2.5 μg fenoxycarb-treated female larvae the hypothesis of a dependence of the mortality rate on the body weight could not be rejected at a probability level of 90%, which is rather high, even if it is not generally considered as statistically significant. These data are quite in agreement with those concerning *C. occidentalis* (Robertson, 1982). In fact, in the study about this Lepidopteran a trend of increasing susceptibility with increasing weight for the male insects was proved, which was pronounced both at LD₅₀ and at LD₉₀. As reported in Robertson's article these findings contrast with the trend observed with conventional insecticides. In fact, with these chemicals susceptibility generally decreases as body weight increases. However, it has to be noted that, especially for the M.L.W. and F.L.W. lots, the weight of the treated larvae at the time of their spinning was not very different from the weight of the H.W. control animals of the respective sex. In other words, they did not exceed the weight we can define as 'critical' for metamorphosis and genetically determined for the strain. That is to say the lower weight they showed at the beginning of the fifth instar allowed them to prolong their feeding period without overcoming the limit imposed by their genetic constitution and to succeed in metamorphosis.

It is well-known that in Lepidopteran larvae the onset of the metamorphosis is associated with a certain body size, which is genetically determined but affected by the nutrition of the larvae and by other factors (Senhal, 1985). It should be outlined that several mutants of *B. mori* show three of five moults instead of four, i.e. these regulate their metamorphosis on the basis of the 'critical size' and not according to the number of the larval instars. Moreover, there are some strains of *B. mori* which carry out their metamorphosis in accordance with their feeding (therefore with the body weight gained) and which can shift their metamorphosis from the end of the fifth to the end of the fourth instar. The independence of brain reprogramming from the number of larval moults was recognised by all the researchers studying the timing of metamorphosis in Lepidoptera (Williams, 1976).

This physiological mechanism might explain why at high dosages of fenoxycarb the difference in the mortality rate between H.W. and L.W. classes in both the sexes is less evident. In fact, at the 2.5 ng dosage, the body weight at the time of spinning is too high in comparison with the critical size to allow the larvae carry out their metamorphosis successfully. On the other hand, it seems to be difficult to explain why female are more sensitive than male larvae at high dosages. The behaviour, which was observed for the silkworm, is not common to *C. occidentalis*. In fact, Robertson (1982) proved that the female larvae of this Lepidopteran are less sensitive than male ones to fenoxycarb, apart from the class of 50 mg of body weight (male LD₉₀ = $1.4 \mu\text{g} \times 10^{-3}$; female LD₉₀ = $1.0 \mu \times 10^{-3}$). However, in the current experiment, the comparison between the classes of weight in both the sexes was not so direct as in Robertson's study; in fact, in *B. mori* it is not easy to establish classes with male and female larvae of identical weight due to the fact that female are generally heavier than male insects.

Finally, on the basis of our study, both sex and body weight seem to be variables involved in the response of the silkworm to fenoxycarb. Nevertheless, further investigation is required to clarify the reasons of this behaviour.

REFERENCES

- ANONYMOUS () Cocoon and silk enhancing agent Manta^R for silkworm culture: Handbook of the use of Manta^R, Zoecon corporation, Palo Alto, California, USA, 24 pp.
- ASSAL O.M., BENEDETTI R., CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S. (1994) The nutritional behaviour of three different strains of mulberry silkworm (*Bombyx mori*) in relation to Insegar (fenoxycarb). *Sericologia*, 34(2), 233-243.
- CAPPELLOZZA L., MIOTTO F., MORETTO E. (1990) Effetti del fenoxycarb a basse concentrazioni sulle larve di *Bombyx mori* (Lepidoptera Bombycidae). *Redia*, LXXIII (2), 517-529.
- CAPPELLOZZA L. AND CAPPELLOZZA S. (1994) Relation between the spinning of the cocoon and oral and topical treatment with various dosages of fenoxycarb in a *Bombyx mori* strain. *Redia*, LXXVII (2), 369-374.
- CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S., SBRENNI G. (1995) Changes in the developmental programme of *Bombyx mori* caused by oral treatment with fenoxycarb during the last larval instar. *Sericologia* 35(3), 427-436.
- DEDOS S.G. & FUGO H. (1996) Effects of fenoxycarb on the secretory activity of the prothoracic glands in the fifth instar of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. and Comp. Endocrin.* (104), 213-224.
- KAMIMURA M. (1995) Effects of a juvenile hormone analogue, fenoxycarb, on larval growth of the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *App. Entomol. Zool.*, 30(3), 487-489.
- GORDON H.T. (1959) Minimal nutritional requirements of the German roach, *Blattella germanica* L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 77, 280-351.
- LEONARDI M.G., GIORDANA B., PARENTI P., IANNE P., CAPPELLOZZA S., SBRENNI G. (1994) Effetti del fenoxycarb sull'intestino medio delle larve di *Bombyx mori* L.: studi morfologici e fisiologici. *Atti XVII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Udine, 13-18 Giugno, 677-680.
- LEONARDI M.G., CAPPELLOZZA S., IANNE P., CAPPELLOZZA L., PARENTI P., GIORDANA B. (1996) Effects of the topical application of an Insect Growth Regulator (fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B (2), 361-365.
- LEONARDI M.G., CAPPELLOZZA S., IANNE P., PARENTI P., CAPPELLOZZA L., GIORDANA B. (1996) The Insect Growth Regulator Fenoxycarb affects larval growth rate, larval development and K⁺ dependent midgut aminoacid absorption in the silkworm *Bombyx mori*. *XX International Congress of Entomology*, Firenze, Italy, 25-31 August, 447.
- MOROHOSHI S. (1970) The control of growth and development in *Bombyx mori*. VI. Relative development of male and female moths. *Proc. Japan. Acad.*, 46, 71-76.
- OGISO M., OHKAWA K., ASAYAMA T. (1993) Influence of fenoxycarb on the development of *Bombyx mori*. *Proceedings of the 63rd Annual meeting of the Japanese Sericultural Society*, p. 13. April 6-7th Utsunomiya, Ibaraki Prefec., Japan.
- ROBERTSON J.L. (1982) Effect of body weight on lethal effectiveness of a juvenile hormone analogue applied to male and female western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Ent.*, 114, 1063-1068.
- SAKAGUCHI B. (1978) Postembryonic development of the silkworm. *In: The Silkworm: an important laboratory tool*. ed. Tazima Y., Kodansha Scientific Books, Tokyo, 31-51.
- SENHAL F. (1985) Growth and life cycles. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Postembryonic Development)*, ed. Kerkut G. A. & Gilbert L. I., Pergamon Press, 2, 2-86.
- TREMBLAY E. (1982) *Entomologia applicata*. I. Liguori, Napoli, 184.
- WILLIAMS C.M. (1976) Juvenile hormone ... in retrospect and in prospect. *In: The Juvenile hormones*. ed. Gilbert L.I., Plenum Press, New York-London: 1-14.

EFFETS DU POIDS DU CORPS SUR L'EFFICACITE DU REGULATEUR DE CROISSANCE D'INSECTE (R.C.I), LE FENOXYCARBE APPLIQUE CHEZ LE VER A SOIE MALE ET FEMELLE (*BOMBYX MORI*) (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

L. CAPPELLOZZA¹, P. IANNE² & S. CAPPELLOZZA¹

1. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova, via dei Colli 28, 35143 Padova, Italie.
2. Silkworm Laboratory, Ratti technologies, via Madonna 30, 22070 Guanzate (Como), Italie.

*Des expériences ont été menées pour déterminer le rôle du sexe et du poids par rapport à la réponse du ver à soie *Bombyx mori* au dernier âge, au fénoxycarbe analogue d'Hormone Juvenile (JHA) appliqué de manière topique. Nous avons étudié l'effet du produit chimique sur le poids larvaire, sur le poids des cocons, des coques soyeuses, des chrysalides, sur la richesse soyeuse, sur le temps de filage, sur la durée du filage et sur le taux de mortalité. Tous ces paramètres sont affectés de manière différente en fonction du sexe et du poids, qui semblent donc être des variables importantes dans la détermination de la sensibilité du ver à soie au JHA.*

INTRODUCTION

Le RCI fénoxycarbe (éthyl[2-(phénoxy-phénoxy)éthyl]carbamate) a de nombreux effets sur le ver à soie *Bombyx mori*. L'impact formidable du principe actif (a.i) sur la métamorphose du ver à soie est plus connu comme « le syndrome de non filage » et a été étudié depuis 1989-90 en France, en Italie et au Japon où le phénomène y a été observé en premier dans les élevages de vers à soie pour la production de cocons.

Mis à part la très haute sensibilité de *B. mori* à des doses infinitésimales du produit chimique (Cappellozza et coll., 1990 ; Kamimura, 1995 ; Léonardi et coll., 1996) diverses expériences ont démontré que la période à laquelle l'exposition au fénoxycarbe commence est critique par rapport à l'activité observée, le dernier âge larvaire (Kamimura, 1995) et la dernière partie du cinquième stade larvaire étant les plus touchés par l'a.i (Cappellozza et coll., 1995). Récemment, Dedos et Fugo (1996) ont signalé que le fénoxycarbe inhibe fortement l'activité sécrétrice des glandes prothoraciques (GP) au début du cinquième âge, tout comme au déclenchement de la nymphose. Toutefois, le produit chimique n'est pas capable d'induire l'arrêt du développement après le déclenchement de la nymphose et, au contraire, il a un effet positif sur l'activité sécrétrice des glandes prothoraciques (GP) après la période de vagabondage.

L'efficacité du fénoxycarbe dépend aussi de la souche de *B. mori* (Assal et coll., 1994) et de la méthode d'application (Cappellozza & Cappellozza, 1994).

Cet article a pour but de déterminer le rôle du poids des larves de vers à soie mâles et femelles par rapport à leur réponse à l'application topique de fénoxycarbe au début du cinquième âge ; en fait la sensibilité de *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera : Tortricidae) au fénoxycarbe suggère que le poids et le sexe peuvent être tous les deux considérés comme des variables pertinentes dans la quantification des effets des JHA sur les lépidoptères (Robertson, 1982).

MATERIELS ET METHODES

Animaux :

Il n'est pas facile de distinguer le sexe des larves chez le ver à soie avant le début du cinquième âge, quand les boutons imaginaux d'Herold et Ishiwata deviennent visibles sur le côté ventral des segments abdominaux postérieurs. Tazima a mis au point une méthode de sexage pratique consistant à modifier un des chromosomes sexuels avec des marqueurs génétiques (Sakaguchi, 1978). Un gène dominant, qui distingue le marquage de la larve, est transloqué sur le chromosome W : le sexage est possible en vérifiant ce trait marqueur. Dans une souche (RG 36) appartenant à la collection de la *Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova*, la translocation sur le chromosome W est appliquée à un gène marqueur exprimé au début du stade larvaire, qui provoque la coloration en noir du tégument des larves femelles. Cette souche a été utilisée pour l'étude, de manière à séparer aisément les larves mâles des larves femelles au début du cinquième âge.

Elevage :

Une grande quantité de larves est élevée en masse sur milieu artificiel jusqu'à la quatrième mue au *Ratti Silkworm Laboratory*. L'aliment artificiel « Katakura » pour souches pures est importé du Japon, les larves sont élevées dans des conditions normales de température, d'humidité et de lumière. Puis les larves sont transférées à la *Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova* où l'expérience est menée pendant le cinquième âge. Là, les larves sont divisées en groupes en fonction de leur poids et de leur sexe de manière à créer deux classes différentes de poids pour chaque sexe, chaque classe étant séparée de la suivante d'au moins 50 mg (voir tableaux I-II, heure 0).

Les larves femelles étant en moyenne plus lourdes que les mâles, les groupes suivants sont créés :

- 1) Poids Mâle Elevé (M.H.W) : poids supérieur à 0,650 g au début du cinquième âge.
- 2) Poids Mâle Léger (M. L. W.) : poids inférieur à 0,600 g au début cinquième âge.
- 3) Poids Femelle Elevé (F. H.W) : poids supérieur à 0,750 g au début cinquième âge.
- 4) Poids Femelle Léger (F.L.W) : poids inférieur à 0,700 g au début cinquième âge.

Les larves sont élevées individuellement sur aliment artificiel au cinquième âge dans des boîtes en plastique transparent, sous une photopériode de 12:12 heures, à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et 60 % d'humidité relative (R.H.).

Traitements :

Les quatre groupes mentionnés ci-dessus sont divisés en trois parts égales de 40 larves chacun et les lots différents (A, B, C) de chaque groupe sont traités comme suit :

- A) 2,5 µg de fenoxycarbe (de grade commercial)
dilué dans 1 µl d'éthanol (traitement topique après la quatrième mue)
- B) 2,5 ng de fenoxycarbe dilué dans 1 µl d'éthanol (traitement topique après la quatrième mue)
- C) 1 µl d'éthanol (traitement topique après la quatrième mue)

Les traitements sont appliqués sur la partie thoracique dorsale de chaque insecte.

Dans des expériences précédentes, il a été prouvé qu'il n'y a pas de différence entre le témoin et les insectes traités à l'éthanol (1 µl) pour les paramètres testés dans cette étude (poids du corps, poids des cocons, coques et chrysalides, jour de filage, durée de filage, taux de mortalité).

Analyse statistique :

Les pesées quotidiennes des larves sont enregistrées tout comme les poids des cocons, des enveloppes de cocon et des chrysalides. De plus, le jour de filage de chaque groupe, la durée de filage et les taux de mortalité des larves, des chrysalides et des adultes sont notés. La mortalité corrigée de chaque lot est calculée selon la formule Schneider-Orelli (Tremblay, 1982)*

$$* \text{Mortalité corrigée} = \frac{\text{Mortalité de l'échantillon} - \text{Mortalité du groupe témoin}}{100 - \text{Mortalité du groupe témoin}} \times 100$$

On utilise l'ANOVA avec le test Duncan pour déterminer la signification statistique des effets du fénoxycarbe sur le poids du corps des larves au cinquième âge, sur le poids des cocons, sur le poids des coques soyeuses et des chrysalides.

Le test χ^2 est effectué sur les taux de mortalité. Pour évaluer les effets des doses de fénoxycarbe sur les taux de mortalité, par rapport au sexe et aux classes de poids, les variables sont analysées en groupant les données en tables de contingence 2×2 et en effectuant des comparaisons. La correction de Yate est utilisée pour calculer la valeur χ^2 pour un degré de liberté.

RESULTATS

Effets du fénoxycarbe sur le poids des larves au cinquième âge :

Les tableaux I-II montrent la croissance des larves mâles et femelles de deux classes de poids. Les poids larvaires et leurs écarts types sont enregistrés quotidiennement ; de plus les résultats des tests Duncan sont présentés. Les valeurs de chaque groupe et l'heure qui n'ont pas de lettres minuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,05$. Les valeurs qui n'ont pas de lettres majuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,01$.

Le poids pris par les insectes témoins des deux sexes pendant le cinquième âge et enregistré juste avant la période de filage dépend du poids du corps au début du cinquième âge. La même tendance est observée pour les insectes traités, qui présentent un profil de croissance identique à celui des larves témoins, mais avec un pic maximum retardé. Cependant, ce pic est aussi enregistré environ 24 heures avant la période de filage pour les animaux traités.

Comme on peut l'observer dans les tableaux mentionnés ci-dessus, l'effet du traitement topique avec du fénoxycarbe sur le poids des larves devient significatif sur le plan statistique à partir de la 48ème heure du cinquième âge pour les larves de poids léger des deux sexes, et à partir de la 72ème heure pour les larves de poids élevé des deux sexes.

Le traitement au fénoxycarbe retarde la croissance chez les larves au début du cinquième âge, ce retard est contrebalancé par l'augmentation anormale du poids des larves à la fin de cet âge, qui est prolongé de plusieurs jours (Tableaux I-II). De plus, dans les lots de femelles et de mâles de poids léger, l'effet inhibiteur du fénoxycarbe sur le poids des larves demeure significatif jusqu'au jour de filage du groupe témoin (pour à la fois les traitements de 2,5 pg et de 2,5 ng), tandis que pour les lots mâle de poids élevé il dure seulement jusqu'à la 120-144ème heure et chez les lots de femelles de poids élevé il demeure pertinent jusqu'à la 144-168ème heure mais est moins remarquable que pour la classe de poids léger. A cause du prolongement de cet effet inhibiteur sur les larves M.L.W traitées avec 2,5 pg, le poids des larves n'augmente pas beaucoup plus que pour le lot M.H.W témoin (3,225 contre 3,135) et le poids des larves traitées avec 2,5 pg demeure encore plus léger que pour le lot témoin F.H.W. (4,302 contre 4,828) (Tableaux I-II).

Effets du fénoxycarbe sur le poids des cocons, des coques soyeuses, des chrysalides et sur la richesse soyeuse :

Les poids des cocons, des enveloppes et des chrysalides dépendent des poids des larves au début du cinquième âge (Tableau III). De plus, les cocons, les enveloppes et les chrysalides produits par les femelles sont en général plus lourds que ceux des larves mâles (en comparant la même classe de poids pour les deux sexes) mais la richesse soyeuse (poids de l'enveloppe de cocon/poids du cocon entier) est inférieure pour les groupes femelles (Tableau III).

Le poids des cocons augmente en fonction des doses de fénoxycarbe ainsi que le poids des enveloppes des cocons et des chrysalides, d'autre part, les effets de doses croissantes sur la richesse soyeuse ne sont pas pertinents. Par exemple, le tableau III montre que la dose de 2,5 ng génère une augmentation de richesse soyeuse, par rapport aux doses inférieures de 2,5 pg, seulement pour le groupe M.L.W., par contre, pour les M.H.W le traitement avec la dose plus élevée provoque une baisse de richesse soyeuse par rapport à la dose plus faible. De plus, il est facile d'observer que

l'augmentation du poids de l'enveloppe des cocons est proportionnelle aux jours de prolongement du cinquième âge.

Effets du fénoxycarbe sur la période de filage et sur la durée de filage :

Le traitement topique au fénoxycarbe provoque un retard de filage qui varie en fonction du groupe et de la dose : le filage se produit le même jour pour les larves non-traitées de classes de poids différentes et du même sexe. D'autre part, les groupes témoins femelles présentent un retard de filage d'un jour par comparaison aux témoins mâles. En d'autres mots, il n'y a pas de relation apparente entre le poids et la durée de l'âge larvaire, mais il y en a entre le sexe et la durée de l'âge larvaire.

Dans cette expérience, nous n'avons pas pris en considération un retard de filage de moins de 24 heures.

Il faut souligner que le comportement de filage des groupes traités suit le même modèle que celui des groupes témoins : on n'enregistre pas de différence quant aux jours de filage de différentes classes de poids du même sexe, traitées avec la même quantité de produit chimique, cependant les lots femelles ont un filage retardé par rapport aux mâles, qui augmente plus les doses sont élevées (voir Tableaux I-II). Néanmoins, même si le retard de filage des animaux traités varie en fonction du sexe, il est de la même durée par comparaison à leurs témoins respectifs chez les insectes mâles et femelles traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe, tandis qu'il est plus long de 24 heures chez les lots femelles traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe que pour les mâles correspondants (Tableau I-II). Donc, la différence entre les sexes n'est pertinente que pour des doses élevées. De plus, la durée du processus de filage est généralement plus longue pour les larves femelle traitées au fénoxycarbe que pour les mâles et dépend strictement de la dose. En fait, il dure 24 heures pour le groupe M.L.W., 72 heures pour les groupes M.H.W. et F.L.W et 120 heures pour le groupe F.H.W.

Effets du fénoxycarbe sur le taux de mortalité des différents lots :

L'évaluation des taux de mortalité corrigés est présentée dans le tableau IV.

De plus, on a établi les comparaisons suivantes :

- 1) Témoins contre groupes traités : ** Très significatif ($P = 0,01$)
- 2) Lots mâles traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe contre lots mâles traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe : * Significatif ($P = 0,05$).
- 3) Lots femelles traitées avec 2,5 pg de fénoxycarbe contre lots femelles traitées avec 2,5 ng de fénoxycarbe : ** Très significatif ($P = 0,01$).
- 4) Lots M.H.W. traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe contre lots M.L.W traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe : ** Très significatif ($P = 0,01$)
- 5) Lots M.H.W traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe contre lots M.L.W traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe : ** Très significatif ($P = 0,01$)
- 6) Lots F.H.W. traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe contre lots F.L.W. traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe : n.s ($P = 0,10$).
- 7) Lots F.H.W. traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe contre F.L.W traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe : n.s ($P = 0,05$).
- 8) Lots mâles traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe contre lots femelle traités avec 2,5 pg de fénoxycarbe : n.s ($P = 0,05$).
- 9) Lots mâles traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe contre lots femelle traités avec 2,5 ng de fénoxycarbe : * Significatif ($P = 0,05$).

DISCUSSION

Les analogues d'hormones juvéniles (JHA) affectent l'ingestion volontaire d'aliments et le poids larvaire des larves de ver à soie au cinquième âge (Assal et coll., 1994 ; Anonyme). Les études qui ont été menées pour évaluer l'effet du fénoxycarbe sur l'intestin larvaire, confirment une relation qui dépend de la dose entre le produit chimique et les changements de l'ultrastructure de l'épithélium

dans l'intestin moyen (Léonardi et coll., 1994). De plus, des doses faibles (10 fg de fénoxycarbe) appliquées localement sur des larves de ver à soie au cinquième âge, ont un effet stimulant sur l'absorption de leucine à la fois dans le mésentéron et l'intestin antérieur des insectes, tandis que des doses plus élevées (10 ng) ont un effet inhibiteur sur l'absorption d'acides aminés (Léonardi et coll., 1994). On n'a pas encore clarifié comment ces événements physiologiques agissent sur la croissance larvaire et pourquoi après une action inhibitrice sur le poids au premier âge, l'administration de fénoxycarbe provoque une augmentation anormale de poids (Tableaux I-II). Ce phénomène est probablement dû à la prolongation du cinquième âge lui-même plutôt qu'à un effet stimulant du produit chimique (Tableaux I-II) ; en fait, un effet similaire est observé avec le méthoprène (Anonyme).

L'action inhibitrice du fénoxycarbe affecte aussi la production de soie (richesse soyeuse), qui n'est pas proportionnelle à la prolongation du cinquième âge, ainsi qu'il est indiqué dans « Résultats ». On peut s'attendre à ce que l'efficacité de la digestion baisse avec la croissance, étant donné qu'un animal augmente plus en poids et en volume que la surface de son appareil digestif (Gordon, 1959). Les insectes sont, probablement pour cette raison, moins efficaces pour transformer leur nourriture en matière soyeuse pendant le prolongement anormal du cinquième âge ; de plus, on doit considérer que le désordre physiologique provoqué par le produit chimique est peut-être responsable de l'efficacité diminuée de la production de soie. Cette tendance différente entre le poids du cocon, l'enveloppe du cocon et les chrysalides d'une part et la richesse soyeuse de l'autre a déjà été soulignée par Ogiso et coll. (1993) et par Leonardi et coll. (1996). Une tendance similaire a été décrite pour les larves de ver à soie traitées localement avec des concentrations de méthoprène au-dessus de 10 p.p.m. (Anonyme).

Pour ce qui est du déroulement du filage, il faut souligner que pour la souche de ver à soie prise en considération dans cette expérience, les larves témoins des différentes classes de poids et du même sexe filent leurs cocons au même moment. Ces données sont en accord avec les observations de Robertson (1982) sur *C. occidentalis*. D'autre part, il n'y a pas de relation apparente entre le sexe et la durée de l'âge larvaire pour les données mentionnées plus haut, tandis que l'on observe chez *B. mori* un retard de filage chez le témoin femelle par rapport aux larves témoins mâles. Cependant, Morohoshi (1970) a mentionné que dans ses expériences les larves mâles filent de la soie en général plus tôt que les femelles. Le retard par rapport à la période de filage, enregistré pour le groupe traité au fénoxycarbe est plus important avec le traitement plus élevé (2,5 ng) qu'avec le traitement plus faible chez tous les lots ; ce résultat était prévu par les auteurs en fonction des recherches précédemment menées (Kamimura, 1995).

Le taux de mortalité des différents lots dépend en grande partie de la dose de fénoxycarbe mais aussi du sexe et de la classe de poids. Dans cette expérience, le sexe ne présente pas de liens significatifs avec le taux de mortalité pour les doses de 2,5 pg, tandis que les femelles sont plus sensibles que les larves mâles aux doses de 2,5 ng. De plus, le fénoxycarbe est plus efficace sur la classe de poids élevés que sur la classe de poids légers à la fois pour les insectes mâles traités avec 2,5 pg et 2,5 ng, tandis que la classe de poids n'a pas de relation significative avec le taux de mortalité des lots femelles traités. Cependant, on doit souligner que pour les larves femelles traitées au fénoxycarbe avec 2,5 pg l'hypothèse d'une dépendance entre le taux de mortalité et le poids ne peut être rejetée à un niveau de probabilité de 90 %, ce qui est assez élevé, même si cela n'est pas généralement considéré comme significatif au plan statistique. Ces données sont en accord avec celles concernant *C. occidentalis* (Robertson, 1982). En fait, dans l'étude à propos de ce lépidoptère une augmentation de sensibilité en fonction du poids a été prouvée pour les insectes mâles, sensibilité prononcée à la fois à la DL₅₀ et à la DL₉₀. Comme il a été rapporté dans l'article de Robertson, ces observations contrastent avec la tendance observée pour les insecticides conventionnels. Pour ces produits chimiques, la sensibilité décroît généralement avec l'augmentation du poids. Cependant, on doit noter que, surtout pour les lots M.L.W et les lots F.L.W, le poids des larves traitées au moment de la période de filage n'est pas très différent du poids des animaux témoins de poids élevés, pour les deux sexes. En d'autres mots, ils ne dépassent pas le poids que nous pouvons définir comme

« critique » pour la métamorphose et déterminé de manière génétique pour la souche. Cela veut dire que le poids inférieur qu'ils présentent au début du cinquième âge leur permet de prolonger leur période d'alimentation sans dépasser la limite imposée par leur constitution génétique et de réussir leur métamorphose.

Il est bien connu que chez les larves de lépidoptères, le déclenchement de la métamorphose est associé à une certaine taille, qui est déterminée de manière génétique mais aussi affectée par la nutrition des larves et par d'autres facteurs (Senhal, 1985). On doit souligner que plusieurs mutants de *B. mori* ont trois ou cinq mues au lieu de quatre, c'est à dire qu'ils régulent leur métamorphose sur la base de la « taille critique » et non en fonction du nombre d'âges larvaires. De plus, il y a certaines souches de *B. mori* qui effectuent leur métamorphose en fonction de leur nourriture (donc en fonction du poids pris) et qui peuvent déplacer leur métamorphose de la fin du cinquième âge larvaire à la fin du quatrième âge larvaire. L'indépendance de la reprogrammation du cerveau par rapport au nombre de mues larvaires a été reconnue par tous les chercheurs étudiant le rythme du filage des lépidoptères (Williams, 1976).

Le mécanisme physiologique peut expliquer pourquoi à des fortes doses de fénoxycarbe, la différence de taux de mortalité entre les classes H.W. et L.W. des deux sexes est moins évidente. En fait, à la dose 2,5 ng, le poids du corps à la période de filage est trop élevé par rapport à la taille critique pour permettre aux larves d'effectuer leur métamorphose avec succès. D'autre part, il semble difficile d'expliquer pourquoi les femelles sont plus sensibles que les larves mâles à de fortes doses. Le comportement, qui a été observé pour le ver à soie, n'est pas commun à *C. occidentalis* ; en fait, Robertson (1982) a prouvé que les larves femelles de ce Lépidoptère sont moins sensibles que les mâles au fénoxycarbe, mis à part la classe de poids de 50 mg (DL_{90} mâle = $1,4 \mu\text{g} \times 10^{-3}$; DL_{90} femelle = $1,0 \mu\text{g} \times 10^{-3}$). Cependant, pour l'expérience actuelle, la comparaison entre les classes de poids des deux sexes n'est pas aussi directe que dans l'étude de Robertson ; en fait, chez *B. mori*, il n'est pas facile d'établir des classes comportant des larves mâles et femelles de poids identiques parce que les femelles sont en général plus lourdes que les insectes mâles.

Finalement, en se basant sur notre étude, le sexe et le poids semblent être tous deux des variables jouant un rôle par rapport à la réponse du ver à soie au fénoxycarbe. Néanmoins, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les raisons de ce comportement.

THE CYTOLOGICAL EVIDENCE OF CHROMOSOME DELETION IN SILKWORM

MENG Z. Q.^{1*}, Y. BANNO², H. DOIRA², LU J.¹, WENG H.B.¹

1. Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 310021, P.R. China.

2. Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-Ku, Fukuoka 812 Japan.

The paper reveals for the first time the morphological features of interstitial deletional chromosome at the zygotene stage and pachytene stage in the meiotic division. There was a standard deletion loop structure at the zygotene stage, and a globular karyon was showed in the point of secondary constriction of another chromosome connecting with it. The chromosome density and coarse at the pachytene stage, the deletion loop structure got clearer and was observed easily. Its length was about 4.3~6.1% of that of chromosome. The paper provides a cytological proof of No. 21 linkage group in silkworm.

Keywords: Silkworm, chromosome, linkage group.

INTRODUCTION

Chromosome deletion was a usual kind of chromosome aberration. As early as in 1936, Japanese researcher found the chromosome deletion in silkworm with the phenotype of pseudodominance (Xian Z.H. 1991). Jiang Tongqin (1963) found that most of the silkworm mottle mutant induced by X-ray and γ -ray were caused with chromosome deletion (Jiang T.Q. 1963). Homozygous deletion carriers died, heterozygous deletion carriers were retarded growth, decreased viability and the change of exchange ratio. Several chromosome deletion material were obtained (H. Doira 1977, H. Chikushi 1971). But the total number of chromosomes in silkworm is large ($2n=56$), and they have no obvious characters in metaphase. Therefore, up to now all the reports about chromosome deletion in silkworm were deduced from the results of genetic analysis. However, in the cell biological study of the silkworm chromosomes, we found the structure of chromosome interstitial deletion.

MATERIALS AND METHODS

Animal:

Deletion strain (Lanky of Tsujita) was obtained in 1957 with γ -ray irradiation, with prolonged thin larva body, decreased viability, retarded growth 2~3 days. It was proved with genetic analysis in 1979 that the *Lan* was caused by the chromosome deletion, and the locus of *Lan* is at 17.9 position in 21th linkage group (H. Doira 1977).

In order to investigate the chromosomes action at zygotene stage and pachytene stage, the testes at 1~2 days in 5th instar were selected as organ for chromosome sample.

Put the testes of the larva on microscopicslide, reject exter-membrance and fat of the testes under dissecting microscope, after that, purge with phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 4.75\text{g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 4.54\text{g}$,

* Present address: Shiqiao road 198, Sericultural Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hongzhou 310021, P.R China.

distilled water 1000ml), piece the testes with scalpel after having added 2~3 drops of fix buffer I (methyl alcohol 3:glacial acetic acid 3: distilled water 4). Place the microscopicslide on a platform, add 2~3 drops of fix buffer II (methyl alcohol 3:glacial acetic acid 3), keep for 10~20 seconds to disperse the cell, then, add fix buffer III (glacial acetic acid) 4~5 drops, air dry overnight, stain with 20:1 Giemsa, purge with distilled water, investigate under Nikon microscope after air drying.

RESULTS AND DISCUSSION

The deletion loop appeared at the process of meiotic division is a typical structure of chromosome interstitial deletion. While the homogeneous parts of the chromosome were completely paired in synapsis, the remaining part of the normal chromosome forms a loop (briefly named deletion loop), because of interstitial chromosome deletion on the pair chromosome. We find the deletion loop on the chromosome of silkworm *Lau* strain (figure 1 to 2).

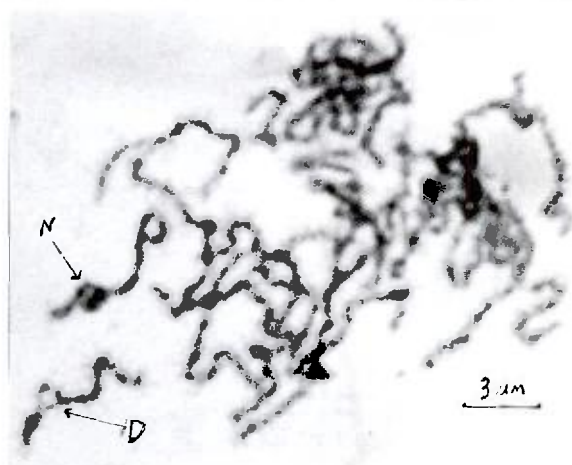


Fig 1: The interstitial deletion morphology at the zygotene stage in meiotic division in silkworm (D: deletional structure, N: nucleolus)

Fig 1: Morphologie de la délétion interstitielle au stade zygotène pendant la division méiotique du ver à soie (D: structure délétionnelle, N: noyau).



Fig 2: The interstitial deletion morphology at the pachytene stage in meiotic division in silkworm (D: deletional structure).

Fig 2: Morphologie de la délétion interstitielle au stade pachytène pendant la division méiotique du ver à soie (D: structure délétionnelle).

In figure 1, there is a typical deletion loop at the zygotene stage, and on the other chromosome, the ball like nucleolus was closely connected with it at the position of secondary constriction. It was reported that some kind of secondary constriction of chromosome have special function to form nucleolus, and connected with nucleolus in division. In general, only one pair of secondary constriction is responsible for the forming of nucleolus, for example, the 6th chromosome in corn but in silkworm it is unknown.



Fig 3. No. 21 chromosome linkage map in silkworm. The solid box denoted the Non-deletional region, and the blank box denoted the deletional region.

Fig 3: Carte de liaison du chromosome no. 21. La partie solide correspond à la zone non-délétionnelle et la partie blanche à la zone délétionnelle.

Fig 2 is the chromosome structure at the pachytene stage. At this stage, the chromosomes were densed, so the deletion loop becomes cleaner. The deletion length of the chromosome is about 4.3~6.1% of the length of intact chromosome. It is reported that the deletion length of chromosome can be 1% in *E. Coil.* and 20% in phage (Li X., 1990) but in eucaryote few organisms have such deletion length like in silkworm.

The linkage group is the hot field in cytological genetic study in silkworm. Up to now, more than 400 genes have been studied, and 27 linkage groups have been determined. Doira determined the 21th linkage group in which the *rb* (0.0)-*Lan*(17.9)-*Slv*(19.4) is the marker gene with the method of three point test. *Lan* is a chromosome deletion ranging from *rb*(0.0) to *Lan*(17.9) locus (H.Doira 1977). So the *Lan* is a chromosome deletion deduced from the result of genetic analysis is proved with the cytological evidence obtained in this study. *Lan* is belong to terminal deletion according to the result of genetic analysis but in this study, the *Lan* is an interstitial deletion because they have unknown locus before the *rb*(0.0), so the *rb* is selected as the beginning gene for the 21th linkage group temporarily, the length of fragment before the *rb* gene is about 1/8 length of the whole chromosome according to the result in this study and the exchange ratio of *rb*, *Lan*, *Sl-v* (H. Doira, 1977). The 21th linkage map is shown as figure 3.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the national Natural Science Foundation of P.R. China (Grant No. 39670568) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of P.R. China (Grant No. 396252).

REFERENCES

- CHIKUSHI H., DOIRA H., (1971) Genetical studies of the deletion 'Retarded growth' in the third chromosome of *Bombyx mori* L., Genetics Japan, 301-307.
- DOIRA H., CHIKUSHI H., TSUJITA M., KIHARA H.(1977) Linkage studies of *Bombyx mori*: Discovery of a linkage group *rb-Lan-Sin-v*.J. Sericult. sci. Japan, 46, 521-527.
- TONGQI J. (1963) Artificial induced mutant with X-ray and γ -ray irradiation on silkworm eggs. Acta sericologica sinica, China., 1, 59-60.
- XUN L. (1990) Genetics of chromosome. Huo Nain Science and Technology Publishing House. China, 46-48, 226-292.
- ZONGHUAL X. (1991) Genetics and breeding in silkworm. Agricultural publishing house. China, 24-26, 43-52.

PREUVE CYTOLOGIQUE DE DELETION CHROMOSOMIQUE CHEZ LE VER A SOIE

MENG Z. Q.^{1*}, YUTAKA BANNO², HIROSHI DOIRA², LU J. J.¹, H.B. WENG H. B1

1. Institute of sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 310021, Chine.
2, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-Ku, Fukuoka 812, Japon.

Cet article révèle pour la première fois les caractéristiques morphologiques de la délétion chromosomique interstitielle aux stades zygotène et pachytène de la division méiotique. On observe une structure de délétion en boucle ordinaire au stade zygotène et un karyon globulaire au point de constriction secondaire d'un autre chromosome se liant avec lui. Au stade pachytène, la structure en boucle devient plus claire et s'observe aisément. Sa longueur est environ de 4,3 à 6,1 % celle du chromosome. Cet article apporte la preuve cytologique pour le groupe de liaison no. 21 chez le ver à soie.

INTRODUCTION

La délétion du chromosome est une forme habituelle d'aberration chromosomique. Dès 1936, un chercheur japonais a trouvé une délétion du chromosome chez le ver à soie avec le phénotype de pseudodominance (Xian Z. H., 1991). Jiang Tongquin (1986) a observé que la plupart des mutants tachetés du ver à soie induits par rayons X et rayons γ proviennent d'une délétion chromosomique (Jiang T. A., 1963). Les porteurs de délétion homozygotes meurent, la croissance des porteurs de délétion hétérozygotes est retardée, leur viabilité et le taux d'échange sont diminués. Plusieurs matériels correspondant à des délétions chromosomiques ont été obtenus (J. Doira 1977, H. Chikushi, 1971). Mais le nombre total de chromosomes chez le ver à soie est élevé ($2n = 56$) et ils n'ont pas de caractères distinctifs évidents à la métaphase. Ainsi, jusqu'à présent, tous les rapports sur la délétion des chromosomes chez le ver à soie sont déduits des résultats de l'analyse génétique. Cependant, au cours d'études biologiques cellulaires des chromosomes du ver à soie, nous avons trouvé la structure de délétion interstitielle du chromosome.

MATERIELS ET METHODES

Animal :

La souche délétée (Lanky of Tsujita) a été obtenue en 1957 par irradiation aux rayons γ ayant pour effet un corps mince prolongé de la larve, une viabilité diminuée et une croissance retardée de 2~3 jours. Il a été prouvé par l'analyse génétique en 1979 que *Lan* est causé par délétion chromosomique, et que le locus de *Lan* se trouve à la position 17,9 dans le 21ème groupe de liaison (H. Doira, 1977).

Nous avons sélectionné les testicules à 1~2 jours au cinquième âge comme organes pour obtenir les échantillons de chromosomes de manière à les étudier aux stades zygotène et pachytène.

Nous avons disposé les testicules des larves sur une lame de microscope, enlevé la membrane externe et la graisse des testicules sous un microscope de dissection ; après cela nous les avons trempés dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 4,75 g, KH_2PO_4 4,54 g, eau distillée 1000 ml), coupés avec un scalpel après avoir ajouté 2~3 gouttes de tampon de fixation I (alcool méthylique 3: acide acétique

glacial 3: eau distillée 4:). La lame de microscope est placée sur un plan de travail, nous ajoutons 2~3 gouttes de tampon fixateur II (alcool méthylique 3: acide acétique glacial 3:), et maintenons 10~20 secondes pour disperser les cellules, puis ajoutons 4~5 gouttes de tampon de fixation III (acide acétique glacial). Après séchage à l'air libre pendant la nuit, la préparation est colorée au Giemsa 20:1, rincée avec de l'eau distillée puis étudiée sous un microscope Nikon après séchage à l'air libre.

RESULTATS ET DISCUSSION

La boucle de délétion qui apparaît à la division méiotique est une structure typique de délétion interstitielle du chromosome. Alors que les parties homogènes du chromosome sont couplées dans la synapse, la partie restant du chromosome normal forme une boucle (nommée boucle de délétion) à cause de la délétion interstitielle sur la paire de chromosomes. Nous trouvons la boucle de délétion sur un chromosome du ver à soie de souche *Lan* (figure 1 à 2).

Dans la figure 1, il y a une boucle de délétion typique au stade zygotène et sur l'autre chromosome une bille semblable à un nucléole est étroitement liée à elle à la position de constriction secondaire. On a signalé qu'un certain type de constriction secondaire de chromosome a une fonction spéciale dans la formation du nucléole et est liée au nucléole en division. En général, seule une paire de constriction secondaires est responsable de la formation du nucléole, par exemple, le 6ème chromosome dans le maïs, mais chez le ver à soie il est inconnu.

La fig 2 représente la structure du chromosome au stade pachytène. A ce stade, les chromosomes sont denses, de sorte que la boucle de délétion devient plus claire. La longueur de délétion du chromosome représente 4,3~6,1 % de la longueur du chromosome intact. Il est signalé que la longueur de délétion du chromosome peut être de 1 % pour *E. coli* et de 20 % chez le phage (Li X., 1990) mais chez les eucaryotes peu d'organismes présentent une longueur de délétion telle que celle du ver à soie.

Le groupe de liaison est un sujet brûlant en ce qui concerne l'étude cytogénétique chez le ver à soie. Jusqu'à présent 400 gènes ont été étudiés et 27 groupes de liaison ont été déterminés. Doira a déterminé le 21ème groupe de liaison chez lequel *rb* (0.0)-*Lan* (17.9)-*Slv* (19.4) est le gène marqueur avec la méthode de test à trois points. *Lan* est une délétion de chromosome qui est comprise entre *rb* (0.0) et le locus *Lan* (17.9) (H. Doira, 1977). Ainsi *Lan*, délétion du chromosome déduite par des résultats de l'analyse génétique est prouvée de manière cytologique par les résultats de cette étude. *Lan* appartient à une délétion terminale d'après les résultats de l'analyse génétique mais dans cette étude, *Lan* est une délétion interstitielle parce qu'il n'y a pas de locus connu devant *rb* (0.0), de sorte que *rb* est considéré temporairement comme le gène terminal pour le 21ème groupe de liaison ; la longueur du fragment devant le gène *rb* est environ 1/8 ème de la longueur du chromosome entier selon les résultats de cette étude et le rapport d'échange de *rb Lan*, *Sl-r* (H. Doira, 1977). La carte du 21ème groupe de liaison est présentée dans la figure 3.

BIOCHEMICAL CHANGES IN THE HAEMOLYMPH OF HEALTHY AND UZIFLY INFESTED LARVAE OF *ANTHERAEA PROYLEI* JOLLY (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)

P.K. SINGH, P.N. SINGH & B. PRASAD

Department of Life Sciences Department, Manipur University, Imphal - 795003, Manipur, India.

*Quantitative estimation of the total amino acids (TAA), folin proteins (FP), total proteins (TP), total solids (TS) in the haemolymph of healthy and Uzifly, *Parasarcophaga knabi* (Parkar) infested fifth instar, oak tasar silkworm larvae *Antheraea proylei* Jolly indicated marked differences. TAA decreased from 11.26 ± 0.12 to 7.05 ± 0.75 g/100 ml; FP decreased from 5.75 ± 0.19 to 0.61 ± 0.43 g/100ml; TP decreased from 11.32 ± 0.12 to 1.21 ± 0.79 g/100 ml; and TS decreased from 11.14 ± 0.19 to 1.16 ± 0.17 g/100 ml. Absorption spectra of the haemolymph of healthy and Uzifly-infested silkworms showed 3 and 9 maxima, respectively. The consequences of these findings are discussed in relation to cocoon and non-cocoon formation.*

INTRODUCTION

Antheraea proylei Jolly, commonly known as the oak tasar silkworm, is an interspecific hybrid strain of *A. pernyi* G. and *A. roylei* Mr. feeding on the leaves of oak, *Quercus serrata* Thunb. This oak-tasar culture has now become the 'wealth of Manipur'. So far, the biochemical changes in the haemolymph of Uzifly infested oak silkworms remained unexplored (Singh *et al.* 1993, Singh and Prasad, 1986). Several workers i.e., Jolly *et al.* (1972), Plummer (1982), Agarwal and Jolly (1981), Gope and Prasad (1980), Phukon and Prasad (1986) have studied the amino acid content in the haemolymph of various larvae. However, no information is on record regarding the quantitative composition of protein, total amino acids, total solids, etc. from the haemolymph of *A. proylei* infested by *P. knabi* (Parkar).

Keeping this in view, it was thought desirable to undertake a quantitative estimation of proteins, amino acids, total solids, etc. in the haemolymph of healthy and infested larvae. A study of this kind might help in revealing some interesting facts in the field of host-parasite physiology and biochemistry.

MATERIALS AND METHODS

To avoid variations in the haemolymph due to feeding of oak, *Quercus serrata* Thunb. leaves, fifth instar larvae of *A. proylei* were starved for 35 ± 5 hr. before the start of the experiments.

Collection of haemolymph:

Six starved worms from each age group were selected randomly. Haemolymph of each age group was collected in a calibrated glass tube by cutting the last two prolegs and then stored in a refrigerator. Two ml of haemolymph was collected from the pooled sample for analysis. The healthy worms selected for study were : fifth instar early, H1 (2 days old), medium, H2 (8 days old) and mature,

H3 (15 days old). Similarly the Uzifly - infested worms of fifth instar worms (matured, i.e., 15 days old) were early, F11 (5 days after infestation, i.e., 15 days old inclusive of 5 days after infestation), late F12 (10 days after infestation, i.e., 15 days old inclusive of 10 days after infestation), F13 (during death, i.e. 12 days after infestation, i.e. 15 days old inclusive of 12 days after infestation), and F14 (6 hours after death), respectively. F14 worms were taken to see the change of metabolites after death.

Total amino acids (TAA):

The freshly pooled haemolymph (1 ml) of various age groups was transferred in a calibrated 10 ml glass tube. One drop of methyl-red indicator was added and the solution was neutralised with 0.5 ml of 0.1 NaOH solution. Ninhydrin reagent (1 ml) was added to this solution. This solution was heated for 20 minutes in a boiling water bath, 5 ml diluent solution (glass distilled water:n-propanol 1:1) was added to the mixture, while still on the water bath. Absorbency of the solution was measured at 570 nm with a spectronic - 20 colorimeter. Calculation of the total amino acid present in the solution was measured by preparing a standard curve of glycine following the method of Moore and Stein (1948). Mean values of triplicate observations were made for every age group.

Folin proteins (FP):

Fresh haemolymph was taken for the estimation of FP. Folin-Ciocalteu reagent was used following the method of Lowry *et al.* (1951). The absorbency was measured at 750 nm by a Beckman DU-spectrophotometer. The amount of protein in the sample was calculated with a standard curve which was prepared by using bovine-serum-albumin. Mean value of triplicate observations were made for every age group.

Total proteins (TP):

20 microlitres of fresh haemolymph was diluted in 3 ml of 0.1 M NaCl, buffered at pH 7.1 with 0.1 tris-amino-methane. Absorbencies were read at 260 nm 280 nm with a Beckman DU-6 spectrophotometer. The protein concentration in g per ml was calculated using the formula $1.550 D_{280} = 0.780 D_{260}$ as evolved by Ramakrishnan and Pawar (1975). Mean values of triplicate observations were made for every age group.

Qualitative variation in the absorbency spectra of the haemolymph (ASH):

20 microlitres of haemolymph were collected following the same haemolymph collection technique mentioned above and one drop of thiourea solution (0.5 m mol/l - solution in glass distilled water) was used as a preservative. The solution was diluted ten times with distilled water. The absorbency spectra of the solution were measured at a range of 0.000-0.800, within a wavelength of 400-700 nm, in a visible source of intensity and with a scanning speed of 150 nm per minute using a Beckman DU-6 spectrophotometer. Mean value triplicate observations were made for every age group.

Quantitative variation in the total solid (TS):

50 microlitres of haemolymph in ten replications for every age group were placed on already weighed and labelled glass slides. The slides were then heated at 95° C for 1 hour in oven for complete drying of the haemolymph added. The heated slides were placed for 4 days in a dessicator containing CaCl₂. The moisture free slides were reweighed and the difference in weight indicated the total solids present in the haemolymph.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Variation in total amino acids:

The highest concentration of the total amino acids (TAA) in 5th instar larval haemolymph of *A. proylei* has been detected in healthy mature (H3) larvae i.e. 11.38 g/100 ml; the lowest concentration

(7.05 g/100 ml) was found in Uzi-fly-infested worms after death (FI4) (Table-I). The amount of TAA loss due to fly-infestation has been worked out as 5.08 g/100 ml i.e. 44.6% out of 11.38 g/100 ml present in the H3 worm. This clearly shows that, about half of the amount of TAA present in the H3 worms has been utilised by the fly-maggot for its energy source. The difference of TAA content in various healthy and fly-infested worms is found to be statistically significant at all the stages of infestation. The concentration of the amino acid in the tasar silkworm was found to be very high. This is in conformity with the findings of Wyatt *et al.* (1956) in the mulberry silkworm *B. mori* in which the concentration of TAA is found 50-100 times higher than the concentration found in man. The TAA concentration in this silkworm has been found higher than in other insects. This view is at par with the views of Plummer (1982), that about 2.3 g/100ml of TAA is present in an average insect. From the above discussions it is worthwhile to conclude that tasar silkworms contain higher concentrations of TAA for the synthesis of silk than other insects.

Variation in total proteins:

The highest concentration of total protein (TP), i.e. 11.44 g/100 ml of haemolymph has been

Table I. Variations in concentrations of TAA, TP, FP and TS in the haemolymph of healthy (H) and Uzi fly-infested (FI) fifth instar larvae of the tasar silkworm, *Antheraea proylei* J.

*Tableau I. Variations des concentrations des TAA, TP, FP et TS dans l'hémolymph de larves du ver à soie tasar *Antheraea proylei* J. saines (H) et contaminées par la mouche Uzi (FI) au cinquième âge.*

SI No	Worms Healthy (H) and Fly-infested (FI)	Total Amino Acid (g/100 ml) Mean $\pm$ SE	Total protein (g/100 ml) Mean $\pm$ SE	Folin Protein (g/100 ml) Mean $\pm$ SE	Total Solid (g / 100 ml)
SI No.	Vers à soie Sains (H) et contaminés par la mouche (FI)	Amino acides totaux (g/100 ml) Moyenne $\pm$ SE	Protéines totales (g/100 ml) Moyenne $\pm$ SE	Protéines Folin (g/100 ml) Moyenne $\pm$ SE	Solides totaux (g/100ml) Moyenne $\pm$ SE
1.	H3 (H - mature) H3 (H - murs)	11.26 $\pm$ 0.12	11.32 $\pm$ 0.12	5.75 $\pm$ 0.19	11.14 $\pm$ 0.19
2.	H2 (H - medium) H (H - moyens)	10.75 $\pm$ 0.19	7.85 $\pm$ 0.21	3.85 $\pm$ 0.48	9.11 $\pm$ 0.45
3.	H1 (H - early) H1 (H - précoces)	10.12 $\pm$ 0.22	7.23 $\pm$ 0.34	3.55 $\pm$ 0.41	7.01 $\pm$ 0.23
4.	FI1 (FI - late) FI1 (FI - tardifs)	9.45 $\pm$ 0.31	5.42 $\pm$ 0.38	2.55 $\pm$ 0.43	5.10 $\pm$ 0.14
5.	FI2 (FI - late) FI2 (FI - tardifs)	8.98 $\pm$ 0.25	2.36 $\pm$ 0.43	1.25 $\pm$ 0.54	4.15 $\pm$ 0.49
6.	FI3 (FI - during death) FI3 (FI - morts)	8.35 $\pm$ 0.45	1.71 $\pm$ 0.73	0.94 $\pm$ 0.68	3.21 $\pm$ 0.46
7.	FI4 (FI - after death) FI4 (FI - après la mort)	7.05 $\pm$ 0.75	1.21 $\pm$ 0.79	0.61 $\pm$ 0.43	1.16 $\pm$ 0.17
Loss % (H - FI) / Perte % (H-FI)		44.6	96.3	96.9	92.8
CD at 5% (P.05) / CD à 5% (P.05)		1.05	1.96	1.08	2.87
CD at 1% (P.01) / CD à 1% (P.01)		0.76	1.42	0.78	2.07

Table II. Total protein absorption spectra peak values of the haemolymph of healthy (H) and Uzi fly-infested (FI) fifth instar larvae of the tasar silkworm, *Antheraea proylei* J.

*Tableau II. Valeurs pics des spectres d'absorption des protéines totales de l'hémolymph de larves du ver à soie tasar *Antheraea proylei* J. saines (H) et infestées par la mouche Uzi (FI) au cinquième âge.*

Sl No.	Worms Healthy (H) and Fly-infested (FI)	Wavelength (200-300 nm) and absorbency ABS (3.00-0.50)	Peak values			
			1	2	3	4
<i>Sl No.</i>	<i>Vers à soie sains (H) et infestés (FI)</i>	<i>Longueur d'ondes (200-300 nm) et absorption ABS (3.00-0.50)</i>	<i>Valeurs pic</i>			
			<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1.	H3 (H-mature) <i>H3 (H-adultes)</i>	ABS	276.8 0.994	253.2 0.670	233.0 3.080	232.6 0.075
2.	H2 (H-medium) <i>H2 (H-moyens)</i>	ABS	277.4 0.891 278.0	232.4 3.072 230.0		
3.	H1 (H-early) <i>H1 (H-précoces)</i>	ABS	0.742	3.035		
4.	FI1 (FI-early) <i>FI1 (FI-précoces)</i>	ABS	213.8 2.670			
5.	FI2 (FI-late) <i>FI2 (FI-tardifs)</i>	ABS	214.8 2.721	214.2 2.700		
6.	FI3 (FI-during death) <i>FI3 (FI-mort)</i>	ABS	210.0 2.446			
7.	FI4 (FI-after death) <i>FI4 (FI-après la mort)</i>	ABS	209.6 2.427			

found in healthy mature (H3) 5th instar larvae of *A. proylei*. The lowest concentration, i.e. 0.42 g/100 ml of haemolymph, was detected in infested larvae of the death (FI4) Table-I. Healthy worms loose 11.02 g/100 ml i.e 96.3% of their protein present in the haemolymph, within a period of 11 days after Uzifly-infestation. The observed differences are found to be significant at 1% in all the stages of healthy and infested worms. Therefore, the larvae fail to spin a proteinaceous silk cocoon, if the fly-infestation occurs in the early part of the 5th stage. This may be due to the fact, that the fly-maggots consume all the protein materials present in the haemolymph needed by the silkworm to produce silk. If the infestation occurs in the late part of the fifth instar the larvae still can spin a cocoon. But the quality of such a cocoon is much less. This is due to the excessive reduction in the proteinaceous materials from the silkworm's haemolymph, which ultimately affects the normal function of silk gland

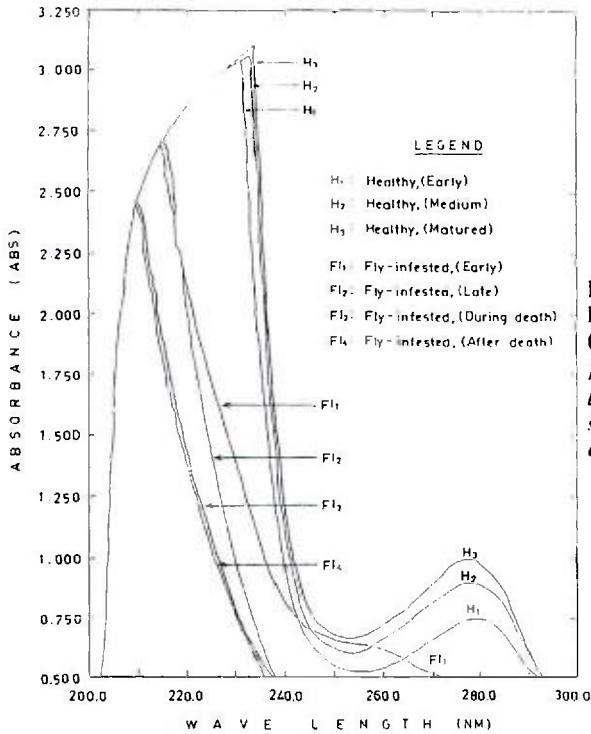


Fig 1: Total protein variation in the haemolymph of healthy (H) and fly-infested (FI) fifth instar oak tasar silkworms

Fig 1: Variation des protéines totales dans l'hémolymph de vers à soie du chêne tasar sains et infestés par la mouche *uzi* (FI) au cinquième âge.

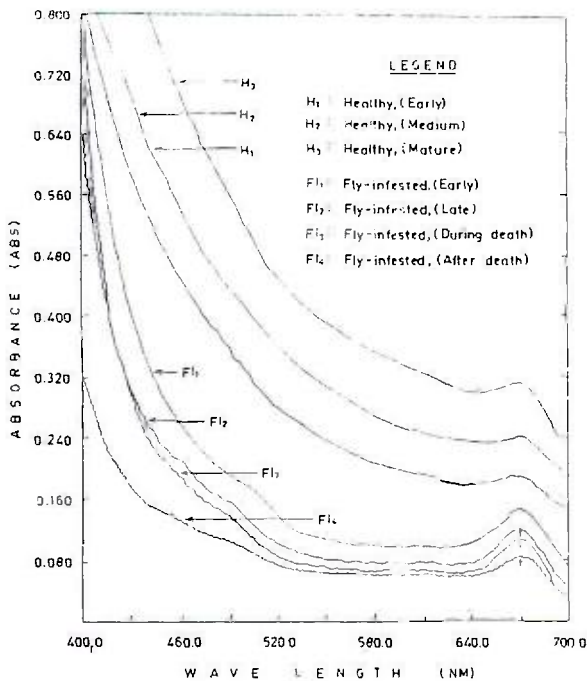


Fig 2: Absorption spectra of the haemolymph of healthy (H) and fly-infested (FI) fifth instar larva oak tasar silkworm *Antheraea proylei* J

Fig 2: Spectres d'absorption de l'hémolymph de larves du ver à soie tasar du chêne *Antheraea proylei* J. saines (H) et infestées par la mouche (FI) au cinquième âge.

Table III. Absorption spectra peak values of the haemolymph of healthy (H) and Uzifly infested (FI) fifth instar of the larvae tasar silkworm, *Antheraea proylei*.*Tableau III. Valeurs pic des spectres d'absorption de l'hémolymphe de larves du ver à soie tasar, Antheraea proylei saines (H) et infestées par la mouche (FI).*

Sl No.	Worms	Wavelength 00.0-700.8 nm) and absorbency 1 ABS (0-0.80)	Peak values									
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Sl No	Vers à soie sains (H) et infestés par la mouche (FI)	Longueur d'ondes (200-300 nm) et absorption ABS (0-0.80)	Valeurs pic									
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	H3 (H-mature)	ABS	662.0	657.2	644.0							
	H3 (H-adultes)		0.310	0.306	0.298							
2.	H2 (H-medium)	ABS	661.9	658.0	644.9							
	H2 (H-moyens)		0.240	0.260	0.220							
3.	H1 (H-early)	ABS	661.5	658.5	650.0	644.0						
	H1 (H-précoces)		0.187	0.185	0.179	0.178						
4.	FI1 (FI-early)	ABS	670.0	665.0	644.0	638.9	608.6					
	FI1 (FI-précoces)		0.147	0.139	0.105	0.099	0.111					
5.	FI2 (FI-late)	ABS	669.5	667.0	665.0	646.0	644.5	641.0	639.0	636.0	608.5	575.0
	FI2 (FI-tardifs)		0.121	0.120	0.118	0.085	0.083	0.679	0.078	0.076	0.080	0.078
6.	FI3 (FI-during death)	ABS	667.5	665.0	648.5	644.5	639.0	608.5				
	FI3 (FI-morts)		0.108	0.105	0.075	0.071	0.066	0.067				
7.	FI4 (FI-after death)	ABS	667.0	664.5	662.0	658.0	654.0	650.0	647.5	644.5	599.0	
	FI4 (FI-après être morts)		0.088	0.086	0.083	0.078	0.072	0.067	0.065	0.063	0.060	

without consuming the glands by the Uzifly. The reduction of the TAA content also affects the silkworm's protein balance, because AA are the intermediates for protein synthesis. This is in conformity with the views of Schoffeniels and Gilles (1970). The present findings are in the same line with the findings of Prosser and Brown (1965) that, the specific new proteins are formed from AA absorbed in the free form from the haemolymph as well as from AA liberated, as a result degeneration of already existing tissue protein. Hence, it can be concluded that the loss of AA or protein from the haemolymph due to fly-infestation may affect the spinning of the cocoon, the quality of the cocoon produced and thereby result in the death of the silkworm.

The absorption spectra of total proteins in the haemolymph of healthy and fly-infested worms shows marked differences (Fig 1). The highest peak noticed was found in H3 worms = 276.8 nm wavelength with 0.994 absorption (ABS). The values of the other peak values are depicted in Table II. Three peaks were observed in H3 larvae, whereas in FI4 larvae only one peak was observed (Fig

1). The variation of total protein concentrations in healthy and fly-infested worms has been clearly understood from the spectrophotometer process.

Variation in Folin proteins:

The highest concentration of folin proteins (FP), present in the haemolymph of 5th instar larvae of *A. proylei*, i.e. 5.94 g/100ml, was found in healthy mature (H3) larvae whereas the lowest concentration (0.61 g/100 ml) was found in fly-infested larvae after death (F14) (Table-I). Healthy worms loose 5.76 g/100 ml i.e 36.9 per cent of their folin protein present in the haemolymph. The observed differences are found statistically significant ($P < 0.05=1.08$) in all the stages of healthy and fly-infested worms (Table-I).

Total solid:

The highest concentration of total solid (TS) in the haemolymph of 5th instar larvae of *A. proylei*, i.e. 11.14 g/100 ml was found in healthy mature (H3) larvae, whereas the lowest concentration was found in fly-infested larvae after death (F14 worms) (Table-I). The losses due to fly-infestation in healthy worms was as high as 32.8%. The observed differences are found to be significant at 1% level in all the stages of healthy and fly-infested worms.

Absorption Spectra of Haemolymph:

The absorption spectra in the haemolymph of healthy and Uzifly-infested worms show marked variations (Fig. 2). The highest value was found in H3 worms - 662.0 nm wavelength with 0.310 absorption (ABS). The values for the maxima are given in Table-III. Moreover, the number of peak values increased as the fly-infestation proceeded. The lowest number of peaks has been observed in H3 worms (3 peaks) whereas, the maximum number of peaks were found (10 and 9 peaks, respectively) in F12 and F14 worms. These variations in haemolymph concentration due to fly-infestation are in conformity with the findings of RamaKrishnan and Pawar (1975) in which variation in haemolymph protein concentrations were attributed to different diets fed to larvae of *Spodoptera litura* Fabr.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are most thankful to the Head, Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal and to the Director, Department of Sericulture, Manipur for Laboratory facilities and encouragement.

REFERENCES

- AGARWAL S.D. AND JOLLY, M.S. (1981) Protein bound amino acids in the larval and pupa haemolymph of *Antheraea mylitta* D. Indian J. Ent., 43(2), 145-147.
- GOPE B. AND PRASAD B. (1980) The free amino acids in the body tissues of some edible insects of Manipur. Jour. Adv. Zool., 1, 77-80.
- JOLLY M.S., SINHA A.K. AND AGARWAL S.C. (1972) Free amino acids in the larval and pupal haemolymph of *Antheraea mylitta* D. reared on *Terminalia tomentosa*. Indian J. Seri., 11(1), 63-67.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J. AND RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin- phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MOORE S. AND STEIN W.H. (1948) Photometric method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem., 176, 367-388.
- PHUKON L. AND PRASAD B., (1986) A note on the qualitative estimation of free amino acids in the haemolymph of *Hydrophilus olivaceous* Fabr. (Coleoptera: Hydryophilidae). Comp. Physiol. Ecol., 2, 252-254.

- PLUMMER, T.D. (1982) An introduction to practical biochemistry 2nd ed., Tata Mc Graw-Hill Pub. Co. Ltd., New Delhi, P. 362.
- PROSSER C.L. AND BROWN F.A. (1965) Comparative animal Physiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia and London.
- RAMAKRISHNAN N. AND PAWAR V.M. (1975) Effects of diets on the haemolymph protein of the larvae of *Spodoptera litura* (Fabr.). Indian J. Ent., 37(2), 172-178.
- SCHOFFENIELS E. AND GILLES R., (1970) Chemical Zoology (Florkin M. and Schureds, B.T.). Academic Press, New York and London.
- SINGH P.N., SINGH P.K., SUBHIRA H. AND PRASAD B., (1993) Effect of Uzifly, *Parasarcophaga knabi* Parker infestation on the free and protein bound amino acids in the haemolymph of *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae). New Approaches in Agricultural Technological, 2, 399-402.
- SINGH P. N. AND PRASAD B., (1986) Studies on the Incidence, Biology and Control of Fly-pest of Oak-tasar Silkworm *Antheraea proylei* J. (Lepidoptera: Saturniidae). Sericologia, 26(3), 355-364.
- WYATT G.R, LOUGHEED T.D. AND WYATT S.S., (1956) The chemistry of insect haemolymph. Organic compounds of the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* and two other species, J. Gen. Physiol., 39, 853-868.

CHANGEMENTS BIOCHIMIQUES DANS L'HEMOLYMPHE DES LARVES D'ANTHERAEA PROYLEI JOLLY (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) SAINES ET INFESTEES PAR LA MOUCHE UZI

P.K. SINGH, P.N. SINGH & B. PRASAD

Department of Life Sciences Department, Manipur University, Imphal - 795003, Manipur, Inde.

Les quantités d'acides aminés totaux (TAA), de protéines réactives au Folin (FP), de protéines totales (TP), de matière sèche totale (TS) ont été mesurées dans l'hémolymphe de larves du ver à soie tassar du chêne *Antheraea proylei* Jolly saines et infestées par la mouche, *Parasarcophaga knabi* (parkar), au cinquième âge. On constate des différences marquées. Les TAA baissent de $11,26 \pm 0,12$ à $7,05 \pm 0,75$ g/100 ml ; les FP baissent de $5,75 \pm 0,19$ à $0,61 \pm 0,43$ g/100ml ; les TP baissent de $11,32 \pm 0,12$ à $1,21 \pm 0,79$ g/100 ml ; et les TS baissent de $11,14 \pm 0,19$ à $1,16 \pm 0,17$ g/100ml. Les spectres d'absorption de l'hémolymphe de vers à soie sains et infestés par la mouche montrent 3 et 9 maxima respectivement. Les conséquences de ces observations sont évaluées par rapport à la formation de cocon et à l'absence de cocon.

INTRODUCTION

Antheraea proylei Jolly, connu ordinairement sous le nom de ver à soie tassar du chêne, est une souche interspécifique de *A. pernyi* G. et *A. roylei* Mr. se nourrissant sur les feuilles de chêne, *Quercus serrata* Thunb. Cette production du tassar du chêne est maintenant devenue « la richesse de Manipur ». Jusqu'à présent, les changements biochimiques dans l'hémolymphe du ver à soie du chêne infesté par la mouche mouche demeurent inexplorés (Singh et coll., 1993, Singh et Prasad, 1986). Plusieurs chercheurs (Jolly et coll. 1972, Plummer 1982, Agarwal et Jolly 1981, Gope et Prasad 1980, Phukon et Prasad 1986) ont étudié le contenu en acides aminés de l'hémolymphe de différentes larves. Cependant, aucune information n'a été enregistrée concernant les quantités de protéines, d'acides aminés totaux, de solides totaux etc..., de l'hémolymphe d'*A. proylei* infesté par *P.knabi* (Parkar).

Nous avons pensé qu'il était souhaitable d'entreprendre une estimation quantitative des protéines, des acides aminés, de l'ensemble des matières sèches, etc... dans l'hémolymphe de larves saines et infestées. Une étude de ce type pourrait permettre de révéler des faits intéressants dans le domaine de la physiologie et de la biochimie de l'hôte-parasite.

MATERIELS ET METHODES

Pour éviter les variations de l'hémolymphe dues à l'alimentation en feuilles de chêne, *Quercus serrata* Thunb, les larves du cinquième âge de *A. proylei* ne sont pas nourries pendant 35 ± 5 heures avant le début des expérimentations.

Recueil de l'hémolymphe :

Six vers à soie non alimentés de chaque groupe d'âge sont choisis de manière aléatoire. L'hémolymphe de chaque groupe d'âge est recueillie dans un tube en verre calibré, en coupant les deux dernières pattes membraneuses et stockée au frigidaire. Deux ml d'hémolymphe sont recueillis sur

l'échantillon regroupé pour être analysé. Les vers sains sélectionnés pour l'étude sont : le cinquième âge précoce H1 (âgés de deux jours), en phase intermédiaire H2 (âgés de huit jours) et mûrs H3 (âgés de 15 jours). De même, les vers à soie infestés par la mouche Uzi au cinquième âge (mûrs, c'est à dire âgés de 15 jours) concernent ceux en phase initiale F11 (5 jours après l'infestation, c'est à dire âgés de 15 jours comprenant 5 jours d'infestation), ceux en dernière phase F12 (10 jours après l'infestation, c'est à dire âgés de 15 jours comprenant 10 jours d'infestation), F13 (à la mort, c'est à dire 12 jours après l'infestation, donc âgés de 15 jours comprenant 12 jours d'infestation), et F14 (6 heures après leur mort), respectivement. Les vers à soie F14 sont pris pour voir le changement des métabolites après la mort.

Acides aminés totaux (TAA) :

L'hémolymphe fraîchement regroupée (1 ml) pour chaque groupe d'âge est transférée dans un tube en ver calibré de 10ml. Une goutte d'indicateur de méthyle rouge est ajouté et la solution est neutralisée avec 0,5 ml de solution NaOH 0,1. Le réactif Ninhydrine (1 ml) est ajouté à cette solution. La solution est chauffée pendant 20 minutes dans un bain marie bouillant. 5 ml de solution diluante sont ajoutés (eau distillée: n-propanol 1:1) à ce mélange, pendant qu'il est toujours dans le bain-marie. L'absorption de la solution est mesurée à 570nm avec un colorimètre Spectronic 20. La quantité d'acides aminés totaux présents dans la solution est calculée en préparant une courbe d'étalonnage avec de la glycine en suivant la méthode de Moore et Stein (1948). Les valeurs moyennes des observations sont établies pour chaque groupe d'âge.

Les protéines réactives au folin (FP):

On prend de l'hémolymphe fraîche pour l'estimation des FP. On utilise le réactif Folin-Ciocalteu suivant la méthode de Lowry et coll., (1951). L'absorption est mesurée à 750nm avec un spectrophotomètre-DU-Beckman. La quantité de protéines dans l'échantillon est calculée avec une courbe d'étalonnage qui est préparée en utilisant de l'albumine sérique bovine. On établit les valeurs moyennes d'observations triples pour chaque groupe d'âge.

Protéines totales (TP) :

20 micro litres d'hémolymphe fraîche sont dilués dans 3 ml de 0,1 M NaCl, tamponnée à un pH 7,1 avec du tris-amino-méthane 0,1. Les absorptions sont lues à 260 nm, 280 nm avec un spectrophotomètre Beckman DU-16. La concentration en protéines en g par ml est calculée en utilisant les formules $1,550 D_{280} - 0,780 D_{260}$ mises au point par Ramakrishnan et Pawar (1975). Les valeurs moyennes de trois observations sont établies pour chaque groupe d'âge.

Variation qualitative des spectres d'absorption de l'hémolymphe (ASH) :

20 microlitres d'hémolymphe sont recueillis en suivant la même technique de recueil de l'hémolymphe indiquée plus haut et une goutte de solution de thiourée (0,5 mmol/l d'eau distillée) est utilisée comme conservateur. La solution est diluée dix fois avec de l'eau distillée. Les spectres d'absorption de la solution sont mesurés à un intervalle 0,000-0,800, entre les longueurs d'onde 400 et 700 nm par une source visible d'intensité et à une vitesse de défilement de 150 nm par minute en utilisant un spectrophotomètre Beckman DU-6. Les valeurs moyennes d'observations triples sont établies pour chaque groupe d'âge.

Variation quantitative des matières sèches (TS) :

50 microlitres d'hémolymphe dans dix répétitions pour chaque groupe d'âge sont placés sur des lames de verre déjà pesées et étiquetées. Les lames sont ensuite chauffées à 95° C pendant 1 heure au four pour assécher complètement l'hémolymphe ajoutée. Les lames chauffées sont placées pendant 4 jours dans un dessiccateur contenant du CaCl₂. Les lames débarrassées de leur humidité sont repesées. La différence de poids indique la quantité totale de matières sèches présentes dans l'hémolymphe.

RESULTATS ET DISCUSSION

Variation de la quantité totale d'acides aminés :

La concentration la plus élevée d'acides aminés (TAA) dans l'hémolymph du cinquième âge larvaire d'*A. proylei*, détectée dans les larves mûres saines (H3), est de l'ordre de 11,38 g/100ml ; la concentration la plus faible (7,05 g/100 ml) est observée dans les vers à soie infestés par la mouche Uzi morts (F14) (Tableau I). La quantité de TAA perdue à cause de l'infestation par la mouche Uzi est calculée à 5,08 g/100 ml c'est à dire 44,6 % sur 11,38 g/100ml présents dans le ver à soie H3. Cela montre clairement qu'environ la moitié de la quantité de TAA présente dans les vers à soie H3 a été utilisée par le ver de la mouche comme source d'énergie. La différence de teneur en TAA de divers vers à soie sains et infestés par la mouche est significative sur le plan statistique à toutes les phases d'infestation. La concentration en acides aminés chez le ver à soie tassar est très élevée. Cela confirme les observation de Wyatt et coll., (1956) chez le ver à soie mûrier *B. mori* pour lequel la concentration en TAA est 50-100 fois plus élevée que la concentration observée chez l'homme. La concentration en TAA de ce ver à soie est plus élevée que chez les autres insectes. Cette observation concorde avec celle de Plummer (1982) selon laquelle 2,3 g/100ml de TAA sont présents chez un insecte moyen. D'après les observations ci-dessus il est logique de conclure que les vers à soie tassars contiennent plus de TAA que les autres insectes en raison de la synthèse de la soie.

Variation des protéines totales :

La concentration la plus élevée en protéines totales (TP), 11,44 g/100ml d'hémolymph se rencontre chez les larves du 5ème âge mûres saines (H3), de *A. proylei*.

La concentration la plus faible, 0,42 g/100 ml d'hémolymph est détectée dans les larves infestées mortes (F14) (Tableau I). Les vers à soie sains perdent 11,02 g/100 ml c'est à dire 96,3 % des protéines présentes dans l'hémolymph, en l'espace de 11 jours après infestation par la mouche Uzi. Les différences observées sont significatives à 1 % à tous les stades, pour les vers à soie sains et infestés. Ainsi, les larves ne réussissent pas à filer un cocon de soie protéique si l'infestation par la mouche se produit au début du 5ème âge. Cela peut être dû au fait que les vers de la mouche consomment toutes les matières protéiques présentes dans l'hémolymph dont le cocon a besoin pour produire la soie. Si l'infestation se produit à la fin du 5ème âge, les larves peuvent toujours filer leur cocon. Mais la qualité de ce cocon est bien inférieure. Cela est dû à la baisse excessive des matières protéiques dans l'hémolymph du ver à soie, qui finit par affecter la fonction normale de la glande séricigène sans que les glandes ne soient consommées par la mouche Uzi. La baisse du contenu en TAA affecte aussi l'équilibre protéique du ver à soie, parce que les acides aminés sont les intermédiaires pour la synthèse des protéines. Cela est en accord avec les vues de Schoffeniels et Gilles (1970). Les présentes observations s'inscrivent dans la même ligne que celle de Prosser et Brown (1965) selon laquelle les nouvelles protéines spécifiques se forment à partir d'AA absorbés sous forme libre dans l'hémolymph ainsi qu'à partir d'AA libérés provenant d'une dégradation des protéines existantes. Ainsi, en conclusion, il se peut que la perte d'AA ou de protéines de l'hémolymph due à l'infestation par la mouche, affecte le filage du cocon, la qualité du cocon produit et provoque ainsi la mort du ver à soie.

Les spectres d'absorption de l'ensemble des protéines de l'hémolymph des vers à soie sains et infestés par la mouche Uzi présentent des différences marquées (Fig. 1). Le pic le plus haut observé se rencontre pour les vers H3 - 276,8 nm de longueur d'onde avec 0,994 d'absorption (ABS). Les autres valeurs pics sont présentées dans le tableau II. On observe trois pics dans les larves H3, tandis que l'on n'observe qu'un pic pour les larves F14 (Fig. 1). La variation des concentrations en protéines totales entre les vers sains et infestés par la mouche est bien enregistrée par la spectrophotométrie.

Variation en protéines réactives au Folin :

La concentration la plus élevée en protéines « Folin » (FP) présentes dans l'hémolymph des larves au 5ème âge de *A. proylei*, 5,94 g/100 ml est observée chez les larves matures saines (H3) tandis

que la concentration la plus faible (0,61 g/100ml) est observée chez les larves infestées par la mouche après leur mort (F14) (Tableau I). Les vers à soie sains perdent 5,76 g/100ml, c'est à dire 36,9 % de leurs protéines « Folin » présentes dans l'hémolymphe. Les différences observées sont significatives sur le plan statistique ($P 0,05 = 1,08$) à tous les stades pour les vers sains et infestés par la mouche (Tableau I).

Matières sèches totales :

La concentration la plus élevée en matières sèches (TS) dans l'hémolymphe des larves du 5ème âge de *A. proylei*, 11,14 g/100 ml est observée chez les larves matures saines (H3), tandis que la concentration la plus faible est observée chez les larves infestées par la mouche après leur mort (vers à soie F14) (Tableau I). Les pertes dues à l'infestation par la mouche chez les vers sains s'élèvent jusqu'à 32,8 %. Les différences observées sont significatives à un seuil de 1 % à tous les stades chez les vers sains et les vers infestés par la mouche.

Spectre d'absorption de l'hémolymphe :

Le spectre d'absorption de l'hémolymphe de vers sains et infestés par la mouche Uzi montre des variations marquées (Fig. 2). La valeur la plus élevée se rencontre chez les vers H3 - 662 nm de longueur d'onde avec une absorption de 0,310 (ABS). Les valeurs maximales sont présentées dans le Tableau III. De plus, le nombre de valeurs pics augmente au fur et à mesure que l'infestation par la mouche progresse. Le nombre de pics le plus faible est observé chez les vers H3 (3 pics) tandis que le nombre de pics maximum est observé (10 et 9 pics respectivement) chez les vers F12 et F14. Les variations de concentration dans l'hémolymphe provenant de l'infestation par la mouche confirment les observations de Ramakrishnan et Pawar (1975) selon lesquelles la variation dans l'hémolymphe des concentrations en protéines dépend des différentes alimentations données aux larves de *Spodoptera litura* Fabr.

ETABLISSEMENT DE MERISTEMES APICAUX DU MURIER, *MORUS ALBA* L., *IN VITRO**

FONSECA T.C.¹ VIEIRA M.L.C.² & BANDEL G.²

1. Divisao de Zootecnia Diversificada, D3, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13.460-000, Nova Odessa, Sao Paulo, Brasil.

2. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Av. Padua Dias 11, CP 83, CEP 13- 400-970 Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.

*Un protocole d'établissement des méristèmes apicaux du mûrier a été élaboré avec le but de fournir des racines convenables pour des études cytologiques. Les prétraitements effectués sur les racines avec 8-hydroxyquinoléine, colchicine et/ou cycloheximide ont permis d'observer le nombre de chromosomes, $2n = 28$, chez le clone IZ 56/4 de *M. alba*.*

Mots-clé : *M. alba*, culture *in vitro*, chromosomes.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est une plante à développement rapide à pollinisation croisée. La propagation par graine ne préserve pas le vrai type à cause de sa grande hétérozygotie (Das, 1983). Le nombre diploïde de chromosomes du genre *Morus* est 28, mais des cellules de haute polyploidie se rencontrent. Parmi les polyploidies, les triploidies présentent des caractéristiques intéressantes comme, un meilleur développement des branches et des feuilles, une qualité nutritionnelle supérieure et une résistance au froid et aux maladies (Kim et coll., 1985). Cependant, d'après Das (1983) la production et la multiplication des triploïdes sont retardées. Ordinairement, le mûrier est multiplié par bouturage mais quelques génotypes à haute valeur nutritive ont des difficultés à produire des racines (Jain et coll., 1990).

La propagation clonale après culture de tissu offre une alternative à la propagation végétative des espèces ligneuses présentant des caractéristiques désirées (Biondi et Thorpe, 1982; Thorpe, 1983). La régénération *in vitro* du mûrier suivie de la réimplantation en champ a été rapportée chez *M. alba*, *M. bombycis*, *M. nigra* et *M. indica* par Oka et Ohyama (1986) au Japon, Bapat et Rao (1990), Yadav et coll. (1990) et Kathiravan et coll. (1995) en Inde et Hossain et coll. (1992) au Bangladesh.

L'utilisation des sommets de pousses et des bourgeons nodaux du mûrier comme explants est un moyen utile pour la propagation de plantes saines et pour la préservation des ressources génétiques. Des plantules de *M. alba* cv MR₂ ont aussi été obtenues à partir d'hypocotyles prélevés sur des cultures axéniques de graines cultivées sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), enrichi de BA (0,5 mg/l) et d'AIA (0,5 mg/l) (Kathiravan et coll., 1995).

Jain et coll. (1990), en travaillant avec quatre espèces de mûrier, *M. indica*, *M. alba*, *M. rotundifolia* et *M. bombycis* ont observé que la réponse à la production de pousses est variable selon

* Travail partiel de doctorat effectué à l'ESALQ, Piracicaba, Brésil avec bourse du CNPQ.

les génotypes. Cependant, Saito (1992) n'a pas observé le même phénomène en travaillant avec des variétés de *M. alba*.

Aucun des travaux publiés sur la micropropagation ne comporte d'étude sur la stabilité chromosomique chez des plantes dérivées de ce processus.

Quelques auteurs ont relaté la présence de trois paires de chromosomes distincts et géants dans l'ensemble chromosomique de *M. bombycis* (Sinoto, 1929), *M. indica* (Royan Subramanian, 1965) et *M. alba* (Gill et Gupta, 1979). Sinoto (1929) a aussi relaté des divergences entre Tahara et Osawa pour ces chromosomes.

Ce travail a été fait dans le but d'étudier l'établissement des sommets des pousses dans le milieu de culture et l'obtention de racines pour observer les chromosomes mitotiques.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel végétal utilisé pour la mise au point du protocole de l'introduction *in vitro* des méristèmes apicaux du mûrier est le clone IZ56/4 (Fig. 1) provenant du programme d'amélioration du mûrier (Fonseca et coll., 1994).



Fig 1. Le clone IZ56/4 dans la collection de germoplasme au Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericulturra (CEPAS), Galia, Brésil.

Fig 1. The clone IZ56/4 in the germplasm collection at the Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericulturra (CEPAS), Galia, Brazil.

Le développement des plantes productrices des explants a été réalisé dans une serre en suivant la suggestion d'Oka et Ohyama (1986) qui ont considéré cette pratique utile pour l'obtention d'explants propres, car les tissus des branches cultivées en champ sont quelquefois infestés de micro-organismes,

qui rendent la stérilisation impossible. Cependant, cette technique n'a pas empêché ce type de contamination résultant peut-être des multiples reproductions végétatives chez le mûrier. C'est seulement par l'addition des antibiotiques au milieu de culture, que l'on peut contrôler ces contaminations.

Les explants (les méristèmes apicaux) ont été prélevés sur des boutures cultivées dans des pots de sable en serre et recueillis dans un Bêcker rempli d'eau distillée. Afin de mettre en place une culture axénique les explants ont été trempés dans une solution à 1% de détergent, puis rincés à l'eau courante, pendant 10 minutes. La désinfection a été faite à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 2% (v/v) (Tableau I) pendant 12 minutes après un passage dans l'alcool à 70 % (v/v) pendant 40 secondes. Ils sont ensuite rincés soigneusement 5 à 6 fois dans de l'eau distillée stérile.

Tableau I. Solution désinfectante.

Table I. Disinfectant solution.

Composant / Component	Quantité/100 ml / Quantity/100ml
NaOCl	16,6ml
Movadol	0,1ml
Tween® 80	1 goutte / 1 drop
H ₂ O distillée / H ₂ O distilled	jusqu'à 100ml / up to 100ml

Les méristèmes apicaux ont été débarrassés des feuilles superflues et coupés aux extrémités pour obtenir des explants de 2,5 cm et comportant 3 bourgeons.

Les explants ont été mis à raciner sur le milieu de culture de Murashige et Skoog (1962) contenant la moitié de la concentration originale en micro-et-macro-éléments et vitamines (MS/2) additionné de 15 g/l de saccharose. Le milieu a été ajusté à un pH de 5,8 avec 0,1N NaOH / 0,1N HCl avant l'addition d'agar (0,8 % p/v) et a été stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes. Après l'autoclavage, la tétracycline (100 µg/ml) stérilisée par filtration, a été ajoutée.

Après une semaine les explants ont été repiqués sur le milieu MS/2 additionné d'acide indol-butyrique (AIB) (0,4 ml/l) pendant deux semaines pour l'induction des racines, puis repiqués dans le MS/2, tous les 15 jours.

Etude des chromosomes mitotiques:

Les racines induites *in vitro* ont été recueillies et traitées au préalable avec des inhibiteurs du fuseau mitotique (8-hydroxyquinoléine à 0,03 %, colchicine à 0,01 % et 0,05 %) ou avec un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide à 140ppm) pendant des durées variées, afin d'obtenir la meilleure morphologie chromosomique. Les racines ont ensuite été fixées dans la solution de Carnoy (éthanol:acide acétique 3:1) pendant 24 heures et conservées en permanence dans l'alcool 70 % (v/v) à 10° C.

Pour la coloration des racines nous avons utilisé la méthode de Feulgen avec hydrolyse pendant 5 minutes dans HCl 1N à 60° C, suivie d'un traitement au réactif de Schiff (fuchsine leucobasique) pendant 45 minutes. Les racines ont été rincées à l'eau distillée pendant 5 minutes puis écrasées dans le carmin acétique à 2 %. Les lames considérées comme satisfaisantes ont été séparées des lamelles dans l'acide acétique 45 % et séchées à l'air avant d'être montées dans le baume du Canada.

Les figures mitotiques ont été photographiées avec un microscope Olympus avec optovar 1,25X sur un film Copexpan (Agfa) et filtre Olympus vert.

RESULTATS ET DISCUSSION

En fonction de ces études, on peut donc arriver à un protocole adapté aux méristèmes apicaux du mûrier *in vitro* (Tableau 2) donnant une très bonne production de racines (Fig. 2).

Lors des 22 essais réalisés en 1994, nous avons subi une perte de matériels provoquée par l'oxydation du milieu de culture et sa contamination. Il en a résulté une baisse du nombre de racines, même chez les survivants. Nous avons testé plusieurs alternatives pour maîtriser l'oxydation du milieu qui paraît être le principal problème de survie et de production de racines par les explants.

Tableau II. Protocole d'établissement de méristèmes apicaux du mûrier *in vitro*.

Table II. Protocol for establishing in vitro apical meristems of mulberry.

01. Récolte des explants.	01. Collection of explants
02. Récolte des sommets des pousses dans l'eau	02. Collection of apex of shoots in water.
03. Désinfection Lavage des explants dans une solution de détergent à 1%. Lavage dans l'eau courante pendant 10 minutes.	03. Desinfection. <i>Washing of explants in a detergent solution at 1%. Washing with clear water during 10 minutes.</i>
04. Désinfection sous flux laminaire. Immersion des explants dans l'alcool à 70% (v/v) pendant 40 secondes. Immersion des explants dans la solution hypochlorite (2%) + Movadol (0,1%) + Tween (0,02%) pendant 12 à 15 minutes. Lavage dans l'eau distillée stérile 5 à 6 fois.	04. Desinfection under a laminar flow <i>Immersion of explants in 70% alcohol (v/v) during 40 seconds.</i> <i>Immersion of explants in an hypochlorite solution (2%) + Movadol (0,1%) + Tween (0,02%) during 12 to 15 minutes.</i> <i>Washing in sterile distilled water 5 to 6 times.</i>
05. Culture Culture des explants sur milieu MS/2 plus Tétracycline (0,01%) pendant 7 jours. Repiquage en MS/2 + Tétracycline (0,01%) plus AIB (0,04%) pendant 15 jours. Repiquage en MS/2 + Tétracycline (0,01%), tous les 15 jours	05. Cultivation <i>Cultivation of explants on MS/2 medium plus Tetracycline (0,01%) during 7 days</i> <i>Planting out in MS/2 + Tetracycline (0,01%) + AIB (0,04%) during 15 days.</i> <i>Planting out in MS/2 + Tetracycline (0,01%) + every 2 weeks.</i>

Pour maîtriser cette oxydation, pendant les repiquages, les explants ont été manipulés dans une solution d'acide ascorbique à 0,1 mg/l. Cependant, aucune réponse positive n'en a résulté à cause de la contamination dans les sous-cultures. Pour régler ce problème, nous avons réalisé deux pulvérisations sur les boutures avec du Dithane (2 g/l) une semaine avant et la veille de la récolte des explants. Ce traitement n'a pas permis d'amélioration car il s'est révélé toxique pour les explants.

En 1995 douze nouvelles tentatives ont été réalisées. Pour huit d'entre elles, la culture a été faite sur milieu MS/2 et pour les quatre autres, sur milieu MS/2 additionné de tétracycline à 0,01 %. Sur les 8 essais sur MS/2, les 3 premiers ont présenté une perte moyenne de 10 % due à la contamination, avec cependant une production inconstante de racines. Dans trois autres essais il n'y a pas eu formation de racines car les explants se sont nécrosés dans les premières semaines, peut-être à cause du nettoyage des boutures à l'hypochlorite de sodium à 1% avant les récoltes. Dans les 2 derniers

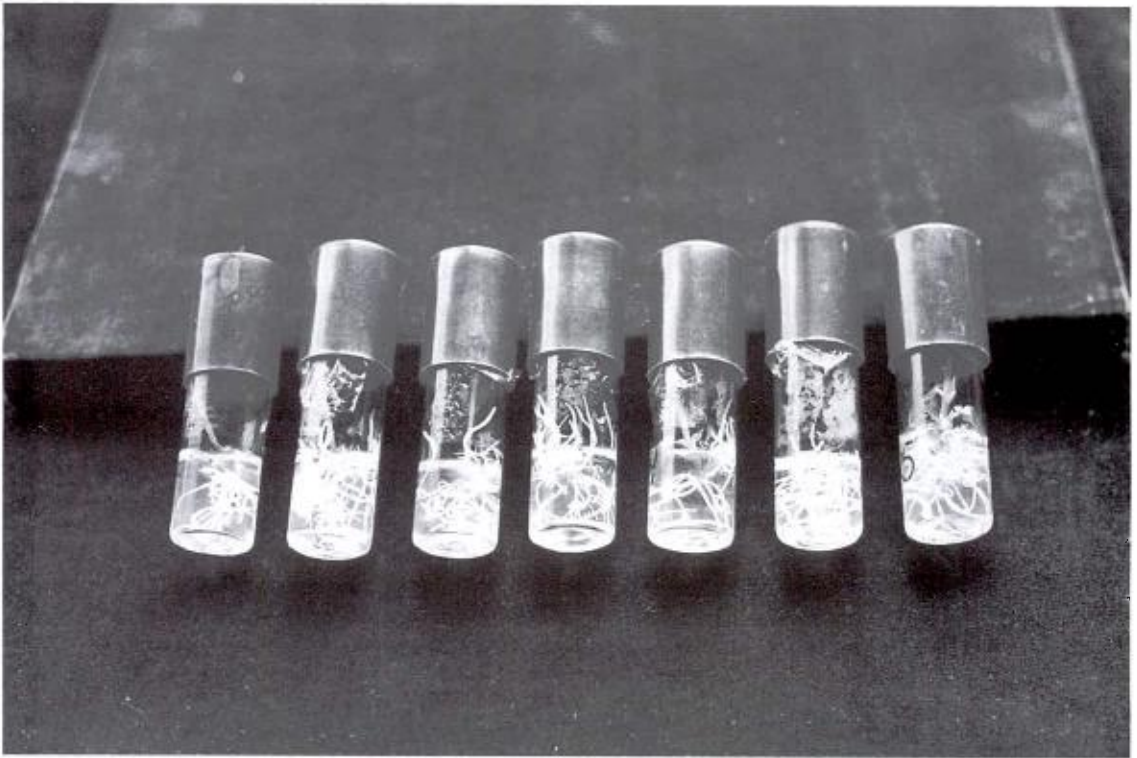


Fig 2: Méristèmes apicaux du clone IZ56/4 racinés in vitro selon le protocole du Tableau 2
Fig 2. Apical meristems of clone IZ56/4 rooted in vitro according to the protocol in Table 2.

essais, les explants ont été mis au réfrigérateur (8 °C), pour contrôler la production de composés phénoliques après les récoltes, mais ils n'ont pas résisté.

Au vu de ces problèmes nous avons décidé de travailler avec le milieu MS/2 enrichi avec de la tétracycline : dans deux des essais le milieu a été changé chaque semaine et dans les autres tous les 15 jours. Le pourcentage de contamination a été en moyenne de 26 % sur les trois premiers essais et de 5 % dans le dernier. Ces résultats ne diffèrent pas de ceux enregistrés dans la littérature par Rauber and Grunewaldt (1988), Reed (1991), Hovanesian and Torres (1986) et Dhawan and Bhojwani (1985). La production de racines a été importante dans 2 essais avec un aspect vigoureux convenable pour les études cytologiques.

Dans ce travail, le but principal d'établissement de méristèmes apicaux en milieu de culture était la production de racines pour l'étude cytogénétique. Nous avons trouvé dans la littérature des travaux sur l'enracinement spontané et facilité chez le mûrier contrairement à ce que l'on observe normalement chez les ligneuses, avec l'utilisation de faibles concentrations d'acide indol-butérique (AIB), en observant que les valeurs élevées ont provoqué un cal à la base des rameaux (Kim et coll., 1985) ce que nous avons constaté occasionnellement (Fig. 3).

Néanmoins, on trouve des résultats différents sur les effets de l'auxine sur le racinement du mûrier dans la littérature. Enomoto (1987) dans un travail sur la préservation des ressources génétiques du mûrier au moyen de la culture de tissus, où quelques cultivars du mûrier ont été développés sur milieu avec 0,1 mg/l de benzyladine (BA), a obtenu le racinement des bourgeons 10 jours après le changement pour un milieu sans hormone. Jain et coll. (1990), cependant, ont observé que l'addition d'AIB (0,5 mg/l) au milieu de culture est très efficace dans la promotion de la régénération et de

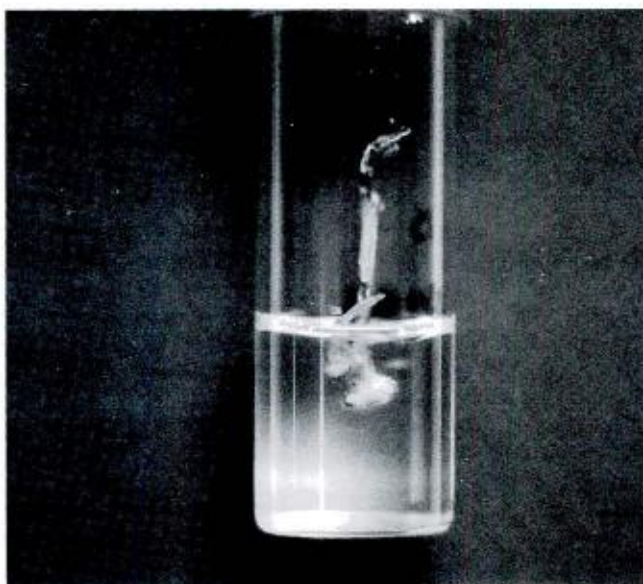


Fig 3. Formation de cal dans la culture in vitro du clone IZ56/4..

Fig 3: Cal formation during in vitro growth of clone IZ56/4.

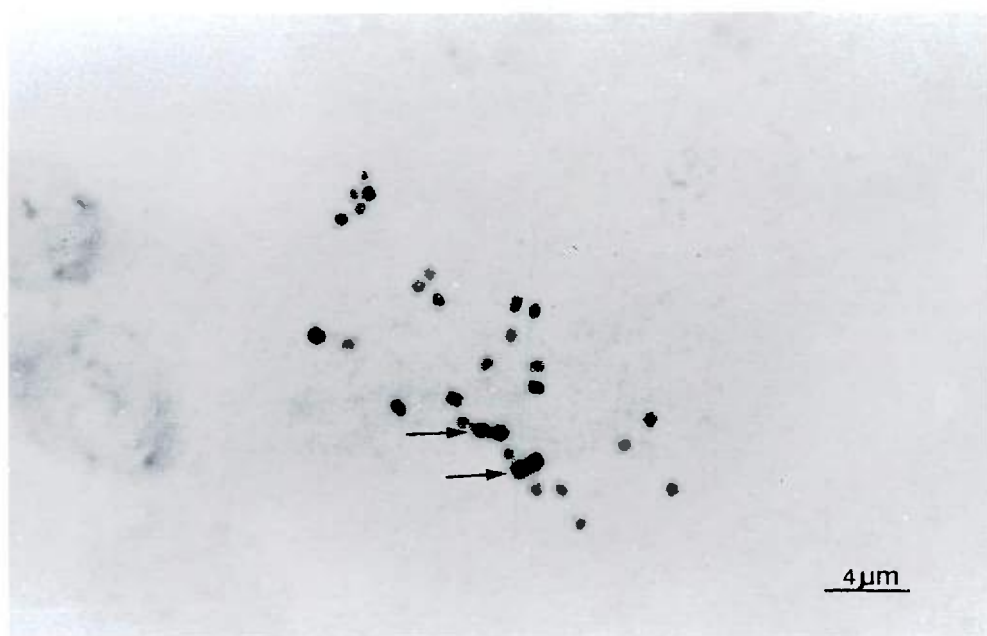


Fig 4. Photomicrographie de la métaphase mitotique du clone IZ56/4 prétraité avec la colchicine à 0,01 % (4:30 h), qui permet l'observation des 28 chromosomes (13 paires de petits et 1 paire de grands (indiquée par les deux flèches).

Fig 4. Photomicrography of the mitotic metaphase of clone IZ56/4 pretreated with 0,01 % colchicine (4 h30) which enables the observation of the 28 chromosomes (13 pairs of small ones and 1 pair of big ones (indicated by the two arrows).

l'enracinement des explants nodaux. Ohyama (1970), Seki et coll. (1971) ont obtenu la formation de racines seulement dans le milieu avec de l'auxine.

Dans ce travail nous avons observé des formations spontanées de racines sur milieu sans hormone; cependant, ces racines étaient fines et très peu convenables pour des études cytologiques. Des résultats semblables ont été obtenus par Hossain et coll. (1992) avec *M. laevigata*, avec formation satisfaisante de racines dans le milieu additionné d'AIB et présence de racines faibles, fines et peu nombreuses sur milieu sans auxine. Ils en ont donc déduit la nécessité d'auxine pour le racinement efficace chez cette espèce. En travaillant également avec *M. laevigata* Islan et coll. (1993) ont constaté que le milieu supplémenté par les auxines améliore la fréquence de racinement et le nombre de racines par bouture; de même, l'augmentation des repiquages a contribué au racinement en augmentant la fréquence de 43 % pour la culture initiale à 88 % pour le cinquième repiquage, les nombres de boutures racinées passant de 5,6 à 13,20 % respectivement.

Perez et coll. (1985) ont observé que des bourgeons de *Corylus avellana*, un arbre fruitier de grande importance économique et bien distribué en Espagne, n'ont pas fourni de racines en présence d'AIB, alors que le contraire a été observé sur le mûrier dans le présent travail, où le racinement a été observé même sur milieu avec auxine.

Dans notre travail, la plupart des pousses ont commencé à s'enraciner après le remplacement du milieu contenant de l'AIB par le milieu sans auxine, c'est à dire 15 à 20 jours après l'inoculation.

Malgré les différents prétraitements effectués sur les racines, elles n'ont pas permis de résultat démonstratif mais d'éventuelles apparitions de métaphases régulières pour observer la morphologie des chromosomes. Cette difficulté peut ne pas résulter d'un manque d'efficacité des inhibiteurs du fuseau ou de la synthèse protéique, mais peut-être des problèmes de perméabilité des racines, ce qui aurait nécessité des études plus approfondies.

Dans les études réalisées sur quelques cellules de racines on a pu vérifier le nombre de chromosomes $2n = 28$ (Fig. 4), ce que confirme le nombre de base $n = 14$ des premiers rapports faits par Tahara (1909) et Sinoto (1929) et confirmés par des travaux sur le mûrier comme, par exemple, sur *M. alba* par Gill et Gupta (1979), *M. indica* par Royan-Subramanian (1965), *M. nigra* par Basavaiah et coll. (1990) et quelques autres espèces par Susheelamma et coll.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient beaucoup le Pr. Bernard Lejeune, de l'Université de Paris-Sud, France, pour ses remarques avisées et sa contribution à la rédaction de ce manuscrit.

REFERENCES

- BANERJEE N., LANGHE E. (1985) A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports*, 4, 351-354.
- BAPAT V.A., RAO P.S. (1990) *In vitro* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 69-70.
- BASAVAIAH, DANDIA S.B., ANIL DHAR, SENGUPTA K. (1990) Meiosis in natural decosaploid (22x) *Morus nigra* L., *Cytologia* 55, 505-509.
- BIONDI S., THORPE T.A. (1982) Clonal propagation of forest tree species. In: Bayaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol.1, tree I. Springer-Verlag, Berlin, 197-204p.
- DAS B.C. (1983) Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. National Seminar on Silk Research and Development, March 10-13, Bangalore, India.
- DHAWAN V., BHOJWANI S.S. (1985) *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Plant Cell Reports* 4, 315-318.
- ENOMOTO S. (1987) Preservation of genetic resources of mulberry by means of tissue culture. *Jpn. Agric. Res. Q.* 21(3), 205-210.

- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L. (1985) Melhoramento da amoreira por meio da hibridação artificial. B. Industr. Anim. 42(2), 265-276.
- FONSECA T.C., ALMEIDA J.E., OKAMOTO F. (1994) Le programme d'amélioration du mûrier dans l'Etat de Sao Paulo au Brésil. Sericologia 34(4), 727-733.
- GILL B.S., GUPTA R.C. (1979) Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L. (Moraceae) Current Sci. 48(1), 35-36.
- HOSSAIN M., RAHMAN S.M., ZAMAN A., JOADER O.I., ISLAN R. (1992) Micropropagation in *M. laevigata* Wall. from mature trees. Plant Cell Reports 11:522-524.
- HOVANESIAN J.C., TORRES K.C. (1986) Micropropagation of *Uniola paniculata* L. Plant Cell Reports 5, 385-386.
- HUGUES K.W. (1981) Fruit crops In: Conger B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques (pp 5-50) CRC Press, Boca Raton.
- ISLAN R., ZAMAN A., JOADER O.I., BARMAN A.C. (1993) *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33, 339-341.
- JAIN A.K., DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Reports 8, 737-740.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHIA. (1995) Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Morus alba*. Israel J. of Plant Sci. 43(3), 259-262.
- KIM H., PATEL K.R., THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz. 146(3), 335-340.
- MHATRE M., BAPAT V.A., RAO P.S. (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Reports 4, 78-80.
- MINAMIZAWA K., HIRANO H. (1973) Effects of the concentrations of several sugars on the differentiation in excised stem segments of mulberry tree cultivated *in vitro*. J. Seric. Sci. Jpn. 43(1), 51-57.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 15, 473-497.
- OHYAMA K. (1970) Tissue culture in mulberry tree. Jpn. Agric. Res. Q. 5, 30-34.
- OKA S., OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.) In: Bayaj Y.P.S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 1, tree1, Springer-Verlog, Berlin.384-392p.
- PEREZ C., RODRIGUES R., TAMES R.S. (1985) *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. Plant Cell Reports 4, 137-139.
- RAUBER M., GRUNEWALDT J. (1988) *In vitro* regeneration in *Allium* species. Plant Cell Reports 7, 426-429.
- REED B.M. (1991) Micropropagation of meadowfoam (*Limnanthes* spp) Plant Cell Reports 10, 94-96.
- ROYAN-SUBRAMANIAN S. (1965) The chromosomes of *Morus indica*, Linn. Current Sci 18, 539-540.
- SAITO H. (1992) *In vitro* propagation of mulberry through adventitious bud induction system. J. Seric. Sci. Jpn.61(1), 46-51.
- SEKI H., TAKEDA M., TSUTSOMI K., USHIKI Y. (1971) Studies on the callus culture of the mulberry tree. I. The effect of concentration of auxin and kinetin on the callus cultures of the mulberry stem. J. Seric. Sci. Jpn. 40, 81-85.
- SINOTO Y. (1929) Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. Cytologia 1, 109-191.
- SKIRVIN R.M. (1981) Fruit crops in : Conger B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques (pp51-139) CRC Press, Boca Raton.
- SUSHEELAMMA B.N., KUMAR J.S., DANDIN S.B., JOLLY M.S., SENGUPTA K., RAJU R. (1990) Karyomorphological studies in a few exotic varieties of genus *Morus* L. Cytologia 55, 107-114.
- THORPE T.A. (1983) Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. Biotech. Adv. 1, 263-278.

- YADAV U., MALAN L., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* L., from shoot tip and nodal explants of mature trees Scientia Hort. 44(1-2), 61-67.

IN VITRO CULTURE OF APICAL MERISTEMS OF MULBERRY *MORUS ALBA* L*

FONSECA T.C.¹, VIEIRA M.L.C.² & BANDEL G.²

1. Divisao de Zootecnia Diversificada, D3, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13 460-00, Nova Odessa, Sao Paulo, Brasil.

2. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Av. Padua Dias 11, CP 13-400-970 Piracicaba, Sao Paulo, Brazil.

*A protocol for establishing apical meristems of mulberry was conceived in the aim of obtaining roots suited for cytological studies. The pre-treatments performed on the roots with 8-hydroxyquinoline, colchicine and/or cycloheximide enabled to observe the number of chromosomes, $2n = 28$ in the IZ 56/4 clone of *M. alba*.*

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is a plant developing rapidly with cross pollination. Seed propagation does not maintain the true type because of its high heterozygosity (Das, 1983). The diploid number of chromosomes for the *Morus* genus is 28, but high polyploid cells can be found. Among the polyploidies, triploidies have desirable characters such as better development of branches and leaves, higher nutritional quality and resistance to cold and diseases (Kim *et al.*, 1985). However, according to Das (1983) the production and multiplication of triploids are delayed. Generally, mulberry is multiplied through cuttings but a few genotypes with a high nutritive value have difficulties in producing roots (Jain *et al.*, 1990).

Clonal propagation following tissues culture is an alternative to vegetal multiplication of woody species offering desirable characters (Biondi and Thorpe, 1982 ; Thorpe, 1983). *In vitro* regeneration of mulberry followed by its replanting out in fields was reported for *M. alba*, *M. bombycis*, *M. nigra* and *M. indica* by Oka and Ohyama (1986) in Japan, Bapat and Rao (1990), Yadav *et al.* (1990) and Kathiravan *et al.* (1995) in India and Hossain *et al.* (1992) in Bangladesh.

The use of mulberry apical shoots and nodal buds is useful for the propagation of healthy plants and for preserving genetic resources. Seedlings of *M. alba* cv MR₂ were also obtained from hypocotyls taken on axenic cultures of seeds grown on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with BA (0.5 mg/l) and IAA (0.5 mg/l) (Kathiravan *et al.*, 1995).

Jain *et al.* (1990), while working on four different mulberry species, *M. indica*, *M. alba*, *M. rotundifolia* and *M. bombycis* observed that the response to the production of shoots varied according to the genotypes. However Saito (1992) did not record the same phenomenon while working with *M. alba* varieties.

None of the studies published on micropropagation deals with the chromosomes' stability of plants derived from this process.

A few authors recorded the presence of three giant and distinct pairs of chromosome in the set of chromosomes of *M. bombycis* (Sinoto, 1929), *M. indica* (Royan Subramanian, 1965) and *M. alba*

* Partial doctorate's work carried out at the ESALQ, Piracicaba, Brazil, with a CNPQ's grant.

(Gill and Gupta, 1979). Sinoto (1929) also reported differences between Tahara and Osawa regarding these chromosomes.

This study was undertaken in the aim of studying the formation of apical shoots in the medium of culture and for obtaining roots in order to observe the mitotic chromosomes.

MATERIALS AND METHODS

The vegetal material used for establishing the protocol of *in vitro* introduction of mulberry apical meristems was the clone IZ56/4 (Fig. 1) coming from the mulberry improvement scheme (Fonsecca *et al.*, 1994).

The plants supplying the explants were grown in a green house following the Oka and Ohshima method (1986) which judged this practice useful for obtaining clean explants, because the tissues of branches grown in fields are sometimes infested with micro-organisms which make sterilisation impossible. However, this technique did not prevent this type of contamination which maybe comes from mulberry's multiple vegetative reproductions. These contaminations can only be controlled by adding antibiotics to the medium of culture.

The explants (the apical meristems) were obtained from cuttings grown in boxes filled with sand in a green house and gathered in a container filled with distilled water. In order to develop an axenic culture, the explants were dipped in a 1% detergent solution, then rinsed with running water during 10 minutes. Disinfecting was carried out with a 2% sodium hypochlorite solution (v/v) (Table 1) during 12 minutes after being dipped in 70% alcohol (v/v) during 40 seconds. They were then carefully rinsed 5 or 6 times in sterile distilled water.

The apical meristems were then rid of superfluous leaves and cut at the tips for obtaining 2.5 cm explants containing 3 buds.

The explants were then rooted on the Murashige and Skoog (1962) medium containing half the original concentration in micro and macro elements and vitamins (MS/2) supplemented with 15 g/l of saccharose. The medium was then adjusted to a 5.8 pH with 0.1N NaOH/0.1N HCl before adding agar (0.8% p/v) and was sterilised in an autoclave at 120° C during 20 minutes. After using the autoclave, tetracycline (100 µg/ml) sterilised through filtering was added.

One week later the explants were planted out on MS/2 medium supplemented with indol-butyric acid (IBA) (0.4 ml/l) during two weeks for roots induction and then planted out in MS/2, every 2 days.

Observation of mitotic chromosomes :

The roots induced *in vitro* were collected and previously treated with mitotic spindle inhibitors (0.03% 8-hydroxyquinoline, 0.01% and 0.05% colchicine) or with a protein synthesis inhibitor (cycloheximide at 140 ppm) at various times, in order to obtain the best chromosome morphology. The roots were then fixed in Carnoy solution (ethanol:acetic acid 3:1) during 24 hours and permanently kept in 70% alcohol (v/v) at 10° C.

For staining the roots, we used the Feulgen method with a 5 minutes hydrolysis in HCl 1N at 60° C, followed with a treatment with Schiff reagent (leucobasic fuchsin) during 45 minutes. The roots were then rinsed with distilled water during 5 minutes then squashed in 2% acetic carmine. The slides judged satisfactory were separated from coverslips in 45% acetic acid and air dried before being dipped in Canadian balm.

The mitotic figures were photographed with an Olympus microscope with 1.25X optovar on a Copexpan (Agfa) film and a green Olympus filter.

RESULTS AND DISCUSSION

According to these studies, an *in vitro* protocol adapted to the apical meristems of mulberry (Table II) giving a very good production of roots (Fig.2) can be established.

During the 22 trials carried out in 1994, we lost some material due to the oxidation of the culture medium and to its contamination. This resulted in a reduction in the number of roots even in the survivors. We tested several alternatives in order to control the oxidation of the medium which seems to be the main problem regarding explants' roots survival and production.

In order to control this oxidation during the plantings out, the explants were put in a 0.1 mg/l ascorbic acid solution. However, it did not produce any positive results because the sub-cultures were contaminated. To solve this problem, we sprayed the cuttings with Dithan (2g/l) one week before and on the eve of the collection of the explants. This treatment did not produce any improvement because it proved toxic to the explants.

In 1995, twelve new trials were undertaken. For eight of them, the culture was done on MS/2 medium and for the other four on MS/2 medium supplemented with 0.01% tetracycline. Out of the eight trials on MS/2, the first 3 presented a 10% average loss due to the contamination, with an inconstant production of roots. In the three other trials, there was no formation of roots because the explants necrosed in the first few weeks, maybe because of the washing of cuttings with 1% sodium hypochlorite before the collections were made. In the last two trials, the explants were stocked in the fridge (8 °C), in order to control the production of phenolic compounds but they did not resist.

In view of these problems, we decided to work with the MS/2 medium supplemented with tetracycline; for two of the trials the medium was changed every week and for the others every 2 weeks. The percentage of contamination was on average of 26% for the first three trials and of 5% for the last one. These results are not different to those recorded in the literature by Rauber and Grunewaldt (1988), Reed (1991), Hovanesian and Torres (1986) and Dhawan and Bhojwani (1985). The production of roots was important in 2 trials with a vigorous aspect suitable for cytological studies.

In this study, the principal aim for establishing apical meristems in a culture medium was the production of roots in view of cytogenetic studies. We have encountered studies on spontaneous and easy rooting in mulberry in the literature contrary to what is normally observed in woody plants when using low concentrations of indole butyric acid (IBA), observing that high values resulted in callus at the basis of cuttings (Kim *et al.*, 1985) which we eventually noticed (Fig. 3).

However, different results can be found on the effects of auxin on mulberry rooting in the literature. Enomoto (1987) in a study on the conservation of mulberry genetic resources through the culture of tissues, during which some mulberry cultivars were grown on a medium with 0.1 mg/l beenzyladine (BA), obtained buds' rooting 10 days after changing for a medium without hormones. Jain *et al.*, (1990), however, observed that the addition of IBA (0.5 mg/l) to the medium of culture was very efficient in promoting the regeneration and the rooting of nodal explants. Ohyama (1970), Seki *et al.* (1971) only obtained the formation of roots in the medium with auxin.

In this study, we observed spontaneous formations of roots on a medium without hormones; however, these roots were thin and not suitable for cylogical studies. Similar results were obtained by Hossain *et al.*, (1992) with *M. laevigata*, with a satisfactory formation of roots in the medium supplemented with IBA and the presence of weak, thin, and not numerous roots on the medium without auxin. They therefore concluded to the necessity for auxin for an efficient rooting in this species. While working also with *M. laevigata*, Islan *et al.*, (1993) recorded that the medium supplemented with auxins improves the frequency of rooting and the number of roots per cutting; similarly, the increase in the number of subcultures contributed to rooting by increasing the frequency from 43% for the original culture to 88% for the fifth subculture, the number of cuttings obtained increasing respectively from 5.6 to 13.20%.

Perez *et al.*, (1985) observed that the buds from *Corylus avellana*, a fruit tree of great economic importance well developed in Spain, did not supply roots with IBA, whereas the contrary was observed on mulberry in this present study, where rooting was observed even for the medium with auxin.

In our study, most of the shoots began to root after replacing the medium containing IBA with the medium with auxin, i.e. 15 to 20 days after the inoculation.

Despite the different pretreatments carried out on the roots, they did not give any demonstrative results but eventual occurrences of regular metaphases for observing the morphology of chromosomes.

This difficulty might not result from the lack of efficiency of the mitotic spindle or the proteins synthesis inhibitors but maybe from permeability problems in the roots, which would warrant more extensive researches.

In studies carried out on some cells derived from the roots, the number of chromosomes $2n = 28$ (Fig. 4) could be verified, which confirms the basic number $n = 14$ of the first reports established by Tahara in 1909 (Sinoto, 1929) and confirmed by studies on mulberry for instance on *M. alba* by Gill et Gupta (1979), on *M. indica* by Royan-Subramanian (1965), on *M. nigra* by Basavaiah et al, (1990) and on a few other species by Susheelama et al.

CHROMOSOMAL VARIABILITY IN LONG-TERM CALLUS CULTURE OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

S.P. CHAKRABORTI, P. NARAYAN, K. VIJAYAN, B.N. ROY, S.M.H. QADRI & B. SARATCHANDRA

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

*Chromosomal variation in long-term culture from internodal calluses of a diploid mulberry (*Morus alba* L., $2n = 28$) were examined through 12 subculture generations at an interval of 30 days. Change in ploidy was not found till the second passage of culture. Tetraploid and aneuploid cells appeared in culture from the third passage. The percentage of diploid cells decreased with increasing age of culture. Tetraploids occurred in higher frequencies than aneuploids and their population was over 50% at the end of 10 culture generations and it was more or less stable during the 12th passage. These observations are suggestive of chromosomal variability in prolonged callus culture.*

Keywords: Chromosomal variability, callus, long-term, mulberry.

INTRODUCTION

Numerical as well as structural changes in the genome are known to occur in cultured cells (Kunakh, 1974; Sunderland, 1977). The most common changes in cultured cells are increase in ploidy levels due to chromosome doubling (Sacristan, 1971; Collins *et al.*, 1972; Novak, 1981). However, in some plant species, chromosomal change is a repeated doubling of a basic set of chromosomes reaching a level of higher polyploidy (Partanen, 1965b), while in other cases ploidal change is restricted to a particular level (tetraploid or hexaploid) occupying a model class replacing or suppressing the original basic number. Such changes are of immense importance in crop improvement, particularly in horticultural crop plants and other economically important perennial crops. *Morus alba* L., a perennial food plant of the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.), has so far not been studied to examine the chromosomal changes in long-term callus cultures. An effort therefore has been made to study and investigate the details of polyploidy and model class of polyploid cells that appeared at subculture generations in internodal callus of mulberry (*Morus alba* var. S1) for its further exploitation in polyploid breeding to develop qualitatively superior high-yielding mulberry varieties.

MATERIALS AND METHODS

Callus tissues were derived from tender internodal segments of *Morus alba* var. S1. Before culture, the explants were surface-sterilised in 0.1% mercuric chloride solution for 5 minutes followed by soaking in 70% ethanol for 20 seconds. Washed explants were cultured on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1.0 ppm 2, 4-D and 0.5 ppm BAP for induction of callus. Cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under white fluorescent light (2500 lux). Callus tissues were maintained on the same medium and subcultured after every 30 days (Narayan *et al.*, 1989).

Cytological studies were carried out from samples of each passage harvested during the growth phase (8-10 days after transfer on fresh medium). Callus tissues were fixed overnight in an acetic-ethanol mixture (1:3) and stained with 2% orcein. More than 1200 dividing cells were studied.

acetic-ethanol mixture (1:3) and stained with 2% orcein. More than 1200 dividing cells were studied. Metaphase plates were counted for each sample. Somatic chromosomes of mother plant were also studied from leaf tip preparations.

RESULTS

Cell types and division in callus tissues:

Two distinct cell types were identified: one with small isodiametric parenchymatous cells which took part in the division (Fig. 2) and the other with rectangular vacuolated giant cells which did not divide.

Table I. Ploidy and percentage of variation at different passages.

Tableau I. Ploïdie et pourcentage de variation en fonction du nombre de repiquages.

No. of subcultures	Total no. metaphase plates	No. of diploid cells	% of diploid cells	No. of tetraploid cells	% of tetraploid cells	No. of aneuploid cells	% of aneuploid cells
<i>Nombre de repiquages</i>	<i>Nombre de plaques métaphasiques</i>	<i>Nombre de cellules diploïdes</i>	<i>Pourcentage de cellules diploïdes</i>	<i>Nombre de cellules tétraploïdes</i>	<i>Pourcentage de cellules tétraploïdes</i>	<i>Nombre de cellules aneuploïdes</i>	<i>Pourcentage de cellules aneuploïdes</i>
I	130.00	130.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
II	105.00	105.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
III	112.00	93.00	83.00	15.00	13.39	4.00	3.57
IV	120.00	81.00	67.00	35.00	29.17	4.00	3.33
V	98.00	52.00	53.06	38.00	38.78	8.00	8.16
VI	76.00	35.00	46.05	36.00	47.37	5.00	6.58
VII	115.00	54.00	46.00	48.00	41.74	13.00	11.30
VIII	125.00	55.00	44.00	58.00	46.40	12.00	9.60
IX	85.00	34.00	40.00	41.00	48.24	10.00	11.76
X	72.00	29.00	40.28	37.00	51.39	6.00	8.33
XI	105.00	40.00	38.10	52.00	49.52	13.00	12.38
XII	65.00	24.00	36.92	32.00	49.23	9.00	13.85

Cell division initiated from 7-8 days after subculture and continued till the 22nd day. The highest

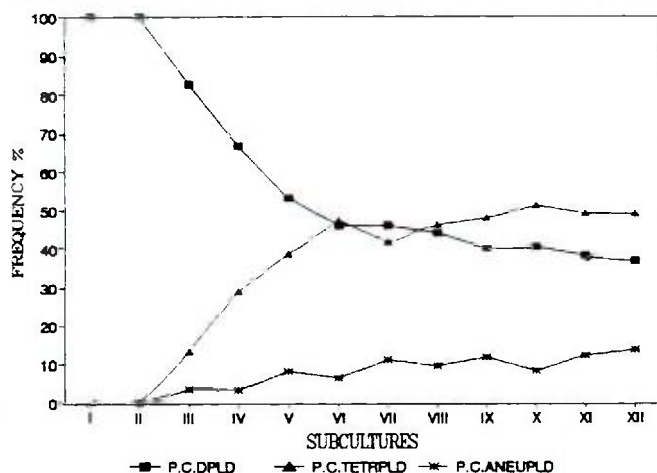


Fig. 1: Frequency of chromosome classes in callus at different passages.

Fig. 1 : Fréquence des catégories chromosomiques dans le cal en fonction du nombre de repiquages.

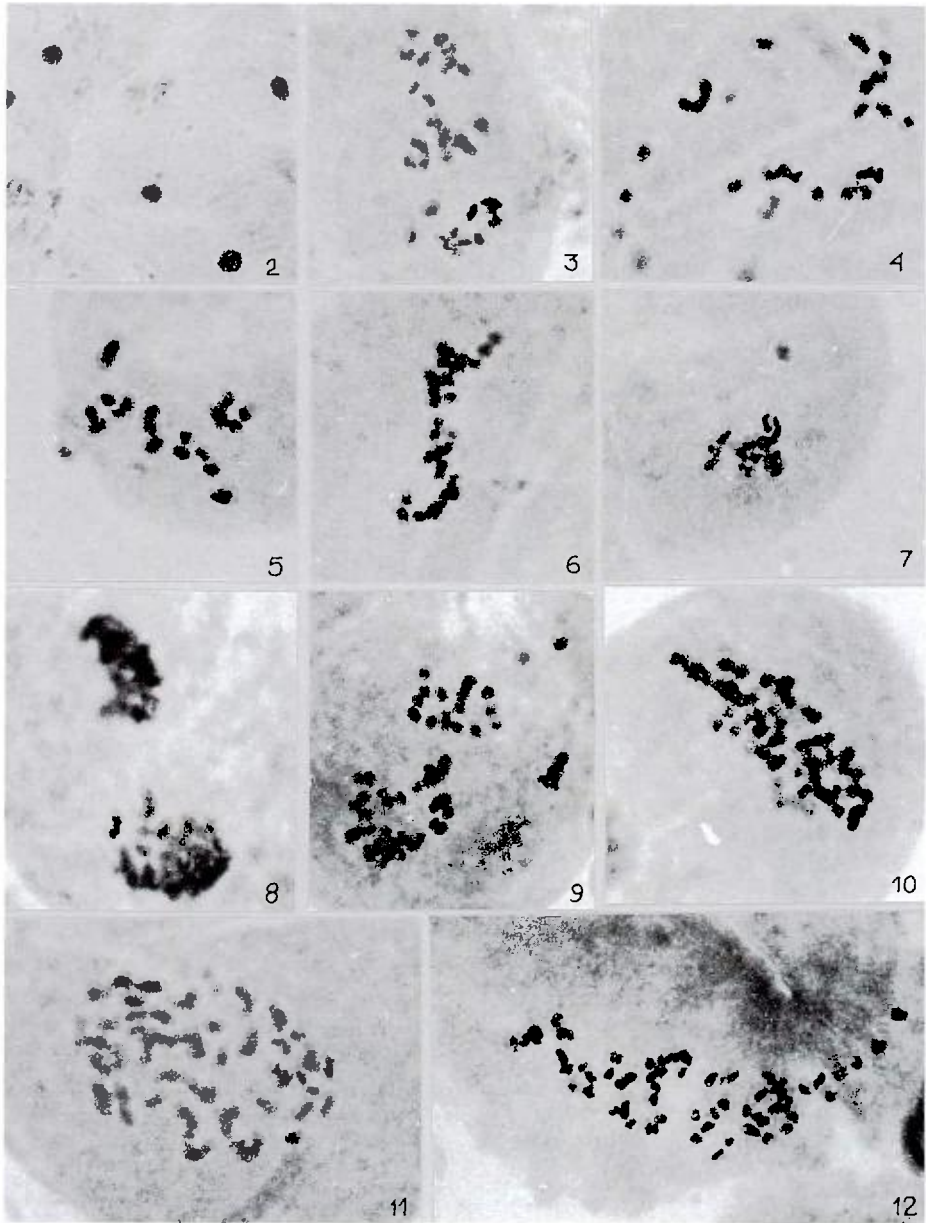


Fig. 2-12: Callus cells with different chromosome numbers ($\times 1400$). 2: Parenchyma cells in callus tissues. 3-4: Cells with diploid chromosomes ($2n = 28$). 5-6: Cells with aneuploid chromosomes ($2n < 28$). 7: Cell with micronucleus. 8: Telophase showing the absence of laggarids or bridges. 9-12: Tetraploid cells with 56 chromosomes.

Fig. 2-12 : Cellules de cals présentant des nombres de chromosomes variables ($\times 1400$). 2 : Cellules parenchymateuses. 3-4 : Cellules présentant des chromosomes diploïdes ($2n = 28$). 5-6 : Cellules présentant des chromosomes aneuploïdes ($2n < 28$). 7 : Cellule avec micronoyau. 8 : Téliophase montrant l'absence de chromosome retardataire et de pont. 9 : Cellules tétraploïdes possédant 56 chromosomes.

mitotic index (6.76%) was recorded during the 15th to 18th days of culture, which decreased gradually to 3.24% at the end of each subculture generation. In the case of the mother plant, leaf tip preparations did not show any variability, confirming its diploid nature.

Frequency of different chromosome classes in callus cells:

Chromosome numbers were analysed from samples of each passage up to the 12th passage (360 days). A sharp numerical change was observed from the third subculture. Till the second passage (i.e., up to 60 days), the calluses remained diploid ($2n = 28$) (Fig. 3). The percentage of diploid cells abruptly decreased to 46% at the end of the sixth passage. The rate of decrease of diploid cells was not equivalently proportional in further advanced passages and, on the contrary, a modal percentage (36.92) continued even at the 12th passage of culture (Table I). Aneuploid (< 28) (Fig. 5) and tetraploid cells ($2n = 56$) (Fig. 12) appeared from the third passage.

The frequency of aneuploid cells was low, ranging from 3.57% to 13.39% as compared to tetraploid (13.39%-51.39%) (Table I). Tetraploidy increased proportionally with the increasing age of culture and reached maximum (51.39%) at the tenth subculture generation (Fig. 1). Besides numerical changes, formation of micronuclei was also common in advanced culture generations (Fig. 7).

DISCUSSION

Chromosomal variations in culture cells, especially in callus, has been established in a number of plant species (Bayliss, 1973; Constantin, 1982; Novak, 1981; Tawaley *et al.*, 1992). The most striking feature recorded from the callus of this tree species is that numerical change of chromosomes initiated from the third passage onwards, leaving a complete homogeneity of diploid cells up to the second passage. This observation draws parallelism to the findings of Demoise and Partanen (1969) in garden *Paeonia* and also indicates non-existence of somatic polyploidy (Novak, 1974; D'Amato, 1975) in explants which would have been a source of pre-existing polyploid cells to start division under *in vitro* conditions.

The callus samples from the third passage onwards showed a progressive decrease in diploid cells and recorded an increase in polyploid cells with the advancement of culture generations. Such a rapid chromosomal change was recorded by Shimada (1971) in tobacco and Novak (1981) in *Allium sativum*. Another important observation in this variety of mulberry was the absence of chromosome doubling beyond tetraploidy. This phenomenon is similar to the findings of Ogihara (1982) in *Haworthia setata* (Liliaceae).

As to the origin of polyploid cells from the third passage, the mechanism involved was endoduplication. The physical conditions of culture medium and age of culture might be causes of endoreduplication as also reported by Demoise and Partanen (1969) and Singh and Harvey (1975).

With the increase in the number of tetraploids, $4n$ populations seemed to have suppressed diploid division and, as a result, a low percentage of diploid cells prevailed in advanced passages. However, the predominance of tetraploids and absence of hyper-tetraploids might be due to the metabolic inhibitory activity of the polyploid nucleus towards cell division which was evidenced by the low mitotic index in advanced subculture generations. It also complemented in prolonged stability of tetraploids spreading from the 4th to 12th passage. Bayliss and Gould (1974), Mar'yakhina and Butanko (1974) and Yamane (1975) suggested that polyploids originated in callus generally revert to the original diploid status through chromosome elimination, resulting in formation of micronuclei and aneuploid cells. This phenomenon was also found in the present study. It was, however, not stable and ranged from 3.33% to 13.85%, the highest being in the most advanced passage. The polyploid cells thus appeared in long-term culture can be isolated through cell cloning and new genotypes can be recovered as a whole plant (Nishi and Mitsuoka, 1969; Orton, 1980).

REFERENCES

- BAYLISS M.W. (1973) Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature*, 246, 529-530.
- BAYLISS M.W., GOULD A.R. (1974) Studies on the growth in culture of plant cells. XVIII. Nuclear cytology of *Acerpseido platanus* suspension culture. *J. Exp. Bot.*, 25, 772-783.
- COLLINS G.B., LEGG P.D., KASPERBAUER M.J. (1972) Chromosome numbers in anther derived haploids of two *Nicotiana* species. *J. Heredity*, 63, 113-118.
- CONSTANTIN M.J. (1981) Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. *Environ. Exp. Bot.*, 21, 359-368.
- D'AMATO F. (1975) The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. *In Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. International Biological Programme. Vol. 2, Cambridge University Press, pp. 333-348.
- DEMOISE C.F., PARTANEN C.R. (1969) Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behaviour of a plant tissue culture. *Am. J. Bot.*, 56, 147-152.
- KUNAKH V.A. (1974) Relationship between ploidy and spontaneous organogenesis in *Crepis capillaris* and *Haplopappus gracilis* strains. *Cytology Genet.*, 8, 312-315.
- MAR'YAKHINA I.YA., BUTENKO R.G. (1974) Somatic reduction in cabbage tissue culture. *Cytology Genet.*, 8, 74-77.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- NARAYAN P., CHAKROBORTI S., SUBBA RAO G. (1989) Regeneration of plantlets from callus of stem segments of mature plants of *Morus alba* L. *Proc. Indian Nation. Sci. Acad.*, B 55, Nos. 5 and 6, 469-472.
- NISHI T., MITSUOKA S. (1969) Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of plant. *Japan J. Genet.*, 44, 341-346.
- NOVAK F.J. (1974) The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. *Caryologia*, 27, 44-54.
- NOVAK F.J. (1981) Chromosomal characteristics of long term callus cultures of *Allium sativum* L. *Cytologia*, 46, 371-379.
- OGIHARA Y. (1982) Tissue culture in *Haworthia*. V. Characterization of chromosomal changes in cultured callus cells. *Japan J. Genet.*, 57, 499-511.
- ORTON T.J. (1980) Chromosomal variability in tissue culture and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet.*, 56, 102-112.
- SACRISTAN M.D. (1971) Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants in *Crepis capillaris* L. *Chromosoma*, 33, 273-283.
- SHARP W.R., CALDAS L.S., CROCOMO O.J., MONACO L.C., CARVALHO A. (1973) Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton*, 31, 67-74.
- SHIMADA T., SASAKUMA T., TSUNEWAKI K. (1969) *In vitro* culture of wheat tissue. 1. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture. *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 294-304.
- SHIMADA T. (1971) Chromosome constitution of tobacco and wheat callus. *Japan J. Genet.*, 46, 235-241.
- SINGH B.D., HARVEY B.L. (1975) Cytogenetic studies on *Haplopappus gracilis* cells cultured on agar and liquid media. *Cytologia*, 40, 347-354.
- SUNDERLAND N. (1977) Nuclear cytology. *In Plant Tissue and Cell Culture*. Street H.E. ed., Blackwell Scientific Publ., Oxford, pp. 177-205.
- TAWALEY, MEENAKSHI, SUHAVANI A.K., REDDY G.M. (1992) Chromosomal instability in callus culture of wild and cultivated genotypes of *Cicer*. *Indian J. Exp. Biol.*, 30, 628-631.
- YAMANE Y. (1975) Chromosomal variation in callus induced in *Vicia faba* and *Allium cepa*. *Japan J. Genet.*, 50, 353-355.

VARIABILITE CHROMOSOMIQUE DANS LES CULTURES PROLONGEES DE CALS DE MURIER (*MORUS ALBA* L.)

S. P. CHAKRABORTI, P. NARAYAN, K. VIJAYAN, B.N ROY, S.M.H. QADRI & B. SARATCHANDRA

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

*La variation chromosomique des cultures à long terme de cals internodaux de mûrier diploïde (*Morus alba* L., $2n = 28$) a été examinée au cours de 12 générations de sous cultures à un intervalle de 30 jours. Le changement de ploïdie n'est pas observé avant le deuxième passage de culture. Les cellules tétraploïdes et aneuploïdes apparaissent dans la culture à partir du troisième passage. Le pourcentage de cellules diploïdes baisse au fur et à mesure que la culture vieillit. Les tétraploïdes apparaissent à des fréquences plus élevées que les aneuploïdes et leur population est supérieure à 50 % au bout de 10 passages et elle est plus ou moins stable au 12ème passage. Ces observations montrent une variabilité chromosomique dans la culture prolongée de cals.*

INTRODUCTION

On sait qu'il se produit des changements numériques et structuraux du génome dans les cellules cultivées (Kunakh, 1974 ; Sunderland, 1977). Les changements les plus courants dans les cellules cultivées sont l'augmentation du niveau de ploïdie due au doublement des chromosomes (Saeed, 1971 ; Collins et coll., 1972 ; Novak, 1981). Cependant, chez certaines espèces de plantes le changement chromosomique consiste en un doublement répété d'un lot de chromosomes de base atteignant un niveau de polyploïdie plus élevé (Partanen, 1965b), tandis que dans d'autres cas le changement de ploïdie se limite à un niveau particulier (tétraploïde ou hexaploïde) donnant une classe modèle remplaçant ou supprimant le nombre originel. De tels changements sont d'une importance considérable pour l'amélioration des plantes, particulièrement pour les plantes d'horticulture et d'autres cultures vivaces importantes sur le plan économique. Jusqu'à présent, *Morus alba* L., plante vivace nourricière du ver à soie mûrier (*Bombyx mori* L.), n'a pas été étudié en vue d'examiner les changements chromosomiques dans les cultures de cals à long terme. Ce travail a donc été entrepris pour étudier et examiner les particularités de la polyploïdie et de la classe modèle des cellules polyploïdes qui apparaissent dans le cal internodal de mûrier (*Morus alba* var. S₁) dans les sous-cultures, en vue d'une exploitation future pour la culture polyploïde, permettant la mise au point de variétés de mûrier à haut rendement de qualité supérieure.

MATERIELS ET METHODES

Des cals ont été obtenus à partir des segments internodaux tendres de *Morus alba* var. S₁. Avant la culture, les explants sont stérilisés en surface dans une solution à 0,1 % de chlorure de mercure pendant 5 minutes puis trempés dans de l'éthanol à 70 % pendant 20 secondes. Les explants nettoyés sont cultivés sur un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 1,0 ppm de 2, 4-D et 0,5 ppm BAP pour l'induction des cals.

Les cultures sont maintenues à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ sous lumière blanche fluorescente (2500 lux). Les tissus sont maintenus sur le même milieu et mis en sous-cultures tous les 30 jours (Narayan et coll., 1989).

Des études cytologiques sont menées sur des échantillons de chaque passage recueilli pendant la phase de croissance (8-10 jours après le transfert sur le milieu frais). Les cals sont fixés pendant la nuit dans un mélange d'acide acétique-éthanol (1:3) et colorés avec 2 % d'orcéine. Plus de 1200 cellules en division sont étudiées. Les plaques métaphasiques sont comptées pour chaque échantillon. Les chromosomes somatiques de chaque plant mère sont aussi étudiés à partir de prélèvements sur la pointe de la feuille.

RESULTATS

Types de cellules et division dans les cals :

On identifie deux types distincts de tissus : l'un avec de petites cellules parenchymateuses isodiamétriques qui participent à la division (Fig. 2) et l'autre avec des cellules rectangulaires vacuolisées qui ne se divisent pas. La division des cellules commence 7-8 jours après la sous-culture et continue jusqu'au 22ème jour. L'indice mitotique le plus élevé (6,76 %) enregistré du 15ème au 18ème jour de culture, baisse progressivement jusqu'à atteindre 3,24 % à la fin de chaque génération sous-cultivée. Dans le cas du plant mère, les prélèvements sur la pointe de la feuille ne montrent pas de variabilité, ce qui confirme sa nature diploïde.

Fréquence de différentes classes de chromosomes dans les cellules :

Les nombres de chromosomes sont analysés à partir d'échantillons provenant de chaque passage jusqu'au 12ème passage (360 jours). On observe un changement numérique prononcé à partir de la troisième sous-culture. Les cals demeurent diploïdes jusqu'au deuxième passage (c'est à dire jusqu'à 60 jours) ($2n = 28$) (Fig. 3). Le pourcentage de cellules diploïdes baisse soudainement, atteignant 46 % à la fin du sixième passage. Le taux de diminution des cellules diploïdes n'est pas proportionnel de manière équivalente pour les passages ultérieurs suivants et, au contraire, un pourcentage « type » (36,92) continue même au 12ème passage (Tableau I). Les cellules aneuploïdes (< 28) (Fig. 5) et tétraploïdes ($2n = 56$) (Fig. 12) apparaissent à partir du troisième passage.

La fréquence des cellules aneuploïdes est faible, comprise entre 3,57 % et 13,39 % par rapport aux tétraploïdes (13,39 % - 51,39 %) (Tableau I). La tétraploïdie augmente proportionnellement à l'âge de la culture et atteint son maximum (51,39 %) à la dixième génération de sous culture (Fig. 1). En plus des changements numériques, la formation de micronoyaux est également courante dans les cultures ultérieures (Fig. 7).

DISCUSSION

Les variations chromosomiques des cellules en culture, surtout des cals, ont été établies chez un certain nombre d'espèces (Bayliss, 1973 ; Constantin, 1982 ; Novak, 1981 ; Tawaley et coll, 1992). Le fait le plus frappant concernant le cal de cette espèce d'arbres est que le changement numérique commence à partir du troisième passage, ce qui laisse une homogénéité complète des cellules diploïdes jusqu'au deuxième passage. Cette observation est comparable aux observations de Demoise et Partanen (1969) sur le *Paonia* de jardin et indique aussi la non existence d'une polyploïdie somatique (Novak, 1974 ; D'Amato, 1975) dans les explants qui auraient été une source de cellules polyploïdes préexistantes pour commencer la division dans des conditions *in vitro*.

Les échantillons de cals montrent à partir du troisième passage une diminution progressive du nombre de cellules diploïdes et une augmentation des cellules polyploïdes au fur et à mesure que l'on progresse dans les générations. Un changement chromosomique aussi rapide a été enregistré par Shimada (1971) pour le tabac et par Novak (1981) pour *Allium sativum*. Une autre observation importante pour cette variété de murier consiste en l'absence de doublement de chromosomes au-delà de la tétraploïdie. Cette observation est similaire à celle de Ogihara (1982) pour *Hawarthia setata* (Liliaceae).

En ce qui concerne les origines des cellules polyploïdes à partir du troisième passage, le mécanisme en jeu est l'endoduplication. Les conditions physiques du milieu de culture et l'âge de la culture peuvent être les causes de l'endoduplication comme l'ont rapporté Demoise et Partanen (1969) et Singh et Harvey (1975).

Les populations $4n$, avec l'augmentation du nombre de tétraploïdes, semblent avoir supprimer la division diploïde et, par conséquent, il ne demeure qu'un faible pourcentage de cellules diploïdes aux passages ultérieurs. Cependant, la prédominance des tétraploïdes et l'absence d'hyper-tétraploïdes peuvent être due à l'activité métabolique inhibitrice du noyau polyploïde par rapport à la division cellulaire, ce que prouve le faible indice mitotique dans les sous-cultures ultérieures. Il contribue aussi à la stabilité prolongée des tétraploïdes qui s'étend du 4^{ème} au 12^{ème} passage. Bayliss et Gould (1974), Mar'yakhina et Butanko (1974) et Yamane (1975) ont suggéré que les polyploïdes provenant du cal reviennent en général à leur statut diploïde originel par l'élimination des chromosomes, ce qui entraîne la formation de micronoyaux et de cellules aneuploïdes. Ce phénomène a aussi été observé dans cette étude. Il n'est cependant pas stable et est compris entre 3.33 % et 13.85 %, le chiffre le plus élevé correspondant au passage le plus ultérieur. Les cellules polyploïdes qui apparaissent ainsi dans la culture à long terme peuvent être isolées par le clonage des cellules et de nouveaux génotypes peuvent être ainsi obtenus en tant que plante entière (Nishi et Mituoka, 1969 ; Orton, 1980).

GROWTH OF INDIAN SERICULTURE - AN OVERVIEW

P.K. SAHU*, K. K. DAS & N.K. DAS

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

Sericulture is one of those small and cottage industries which can earn a huge amount of foreign exchange every year. It can play a vital role in India's rural reconstruction program. Though all the four types of silk are produced in India, mulberry plays the pivotal role. Growth and development of different trade indicators for the mulberry sector are studied to focus on the overall progress in sericulture in India from 1970-71 to 1993-94. Analysis revealed that though the country has experienced an all-round development in different sectors of sericultural industry, the growth in productivity is too slow coupled with a very high growth rate in import of raw silk. A serious and fruitful thought for betterment of quality as well as productivity is warranted.

Keywords : Mulberry sericulture, trend analysis, growth.

INTRODUCTION

Agriculture constitutes the backbone of Indian economy. About 70 per cent of her population is either directly or indirectly dependent on agriculture for their daily livelihood. But, at present, the country is passing through a discernible economic situation with foreign debt increasing by 'leaps and bounds' every year. The overall industrial progress requires to have further momentum so that it can occupy a respectable position in foreign markets to meet up the balance of payment (BOP) situation. There is a crying need to develop/revamp small and cottage industries which can earn foreign exchange. No doubt sericulture is one of these. Being a labour intensive, low initial investment oriented industry, it can play a vital role in rural reconstruction programs in the country.

Though India is the only country where all the four types of silk can be produced, its performance in the global silk market is not up to the mark at all. It contributes only 15.73 per cent of the total raw silk production in the world. The industry is lagging far behind its competing countries (i.e., China and others) either in terms of quality and quantity or both. Among the four different types of silk, more than 92 per cent comes from mulberry silk (out of total 14,533 MT of raw silk produced during 1993-94, only 1,141 MT is from non-mulberry silk category). This clearly shows the position of mulberry in total silk industry in India. Any critical analysis in regard to the performance of Indian silk industry will ultimately aim at the analysis of performance of mulberry silk industry in the country. Keeping this in mind, an attempt is made to study critically the growth of Indian mulberry silk industry (henceforth, Indian silk industry).

METHODOLOGY

The present study is based on secondary data for the period 1970-71 to 1993-94. Time series data relating to area under mulberry, total production, export of silk goods in quantity, export value at current price and actual value of export at 1970-71 price, import in quantity (tonnes), import as

* Communication to be made.

percentage to total domestic production are culled from various issues of 'Silk in India: Statistical Biennial', published by Central Silk Board, Ministry of Textile, Government of India. To estimate the growth rates of different parameters, a linear model of the type $Y_t = a + bt$ has been fitted using Ordinary Least Square (OLS) technique (Gupta and Kapoor, 1984). But before that, test of randomness is performed to have an idea about the nature of each and every series of data.

Test of randomness is a non parametric test known as test of 'turning points'. The process is to count 'peaks' and 'troughs' in the series. A 'peak' is a value greater than its two neighbouring values and 'trough' is a value which is less than its two neighbouring values. Both the 'peaks' and 'troughs' are treated as turning points. That means, at least three consecutive observations should be there to define a turning point. Let U_1, U_2, U_3 be three observations. If the series is random, these three values could have occurred in any order i.e., in six ways. But only in four (out of six) ways would there be turning points. Hence the probability of turning points in a set of three values is $2/3$.

Let $U_1, U_2, U_3, \dots, U_n$ be a set of observations and let us define a marker variable such that

$$X_i = 1 \text{ when } \begin{matrix} U_i < U_{i+1} > U_{i+2} \\ U_i > U_{i+1} < U_{i+2} \end{matrix}$$

$$= 0 \text{ Otherwise, } \forall, i = 1, 2, 3, \dots, n-2.$$

$$\Rightarrow \text{No. of turning points (p)} = \sum_{i=1}^{n-2} X_i$$

$$\Rightarrow \text{Expectation of p, } E(p) = E\left(\sum_{i=1}^{n-2} X_i\right)$$

$$= 2/3(n-2) \quad \text{and}$$

$$E(p^2) = E\left(\sum_{i=1}^{n-2} X_i\right)^2$$

$$= \frac{40n^2 - 144n + 131}{90}$$

$$\Rightarrow \text{The variance of p, } V(p) = E(p^2) - \{E(p)\}^2$$

$$= \frac{16n - 29}{90}$$

As the number of observation 'n' increases the distribution of 'p' tends to normality. Thus for testing null hypothesis, H_0 (series is random) we have the statistic

$$\tau = \frac{p - E(p)}{\sigma_p} \sim N(0,1)$$

Where, σ_p is the standard deviation of p.

RESULTS AND DISCUSSION

The study of randomness (Table-II) shows that all the series have a definite trend (and hence, not random in nature) excepting the percentage of import to total domestic production. To ascertain the nature of this particular series, two years' total of import as percentage to total production of raw silk is taken into consideration which clearly indicates the random behaviour of the series once again. Actually, randomness is more pronounced in the later half (1982-83 to 1993-94) for this series (Table I) and hence no trend equation is fitted.

Time series analysis reveals positive simple and compound growth rate for all the growth indicators (Table-III). Total area under mulberry increased to 3,42,000 ha in 1993-94 from only 98,248 ha in 1970-71 (registering a simple growth of 248.10 per cent and compound growth of 5.318 per cent per annum). Corresponding higher figures for total production of raw silk speaks about the overall growth in the productivity sector.

India has registered a considerable progress in export of silk product during the said period both in quantity and value (compound growth rates per annum are 9.23 per cent, 11.95 per cent and 14.69

Table I. Index for abstract statistics of mulberry sericulture in India.

Tableau I. Indices de statistiques résumées pour la sériciculture mûrier en Inde;

Year	Area	Production	Import (Quantity)	Import as percentage to total production	Export (Quantity)	Export (Value at current price)	Export (Value at 1970-71 price)
<i>Année</i>	<i>Surface</i>	<i>Production</i>	<i>Quantités Importées</i>	<i>Pourcentage des Importations par rapport à la production</i>	<i>Exportations (quantité)</i>	<i>Exportations (valeur aux prix actuels)</i>	<i>Exportations (valeur aux prix de 1970-71)</i>
1970	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1971	106.76	90.61	78.13	86.09	49.23	48.35	43.29
1972	109.33	98.10	25.00	25.40	49.84	51.48	46.09
1973	112.12	107.22	40.63	38.10	63.13	78.07	61.28
1974	122.95	107.79	62.50	57.86	59.65	89.14	57.03
1975	127.14	112.53	165.63	147.48	63.22	105.96	70.50
1976	127.28	118.95	118.75	99.49	75.83	145.34	96.51
1977	133.43	141.10	371.88	263.90	112.47	223.79	131.95
1978	143.14	166.16	475.00	285.78	126.36	284.79	161.26
1979	157.93	185.70	1118.75	602.6	116.85	339.13	172.15
1980	173.03	203.41	987.50	485.47	139.40	385.33	183.32
1981	183.16	212.62	1571.88	739.50	156.92	505.52	228.85
1982	200.36	230.91	3059.38	1325.16	154.90	591.02	257.98
1983	210.60	251.59	4265.63	1695.62	156.77	708.31	290.17
1984	218.67	305.36	3046.88	997.75	181.28	928.45	341.59
1985	221.72	311.29	5081.25	1632.11	220.60	1220.20	432.23
1986	233.86	350.09	5250.00	1499.45	285.42	1553.07	581.02
1987	245.91	374.45	5553.13	1483.22	382.22	1949.01	669.76
1988	272.84	428.83	3725.00	868.62	425.91	3107.98	967.92
1989	299.49	482.95	4237.50	877.42	431.23	4396.22	1375.95
1990	318.69	508.72	4237.50	832.97	387.98	3439.32	967.03
1991	336.80	472.01	6431.25	1362.52	465.17	5333.47	1383.49
1992	345.05	575.73	8834.38	1534.46	505.77	6052.83	1451.39
1993	348.10	593.09	15159.38	2555.99	546.38	6108.40	1366.88

*** Year refers to financial year / Les années correspondent aux années financières.*

Table II. Test of randomness for different parameters.

Tableau II. Test aléatoire pour les différents paramètres.

Parameter	No. of turning points (p)	No. of Obs.	E(p)	Op	τ
<i>Paramètre</i>	<i>Nombre de points critiques (p)</i>	<i>Nombre d'observations</i>			
Area / Surface	0	24	14.67	1.99	7.39**
Production	3	24	14.67	1.99	5.88**
Export (quantity)	9	24	14.67	1.99	2.85**
<i>Quantité exportée</i>					
Export (Value at current price)	2	24	14.67	1.99	6.38**
<i>Exportations (Valeur aux prix actuels)</i>					
Export (Value at 1970-71 price)	6	24	14.67	1.99	4.36**
<i>Exportations (Valeurs aux prix de 1970-71)</i>					
Import (Quantity) / <i>Importations (Quantité)</i>	9	24	14.67	1.99	2.85**
Import (percentage to total production)	11	24	14.67	1.99	1.85NS
<i>Importations (pourcentage par rapport à la production totale)</i>					
Import (percentage to total production)	5	12	6.67	1.35	1.24NS
<i>Importations (pourcentage par rapport à la production totale)</i>					

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

per cent for quantity of export, value of export at current price and value of export at 1970-71 price respectively). Higher values of compound as well as simple growth rate for value of export at 1970-71 price than that of quantity of goods exported indicates a 'real' progress in export sector. This implies the growing demand of Indian silk in foreign market. But what is alarming is that of simultaneous increase in import of raw silk (which has registered a record 15059.38 per cent increase from mere 32 tonnes in 1970-71 to as much as 4,851 tonnes in 1993-94) with a compound growth rate of 13.13 per cent per annum. Different factors like insufficient production to meet the domestic demand of raw silk, availability of better quality of raw silk at a cheaper rate in the foreign market, bilateral trade pact among the countries etc. might have influenced the increasing import of raw silk to India. Among these the improvement of quantity as well as quality at a lower cost required to be emphasised from sericultural research point of view. Though Indian silk is observed to have a positive growth rate in respect of productivity, the progress is too low compared to its main competing country, China (productivity of China was 991.97 kg of cocoon per ha against India's 372.62 kg of cocoon per ha in 1990-91). The increase in productivity will be helpful in reducing the unit cost of production which in turn will make it possible to sell Indian silk at a relatively low rate and in capturing more of foreign markets. That is why, a serious and fruitful thought in breeding programmes and post cocoon technology programme is warranted.

Table III. Time series analysis of different parameters.

Tableau III. Analyse de séries séquentielles de différents paramètres.

Parameters	Trend equations	R ²	Simple growth	Compound growth rate (per cent per annum)
<i>Paramètres</i>	<i>Equations de tendance</i>		<i>Croissance simple (%)</i>	<i>Taux de croissance composée (% par an)</i>
Area / Surface	$Y_t = 202.01 + 10.74t$ (17.35) (0.48)	0.96**	248.10	5.32
Production	$Y_t = 272.05 + 21.12t$ (43.59) (1.21)	0.93**	493.09	7.76
Import (Quantity) <i>Importations (quantité)</i>	$Y_t = 3083.20 + 404.95t$ (1952.40) (54.15)	0.72**	15059.38	13.13
Export (Quantity) <i>Exportations (Quantité)</i>	$Y_t = 219.02 + 20.21t$ (61.24) (1.70)	0.87**	446.38	9.23
Export (Value at current price) <i>Exportations (Valeur aux prix actuels)</i>	$Y_t = 1572.72 + 231.08t$ (1056.49) (29.30)	0.74**	6008.40	14.69
Export (Value at 1970-71 price) <i>Exportations (Valeur aux prix de 1970-71)</i>	$Y_t = 476.57 + 58.90t$ (226.44) (6.28)	0.80*	1366.88	12.35

** - Significant at 1% level. / *Significatif au seuil de 1%.*
 - Figures in parentheses indicate standard error of the coefficients. / *Les chiffres entre parenthèses indiquent les écarts type des coefficients.*
 τ - (Year 1981-85) / *(Année -1981.85)*

Compound growth rate = $b/Y_t (\text{Obs.}) \times 100$, where, Y_t is the mean of observed Y_{tS} .
Taux de croissance des composés = $b/Y_t \text{ Obs.} \times 100$, où, Y_t est la moyenne des Y_{tS} observés.

Simple Growth = $\frac{\text{Value (last year - first year)}}{\text{Value (first year)}} \times 100$

Croissance simple = $\frac{\text{Valeur (dernière année - première année)}}{\text{Valeur (première année)}} \times 100$

CONCLUSION

'Horizontal' growth that is, expansion of area under mulberry silk will be far from reality in the near future is a ground truth. So, the only way to increase the present production situation is to go for 'vertical' growth i.e., increase in productivity. Attempts are to be made to improve both the quality as well as the quantity of raw silk with lesser unit cost of production so that Indian silk can compete

in foreign markets without depending much on imported raw silk and utilise the vast human resource potential in a better way.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1988) Silk in India: Statistical Biennial. Central Silk Board, Bangalore, India
- ANONYMOUS (1989) Indian Labour Journal. Labour Bureau, Controller of Publications, Civil Lines, Delhi, 30(12).
- ANONYMOUS (1992) Silk in India: Statistical Biennial. Central Silk Board, Bangalore, India.
- ANONYMOUS (1992-93) Annual Report. Central Silk Board, Bangalore, India.
- ANONYMOUS (1993-94) Annual Report. Central Silk Board, Bangalore, India.
- ANONYMOUS (1994) Indian Labour Journal. Labour Bureau, Controller of Publications, Civil Lines, Delhi, 35(10).
- ANONYMOUS (1994) Indian Silk. Central Silk Board, Bangalore, India. 33(1).
- DEY A.K. & BANERJEE B.N. (1990) Production and marketing of pulse and oilseeds. Mittal Publications, New Delhi, p. 23.
- GUPTA S.C. & KAPOOR V.KK (1984) Fundamental of Applied Statistics. S. Chand & Sons Publ., New Delhi. p.2.11-2.16.
- KENDAL, M.G., STUART A. (1968) The advance theory of statistic, Vol.3. Charles Griffin Publ., London.
- JINHO, Y. (1993) Outline of sericulture in China. Zhenjiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou.
- SNEDECOR G.W. and COCHRAN W.G. (1967) Statistical methods, Sixth edition. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, p. 402.

PANORAMA DE LA CROISSANCE DE LA SERICICULTURE INDIENNE

P.K. SAHU* K. K. DAS & N. K. DAS

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742 101, Bengal Ouest, Inde.

La sériciculture est l'une de ces industries petite et familiale qui peut rapporter annuellement énormément de devises étrangères. Elle peut jouer un rôle vital dans le programme de reconstruction rural de l'Inde. Bien que les quatre types de soie soient produits en Inde, la soie mûrier joue un rôle central. Les différents indicateurs commerciaux de croissance et de développement du secteur mûrier ont été étudiés pour analyser le progrès général de la sériciculture en Inde de 1970-71 à 1993-94. L'analyse révèle que bien que le pays ait connu un développement global des différents secteurs de l'industrie séricicole, la croissance de la productivité est trop lent et va de paire avec un taux de croissance des importations de soie brute très élevé. Cela nécessite que l'on pense d'une manière sérieuse et fructueuse à améliorer la qualité et la productivité.

INTRODUCTION

L'agriculture est le pivot de l'économie indienne. Près de 70 pourcent de la population dépend directement ou indirectement de l'agriculture pour son gagne-pain journalier. Mais, à présent, le pays est dans une passe économique, avec une dette extérieure qui augmente à pas de géant chaque année. Il faut que le progrès industriel global soit dynamisé pour que le pays occupe une place respectable sur les marchés étrangers afin d'apurer la situation de la balance des paiements (BOP). Il y a un besoin pressant de développer/réorganiser les petites industries et les industries familiales qui peuvent rapporter des devises étrangères. La sériciculture en fait indubitablement partie. Elle peut jouer un rôle vital dans les programmes de reconstruction ruraux dans le pays car elle est une industrie à forte main d'œuvre, qui nécessite peu d'investissements de départ.

Bien que l'Inde soit le seul pays qui produise les quatre types de soie, sa performance sur le marché global de la soie n'est pas du tout à la hauteur. Elle ne contribue que pour 15,73 % de la production totale de soie grège importée dans le monde. L'industrie est très en retard par rapport aux autres pays concurrents (c'est à dire la Chine et les autres) soit en termes de qualité ou de quantité ou les deux à la fois. Parmi les quatre types de soie différents, plus de 92 % proviennent de la soie mûrier (sur les 14 533 MT de soie grège produites en 1993-94, seuls 1 141 MT ne proviennent pas de la soie mûrier). Cela démontre clairement la place du mûrier dans l'industrie de la soie en Inde. N'importe quelle analyse critique de la performance de l'industrie de la soie en Inde sera finalement ciblée sur l'analyse de la performance de l'industrie de la soie mûrier dans le pays. Compte tenu de cela, on s'est efforcé d'étudier de manière critique la croissance de l'industrie de la soie mûrier en Inde (et donc, de l'industrie de la soie en Inde).

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

METHODOLOGIE

Cette étude s'appuie sur des données secondaires portant sur la période 1970-71 à 1993-94. Les données ponctuelles concernant les surfaces de culture du mûrier, la production totale, les exportations de produits soyeux en quantité, les valeurs exportées aux prix actuels et la valeur actuelle des exportations aux prix de 1970-71, les importations en quantité (tonnes), les importations en pourcentage par rapport à la production intérieure proviennent de différents numéros de « *Silk in India : Statistical Biennial* » publié par le *Central Silk Board, Ministry of Textile, Government of India*. Pour estimer les taux de croissance des différents paramètres, un modèle linéaire du type $Y_t = a + bt$ a été adapté en utilisant la technique *Ordinary Least Square* (OLS) (Gupta et Kapoor, 1984). Mais avant cela on a procédé à un test aléatoire pour avoir une idée sur la nature de chaque série de données.

Le test aléatoire est un test non paramétrique connu sous le nom de test 'des tournants'. Le procédé consiste à compter les 'pics' et les creux dans les séries. Un 'pic' est une valeur plus grande que ses deux valeurs voisines et un 'creux' est une valeur inférieure à ses deux valeurs voisines. Les 'pics' comme les 'creux' sont traités comme des tournants. Cela signifie qu'il faut au minimum trois observations consécutives pour définir un tournant. Soit U_1, U_2, U_3 trois observations. Si la série est aléatoire, ces trois valeurs peuvent advenir dans n'importe quel ordre, c'est à dire dans six ordres. Mais il ne peut y avoir de tournants que de quatre manières (sur six). Ainsi, la probabilité de tournants pour un lot de trois valeurs est de $2/3$.

Soit $U_1, U_2, U_3, \dots, U_n$ un lot d'observations. Définissons une variable de marquage telle que :

$$X_i = 1 \text{ quand } U_i < U_{i-1} > U_{i+1}$$

$$U_i > U_{i-1} < U_{i+1}$$

$$= 0 \text{ Autrement, } \forall i = 1, 2, 3, \dots, n-2.$$

$$\Rightarrow \text{No. de tournants (p)} = \sum_{i=1}^{n-2} X_i$$

$$\Rightarrow \text{Probabilité de p, } E(p) = E\left(\sum_{i=1}^{n-2} X_i\right) \\ = 2/3 (n-2) \quad \text{et}$$

$$E(p^2) = E\left(\sum_{i=1}^{n-2} X_i\right)^2 \\ = \frac{40 n^2 - 144 n + 131}{90}$$

$$\Rightarrow \text{la variance de p, } V(p) = E(p^2) - \{E(p)\}^2 \\ = \frac{16 n - 90}{90}$$

Alors que le nombre d'observation 'n' augmente la distribution de 'p' tend vers la normalité. Ainsi pour tester l'hypothèse, nulle, H_0 (série aléatoire) nous avons la statistique

$$t = \frac{p - E(p)}{\sqrt{V(p)}} \sim N(0,1)$$

Où O_p l'écart type de p.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude aléatoire (Tableau II) montre que toutes les séries ont une tendance définie (et donc, non aléatoire par nature) excepté le pourcentage d'importations par rapport à la production intérieure. Pour s'assurer de la nature de cette série particulière, le pourcentage de deux années d'importation par rapport à la production totale de soie grège est pris en considération, ce qui indique clairement le comportement aléatoire de cette série une fois de plus. En fait, le caractère aléatoire est plus prononcé pour la seconde moitié (1982-83 à 1993-94) pour cette série (Tableau I) et ainsi il n'existe pas d'équation de tendance adaptée.

L'analyse des séries dans le temps révèle un taux de croissance positif simple et composé pour tous les indicateurs de croissance (Tableau III). La surface totale de culture mûrier est à la hausse avec 342000ha en 1993-94 pour seulement 98248ha en 1970-71 (soit une croissance simple de 248,10 pourcent et une croissance composée de 5,318 pourcent par an). Les chiffres plus élevés correspondants pour la production totale de soie grège parlent pour une croissance globale sur le plan de la productivité.

L'Inde a connu un progrès considérable de ses exportations de produits soyeux pendant la période considérée à la fois en termes de quantité et de valeur (les taux de croissance composés par an sont de 9,23 pour cent, 11,95 pour cent et 14,69 pour cent pour la quantité exportée, la valeur exportée aux prix actuels et la valeur exportée aux prix de 1970-71 respectivement). Les valeurs plus élevées de taux de croissance composée et de croissance simple pour les valeurs des exportations aux prix de 1970-71 que celles des quantités de produits exportés indiquent un progrès 'réel' dans le domaine des exportations. Cela indique une demande en hausse pour la soie indienne sur les marchés étrangers.

Mais ce qui est alarmant est la hausse simultanée des importations de soie grège (qui ont enregistré une augmentation record de 15059,38 pourcent, passant de seulement 32 tonnes en 1970-71 à 4851 tonnes en 1993-94) avec un taux de croissance composé de 13,13 pourcent par an. Des facteurs différents tels qu'une production insuffisante pour répondre à la demande intérieure de soie grège, la présence de soie grège de meilleure qualité et à meilleur prix sur les marchés étrangers, des pactes commerciaux bilatéraux entre pays, etc., peuvent avoir influencé l'augmentation des importations de soie grège en Inde. Parmi eux, l'amélioration de la quantité et de la qualité à meilleur coût mérite d'être souligné du point de vue de la recherche en sériciculture. Bien que l'on observe que la soie indienne ait un taux de croissance positif en ce qui concerne sa productivité, ses progrès sont trop faibles par rapport à son principal concurrent, la Chine (la productivité de la Chine était de 991,97 kg de cocons par ha pour 372,62 kg de cocons par ha pour l'Inde en 1990-91). L'augmentation de la productivité serait utile pour réduire le coût unitaire de production, ce qui à son tour permettrait de vendre la soie indienne à un taux relativement bas et de gagner plus de marchés étrangers. C'est pourquoi, il faudrait sérieusement penser à des programmes de sélection et à un programme de technologie post-cocon.

CONCLUSION

La croissance 'horizontale', c'est à dire l'expansion des zones de soie mûrier n'est pas prête d'être réalisée dans le proche futur. Ainsi, la seule façon d'augmenter la production actuelle est d'adopter la croissance « verticale », c'est à dire l'augmentation de la productivité. Des efforts doivent être entrepris pour améliorer à la fois la qualité et la quantité de soie grège, à un coût unitaire de production plus faible afin que la soie indienne puisse rivaliser sur les marchés étrangers sans trop dépendre de la soie grège importée et d'utiliser le vaste potentiel humain de meilleure façon.

FATS AND FATTY ACIDS IN THE DEVELOPMENTAL STAGES OF *ANTHERAEA ASSAMA* AND ITS HOST PLANTS

A. KATAKY & L.K. HAZARIKA*

Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat - 785 013, Assam, India.

*It is not clear whether leaf lipid affects the fat and fatty acid composition of a polyphagous commercial silkworm, **Antheraea assama** Westwood (Lepidoptera: Saturniidae), as lipids are present in small quantities in leaves. The larvae of this insect feed on leaves of several woody laurels like Som, Soalu and Mejankari. The present study was undertaken to analyse chromatographically the difference in fat and fatty acid composition of leaves of these plants as well as in the larvae feeding on them. Furthermore, fat and fatty acid composition of eggs, larvae, pupae and adults are also compared to understand the distribution of lipid reserves during various developmental stages, in which eggs, pupae and adults are non feeding stages. The lean dry weight of lipid was significantly different between the host plants and the larvae fed on them. Fifteen C₈-C₂₂ fatty acids were identified in the host plant and the insect; palmitate and stearate being the most dominant fatty acids. Compared with eggs, larvae and adults, pupae accumulated the highest amount of lipids. Accumulation of lipid in the pupal stage enables insects to utilise the stored energy for adult transformation. Although qualitative variations in fatty acid composition between host plants and larvae were negligible, they differed quantitatively.*

Keywords: *Antheraea assama*, lipids, fatty acids, developmental stages, host plants.

INTRODUCTION

Diet influences the qualitative composition of body fat of insects (Friend, 1958; Barlow, 1966). Fatty acids are accumulated in the fat body as triglycerides to provide reserves of energy which are obtained in the diet. The muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae), a multivoltine commercial silkworm, is polyphagous in nature, feeding on several evergreen woody laurels, out of which 'Som', *Machilus bombycina* King, and 'Soalu', *Litsaea polyantha* Juss. are the principal hosts; besides these, 'Mejankari', *Litsaea citrata* Roxby, is a secondary host. Biochemical composition of the host plant is one of the factors that determine the developmental success of *A. assama*. Furthermore, information on fat and fatty acid composition of eggs, larvae, pupae and adults may also help us to understand the distribution of lipid reserves during various developmental stages, as various stages of *A. assama* other than the larva are not feeding. Dadd (1964) reported that, in the leaves, lipids are present in small quantities. Essential fatty acids are obtained in the diet because insects are apparently unable to synthesise them. An analysis of body lipid and fatty acid composition of *A. assama* as well as its host plants may provide clues not only as to its nutritional requirements but may show the role of the host plants on its lipid and fatty acid composition.

* To whom correspondence may be made.

MATERIALS AND METHODS

A. assama larvae have been reared outdoors on 'Som', 'Soalu' and 'Mejankari' plants for the last 10 years, as described earlier by Bardoloi and Hazarika (1992) and Hazarika *et al.* (1994), whereas eggs, pupae and adults were maintained in the laboratory. Eggs (72 hr after the laying), fifth instar larvae (72 hr after the moulting), pupae (72 hr after pupation), adults (72 hr after eclosion) and leaves of the three host plants where rearing was conducted were utilised for lipid estimation (Folch *et al.*, 1957) and analysis of fatty acids (Bezbaruah *et al.*, 1988; Hazarika *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the lipid content of leaves of host plants. Amongst the host plants, the highest amount (10.26%) of lipid was extracted from 'Som' leaves. Hazarika *et al.* (1994) observed that because of the higher moisture content in 'Soalu' leaves, their lipid content was inversely reduced.

Relative abundance of the principal fatty acids in host plants is shown in Table I. All fatty acids were not identified, unidentified fatty acids represented 24.44%, 16.53% and 39.42% of the total in the leaves of 'Som', 'Soalu' and 'Mejankari', respectively. Fourteen C₈-C₂₀ fatty acids were identified in the host plants. They did not vary qualitatively between host plants but varied quantitatively. The most dominant fatty acid in the leaves of 'Som' and 'Soalu' was stearate, constituting 28.0% and 44.50% of the total, respectively; whereas palmitate was the most dominant in 'Mejankari' leaves, constituting 30.90%. In 'Soalu' and 'Som', palmitate constituted 24.38% and 22.21% of the total. The fatty acid synthetase produced mostly the palmitate. Stearate was 7.62% of the total in 'Mejankari' leaves.

The lean dry weights of lipid of the fifth instar larvae of *A. assama* reared on three different hosts are shown in Figure 2. 'Som'-reared larvae were rich in lipid ($13.87 \pm 0.39\%$) followed by those reared on 'Soalu' ($9.34 \pm 0.04\%$) and 'Mejankari' ($7.81 \pm 0.48\%$). Similar variation in the lipid content of the host plants existed.

The number of fatty acids identified in the insect was 15 (C₈-C₂₂) (Table II). However, twenty-three C₆-C₂₀ fatty acids are present in insects (Chapman, 1981). Palmitate and stearate were the most dominant fatty acids in the larvae and constituted more than 50% of the total. However, palmitate and oleate were found to be dominant fatty acids out of 23 (C₆-C₂₀) fatty acids isolated from *Anthonomus*, as reported earlier by Chapman (1981).

Oleate made up more than 12% of the total in larvae but it represented only 2-3% in the host. It is because insects are capable of synthesising it *de novo* with the 12 desaturase (Borgeson, 1990).

The other fatty acids which differed quantitatively between the insects and the host plants were pelargonate, which constituted 1.73%, 0.87% and 0.30%, respectively in 'Som', 'Soalu' and 'Mejankari' leaves. The quantity of methyl decanoate and laurate was variable between host plants, being higher in 'Som' leaves than in those of 'Soalu' and 'Mejankari'; however, a trace amount of methyl decanoate was found to be present in the larvae. The reason for such a differential occurrence of fatty acids cannot be explained.

Figure 3 shows the distribution of lipid reserves in the developmental stages of *A. assama*. Pupae accumulated the highest amount of lipid, which might enable them to utilise the stored energy for transformation to adult (Gilbert, 1967). Distribution of fatty acids in different stages of *A. assama* are shown in Table II, showing palmitate to be the most dominant fatty acid in all stages. Pelargonate was in trace in the non feeding stages, egg and pupa. C₈:0 and C₁₀:0 fatty acids were also in trace in the eggs. Laurate was the highest in the pupal stage. It is difficult to explain such a differential quantitative variation of fatty acids between stages.

Fatty acids are known to be feeding stimulants for certain insects, for example, linolenic acid for *Bombyx mori*, linoleic acid for the fire ant and laurate for many insects (Chapman, 1977; Seigler, 1983); the presence of laurate in higher quantity in 'Som' leaves than in those of 'Soalu' and 'Mejankari' may determine the feeding preference of *A. assama* on the leaves of 'Som'.

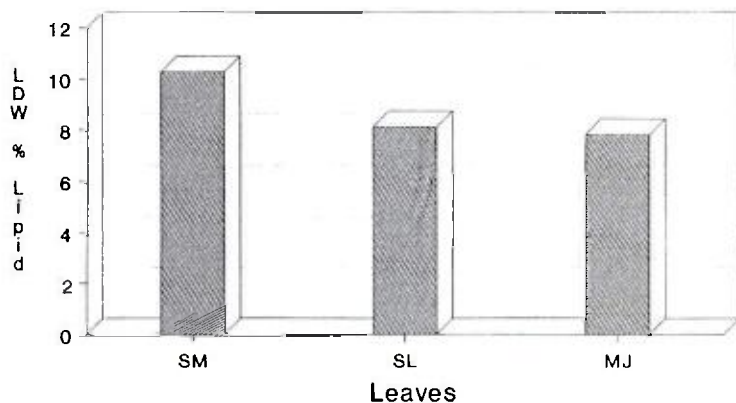


Fig. 1: Lean dry weight of lipids of Som (SM), Soalu (SL) and Mejankari (MJ) leaves.

Fig. 1: Poids sec des lipides des feuilles de Som (SM), Soalu (SL) et Mejankari (MJ).

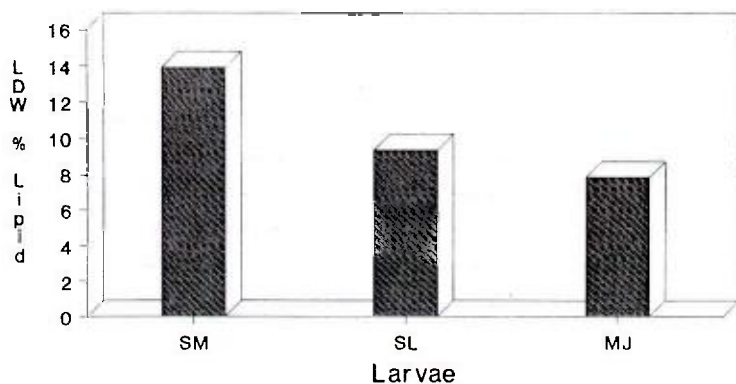


Fig. 2: Lean dry weight of lipids of the fifth instar larvae of *A. assama* feeding on Som (SM), Soalu (SL) and Mejankari (MJ).

*Fig. 2: Poids sec des lipides des larves du cinquième âge d'*A. assama* nourries avec Som (SM), Soalu (SL) et Mejankari (MJ).*

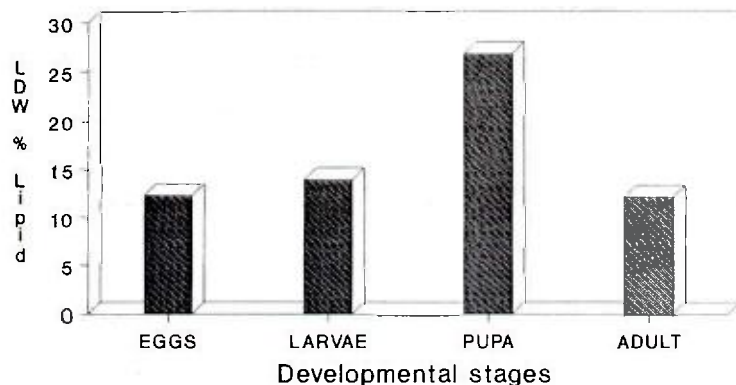


Fig. 3: Lean dry weight of lipids in the eggs, larvae, pupae and adults of *A. assama*.

*Fig. 3 : Poids sec maigre des lipides des oeufs, des larves, des chrysalides et des adultes d'*A. assama*.*

Table I. Relative fatty acid composition of the leaves of 'Som', 'Soalu' and 'Mejankari'.*Tableau I. Composition relative en acides gras des feuilles de Som, Soalu et Mejankari.*

Fatty acids <i>Acides gras</i>	Carbon number <i>Nombre de carbones</i>	Som	Soalu	Mejankari
	C8:0	0.86	0.12	0.28
Pelergonate / <i>Pélergonate</i>	C9:0	1.73	0.87	0.30
Methyl decanoate / <i>Décanoate de méthyl</i>	C10:0	6.62	trace	3.21
	C11:0	0.26	trace	0.76
Laurate	C12:0	1.00	0.50	0.36
	C13:0	1.11	1.04	0.52
Methyl tetradecanoate / <i>Tétradécanoate de méthyl</i>	C14:0	1.80	2.90	2.14
	C15:0	0.86	2.50	0.53
Palmitate	C16:0	22.21	24.38	30.90
	C17:0	1.48	1.10	0.45
Stearate / <i>Stéarate</i>	C18:0	28.00	44.50	7.62
Oleate / <i>Oléate</i>	C18:1	2.22	3.42	3.34
	C19:0	3.66	2.00	4.01
Arachidate	C20:0	3.75	0.14	6.11
Unidentified / <i>Non identifié</i>		24.44	16.53	39.42

Table II. Relative fatty acid composition of eggs, larvae, pupae and adults of *A. assama* fed on 'Som' leaves.*Tableau II. Composition relative en acides gras des oeufs, des larves, des chrysalides et des adultes d'*A. assama* élevés sur feuilles de Som.*

Fatty acids <i>Acides gras</i>	Carbon number <i>Nombre de carbones</i>	Eggs <i>Oeufs</i>	Larvae <i>Larves</i>	Pupae <i>Chrysalides</i>	Adults <i>Adultes</i>
	C8:0	trace	0.25	0.30	0.30
Pelergonate / <i>Pélergonate</i>	C9:0	trace	0.20	trace	0.40
Methyl decanoate / <i>Décanoate de méthyl</i>	C10:0	trace	0.31	0.07	0.21
	C11:0	0.18	1.20	0.22	0.50
Laurate	C12:0	0.12	2.82	17.75	7.46
	C13:0	0.10	1.17	0.23	0.51
Methyl tetradecanoate / <i>Tétradécanoate de méthyl</i>	C14:0	0.47	3.41	0.90	0.85
	C15:0	0.40	0.53	0.22	0.25
Palmitate	C16:0	41.60	32.64	28.60	44.78
	C17:0	1.14	1.40	0.90	1.03
Stearate / <i>Stéarate</i>	C18:0	5.90	31.87	21.20	21.73
Oleate / <i>Oléate</i>	C18:1	13.10	12.60	10.50	8.60
	C19:0	0.27	0.20	0.82	0.34
Arachidate	C20:0	1.20	0.70	3.20	3.43
	C22:0	6.53	1.55	0.31	1.06
Unidentified / <i>Non identifié</i>		28.90	9.15	14.79	8.85

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out with financial support from the Assam Science Technology and Environment Council, Guwahati, India.

REFERENCES

- BARDOLOI S., HAZARIKA L.K. (1992) Seasonal variations of body weight, lipid reserves, blood volumes and hemocyte populations of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae). *Environ. Entomol.*, 21(6), 1398-1403.
- BARLOW J.S. (1966) Effects of diet on the composition of body fat in *Lucilia sericata* (Meigen). *Nature*, 212, 1778-1779.
- BEZBARUAH R.L., PILLAI K.R., GOGOI B.K., BARUAH J.N. (1988) Effects of growth temperature and media composition of *Bacillus Stearotherophilus* AN 002 Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol.*, 54, 37-45.
- BORGESON C.E., KURTTI T.J., MUNDULCH U.G., BLMQUIST G.T. (1990) Insect tissues, not micro-organisms, produced linoleic acid in the house cricket and the American cockroach. *Experimentia*, 47, 238-241.
- CHAPMAN R.F. (1982) *The Insect Structure and Function*. Harvard University Press, Cambridge.
- DADD R.H. (1973) Insect nutrition: current developments and metabolic implication. *Annu. Rev. Ent.*, 18, 381-402.
- FOLCH J., LEES M., STANLEY G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 266, 497-509.
- FRIEND W.G. (1958) Nutritional requirements of phytophagous insects. *Annu. Rev. Ent.*, 3, 57-74.
- GILBERT L.I. (1967) Lipid metabolism and function in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 4, 70-211.
- HAZARIKA L.K., BARDOLOI S., KATAKY A. (1994) Effects of host plants on haemocyte populations and blood volumes of *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 34(2), 301-306.
- HAZARIKA L.K., KATAKY A., KATAKY J.C.S., HAZARIKA A.K., HAZARIKA J. (1995) Fats and fatty acid composition of muga silkworm and its host plants. *JASS*, 37(1), 45-50.
- SEIGLER D.S. (1983) Role of lipids in plant resistance to insects. *In Plant Resistance to Insects*. P.A. Hedin ed., pp. 303-327. American Chemical Society, Washington, DC.
- SUBRAMANYAN B., CUTKOMP L.K. (1987) Total lipid and fatty acid composition in male and female larvae of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *The Great Lake Entomologist*, 20(2), 99-102.

GRAISSES ET ACIDES GRAS AU COURS DES PHASES DE DEVELOPPEMENT D'*ANTHERAEA ASSAMA* ET DE SES PLANTES HOTES

Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat - 785 013, Assam, India.

A. KATAKY & L. K. HAZARIKA*

*Il n'est pas clair si les lipides de la feuille ont un effet sur la composition en graisses et en acides gras du ver à soie commercial polyphage, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera : Saturniidae), les lipides étant présents en petites quantités dans les feuilles. Les larves de cet insecte se nourrissent de feuilles de plusieurs lauriers des bois Som, Soalu et Mejankari. Cette étude a été entreprise afin d'analyser par chromatographie la différence de composition des graisses et des acides gras des feuilles de ces plantes tout comme des larves qui s'en nourrissent. De plus, on a comparé la composition des graisses et des acides gras des oeufs, des larves et des chrysalides, pour comprendre la distribution des réserves en lipides pendant les différentes étapes de développement au cours desquelles les oeufs, les chrysalides et les adultes ne se nourrissent pas. Le poids sec maigre des lipides est sensiblement différent entre les plantes hôtes et les larves qui s'en nourrissent. Quinze acides gras C₈-C₂₂ sont identifiés dans la plante hôte et l'insecte, le palmitate et le stéarate étant les acides gras dominants. Les chrysalides accumulent la plus grande quantité de lipides comparées aux oeufs, aux larves et aux adultes. L'accumulation de lipides au stade nymphal permet aux insectes d'utiliser l'énergie stockée pour la transformation en adulte. Bien que les variations qualitatives de la composition en acides gras entre les plantes hôtes et les larves soient négligeables, elles diffèrent sur le plan quantitatif.*

INTRODUCTION

Le régime alimentaire influence la composition qualitative des corps gras des insectes (Friend, 1958 ; Barlow, 1966). Les acides gras s'accumulent dans les corps gras sous forme de triglycérides pour fournir des réserves d'énergie apportées par l'alimentation. Le ver à soie muga, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae), ver à soie commercial polyvoltin, est polyphage par nature, et se nourrit sur plusieurs lauriers des bois persistants, avec « Som », *Machilus bombycina* King, et « Soalu », *Litsaea polyantha* Juss comme hôtes principaux et « Mejankari », *Litsaea citrata* Roxby comme hôte secondaire. La composition biochimique de la plante hôte est un des facteurs déterminants du succès du développement de *A. assama*. De plus, des informations sur la composition des graisses et des acides gras des oeufs, des larves, des chrysalides et des adultes pourraient permettre de comprendre la distribution des réserves de lipides au cours des différentes étapes de développement, étant donné que non seulement les larves mais plusieurs stades de *A. assama* ne se nourrissent pas. Dadd (1964) a signalé que les lipides sont présents en petites quantités dans les feuilles. L'alimentation apporte des acides gras essentiels car les insectes sont apparemment incapables d'en faire la synthèse. L'analyse de la composition des corps gras et des acides gras d'*A. assama* et de ses plantes hôtes pourrait non seulement apporter des indications sur ses besoins nutritionnels mais aussi montrer le rôle des plantes hôtes dans la composition de ses lipides et de ses acides gras.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

Les larves *A. assama* ont été élevées à l'extérieur sur les plantes « Som », « Soalu » et « Mejankari » au cours des 10 dernières années, d'après la description antérieure de Bardoloi et Hazarika (1992) et Hazarika et coll. (1994), tandis que les oeufs, les chrysalides et les adultes ont été élevés en laboratoire. Les oeufs (72 heures après la ponte), les larves au cinquième âge (72 h après la mue), les chrysalides (72 h après la nymphose), les adultes (72 h après l'éclosion) et les feuilles des trois plantes hôtes ont été utilisés à l'endroit d'élevage pour l'estimation des lipides (Folch et coll., 1957) et l'analyse des acides gras (Bezbaruah et coll., 1988 ; Hazarika et coll., 1995).

RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 présente le contenu en lipides des feuilles des plantes hôtes. Parmi les plantes hôtes, la plus grande quantité (10,26%) de lipides est extraite des feuilles « Som ». Hazarika et coll., (1994) ont observé que le contenu en lipides des feuilles « Soalu » est inversement réduit à cause de leur plus grande teneur en humidité.

La quantité relative en acides gras principaux des plantes hôtes est présentée dans le Tableau 1. Tous les acides gras ne sont pas identifiés, les acides gras non identifiés représentent respectivement 24,44 %, 16,53 % et 39,42 % de l'ensemble, pour les feuilles de « Som », de « Soalu » et de « Mejankari ». Quatorze acides gras C₈-C₂₀ sont identifiés dans les plantes hôtes. Ils ne varient pas sur le plan qualitatif entre les plantes hôtes mais sur le plan quantitatif. L'acide dominant des feuilles de « Som » et de « Soalu » est le stéarate, qui représente respectivement 28 % et 44,50 % du total ; tandis que le palmitate domine dans les feuilles de « Mejankari » à 30,90 %. Pour « Soalu » et « Som », le palmitate constitue 24,38 % et 22,21 % du total. La synthétase des acides gras produit principalement du palmitate. Le stéarate représente 7,62 % du total pour les feuilles « Mejankari ».

Les poids en matière sèche des lipides des larves *A. assama* au cinquième âge, élevées sur trois hôtes différents, sont présentés dans la Figure 2. Les larves nourries sur « Som » sont riches en lipides (13,87 ± 0,39 %) suivies par celles élevées sur « Soalu » (9,34 ± 0,04 %) et « Mejankari » (7,81 ± 0,48 %). Une variation similaire du contenu en lipides des plantes hôtes existe.

Le nombre d'acides gras identifié chez l'insecte s'élève à 15 (C₈-C₂₂). Cependant, vingt trois acides gras C₆-C₂₀ sont présents dans les insectes (Chapman, 1981). Le palmitate et le stéarate sont les acides gras dominants dans les larves et représentent plus de 50 % du total. Cependant, nous trouvons que le palmitate et l'oléate sont les acides gras dominants sur 23 (C₆-C₂₀) isolés sur *Anthonomus*, comme l'a précédemment observé Chapman (1981).

L'oléate représente plus de 12 % du total chez les larves mais seulement 2-3 % de l'hôte. C'est parce que les insectes sont capables de réeffectuer la synthèse avec la désaturase 12 (Borgeson, 1990).

Les autres acides gras qui diffèrent sur le plan quantitatif entre les insectes et les plantes hôtes sont le perlargonate, qui est présent respectivement à 1,73 %, 0,87 % et 0,30 % dans les feuilles de « Som », « Soalu » et « Mejankari ». La quantité de méthyle decanoate et laurate est variable entre les plantes hôtes, il est plus élevé dans les feuilles de « Som » que dans les feuilles de « Soalu » et de « Mejankari » ; cependant, une quantité trace de méthyle decanoate est présente dans les larves. La raison d'une telle présence différentielle en acides gras ne peut être expliquée.

La Figure 3 montre la distribution des réserves en lipides au cours des stades de développement d'*A. assama*. Les chrysalides accumulent la plus grande quantité de lipides, ce qui les aide peut-être à utiliser l'énergie stockée pour la transformation en adulte (Gilbert, 1967). La distribution des acides gras aux divers stades de *A. assama* présentée dans le Tableau II, montre que le palmitate est l'acide gras dominant à tous les stades. Le perlargonate est présent sous forme de traces aux stades sans alimentation des oeufs et des chrysalides. Les acides gras C₈:0 et C₁₀:0 sont aussi présents sous forme de traces dans les oeufs. Le laurate est le plus élevé chez la chrysalide. Il est difficile d'expliquer une telle variation quantitative différentielle des acides gras entre les différents stades.

On sait que les acides gras sont des stimulants alimentaires pour certains insectes, par exemple, l'acide linolénique pour *Bombyx mori*, l'acide linoléique pour la fourmi feu, et le laurate pour de nombreux insectes (Chapman, 1977 ; Seigler, 1983) ; la présence de laurate en plus grande quantité dans les feuilles de « Som » que dans les feuilles de « Soalu » et de « Mejangari » explique peut-être la préférence alimentaire de *A. assama* pour les feuilles de « Som ».

ROOTING POTENTIAL OF MULBERRY GENOTYPES IN COASTAL SALINE AREAS

S.T.P. AGASTIAN & M. VIVEKANANDAN

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli 620 024, Tamilnadu, India.

Salinity tolerance in 14 mulberry genotypes was studied in the coastal saline regions of Tamilnadu, India based on sprouting and rooting characters. From the perusal of rooting percentages, shoot and root characters as well as leaf productivity, genotypes like BC2-59, S-30, S-36, and ACC-235 were found to be superior followed by M-5, S-41, Tr-8, Tr-10 and Mr-2. The performance of Ichinose, Goshierami and Tr-4 was rather poor. Regarding elemental analysis, K and Ca were more in the leaves of S-36, ACC-235, S-41, S-30 and BC2-59. Poor absorption of K and Ca was observed in the leaves of Tr-4 and Goshierami. Na agglomerated in roots, while Cl got distributed equally in leaves and roots. Na and Cl were higher in Goshierami, C-1 and Tr-4 but poorer in S-30, S-36, BC2-59 and S-41. There was a preferential accumulation of K over other ions in S-36, S-41, ACC-235, G-7, S-30 and BC2-59, evidently suggesting that these genotypes established well and performed better in the coastal saline soil. Mulberry, being a glycophyte (C3), has developed in some varieties higher K/Na ratio when subjected to salinity stress.

Keywords: Saline tolerance, rooting potential, K/Na ratio, evaluation.

INTRODUCTION

Salinity in soil or water presents a stress condition for crop plants which is of increasing concern in agriculture. Although soil scientists have been successful in minimising the extent and spread of salinity in soils using many curative and preventative measures, the methods are highly expensive and they cannot be implemented particularly in developing countries. Direct methods of selection and breeding for improvement of salt tolerance in crop plants have been suggested (Steppuhn *et al.*, 1991; Shannon, 1985). However, our knowledge of physiological mechanism of salt tolerance is still incomplete in seeking rapid and objective parameters to assist mass screening programmes (Yeo and Flowers, 1984).

Mulberry is one of the major food plants of the silkworm (*Bombyx mori*) and also, being a cash crop, holds a lot of promise in developing countries. Drought and salinity are the major problems in agriculture. Although a lot of work has been done in drought tolerance in mulberry (Susheelamma *et al.*, 1992b; Dorcus and Vivekanandan, 1995), to our knowledge, no work has been done on saline tolerance at the field level. Therefore for the first time, saline tolerance in mulberry is being attempted by directly planting the cuttings of different mulberry genotypes in the saline coastal land of Vedarannam, QM Dist. Tamilnadu, India and employing rooting potential and preferential absorption and distribution of ions as the key parameters, as root is the primary organ confronting salinity directly.

MATERIALS AND METHODS

Eight months old mulberry cuttings of different genotypes like M-5, MR-2, C-1, BC2-59, Ichinose, Ghoshoerami, Tr-4, Tr-8, Tr-10, G-7, S-30, S-41 and ACC-235 of uniform size and thickness with at least 3 buds were planted in well dressed - manured soil in the coastal saline area of Vedaranniyam, Taminaldu, India. All the genotypes are diploid except Tr-4, Tr-8, Tr-10 and G-5 (triploids). Irrigation was done thrice a week and weeding was done periodically.

The 90-day old mulberry saplings were carefully uprooted and observed for sprouting and rooting percentages. Besides, rooting potential characters were also studied. The plants were then washed with distilled water, oven-dried, powdered and used for elemental analysis (Na, K and Ca) by triacid method (Jackson, 1967). The plant samples were extracted with 25% HNO₃ for Cl estimation using 0.015N HgNO₃ as titrant and diphenyl carbazone-methyl blue as an indicator (Krishnamoorthy and Bagwat, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

The EC value of the irrigation water was 4.3 mS/cm but the soil revealed different EC values at different depths (Table 1). The surface soil had more EC value due to continuous evaporation of ground water, leaving salts on the surface (Sharma and Prihar, 1973).

From the overall performance of different mulberry genotypes (Table 2), ACC-235, S-30, S-36, Tr-8, Tr-10 and BC2-59 revealed higher sprouting and rooting percentages (80-90%) in the order of hierarchy. The more positive characters to stress tolerance like longer root and shoot length, increased root and leaf bio-mass were confined to these genotypes only. Other genotypes such as Ghoshoerami, Ichinose, C-1 and S-41 exhibited poor rooting percentages (24-50%) with reduction in growth and bio-mass.

Mineral composition (Na, K, Ca and Cl) of leaves, stem and roots of different mulberry genotypes is shown in table 3. Among the elements analysed, K was dominant (12.5-17.5 mg/g dw) in varieties like BC2-59, S-36, S-41 and G-7, but in all the others Na was dominant.

Regarding organ level distribution of elements, K and Ca accumulated more in leaves, whereas Na was higher in roots. Distribution of chlorides showed no significant difference in leaves and roots. Inorganic osmotic ions like K⁺ and Ca²⁺ were more in leaves of S-36, ACC-235, S-41, S30 and BC2-59, whereas toxic elements like Na⁺ and Cl⁻ and Tr-4.

Table 1. Chemical analysis of soil (average of different profiles) and irrigation water in coastal area of Vedaranniyam (values are mean $\pm$ SD).

Tableau 1. Analyse chimique du sol (moyenne de différents profils) et de l'eau d'irrigation dans les zones côtières du Vedaranniyam (les valeurs sont des moyennes $\pm$ Ecart type).

SNo	Parameters / Paramètres	Irrigation water / Eau d'irrigation	Soil / Sol
1	pH	7.8	8.18 $\pm$ 0.17
2	EC mS/cm	4.3	1.26 $\pm$ 0.51
3	Sodium	0.27 g/l	2.74 $\pm$ 1.35 mg/g
4	Potassium	0.03 g/l	1.51 $\pm$ 1.01 **
5	Calcium	0.04 g/l	1.28 $\pm$ 1.13 **
6	Chlorides / Chlorides	0.18 g/l	0.81 $\pm$ 0.07 **

Table II. Quantitative morphological characters of mulberry genotypes grown in the coastal saline soils (The values are mean of three different experiments).

Tableau II. Caractères morphologiques quantitatifs de génotypes de mûriers cultivés dans des terrains salins côtiers (Les valeurs correspondent aux moyennes de trois expériences différentes).

S. No	Mulberry Genotypes	Root number/ plant	Root length (cm)	Root fresh wt (g)	Root dry wt (g)	Root moisture %	Shoot length (cm)	No of leaves/ plant	Leaf area/ plant (sq cm)	Leaf fresh wt (g)	Leaf dry wt (g)	Leaf moisture (%)	Sprouting (%)	Rooting
S No.	Génotypes de mûrier	Nombre de racines /plant	Longueur de la racine (cm)	Poids racine fraîche (g)	Poids racine sèche (g)	Humidité de la racine (%)	Longueur de pousse (cm)	Nombre de feuilles/ plant	Surface de la feuille (cm carré)	Poids feuille fraîche (g)	Poids feuille sèche (g)	Humidité de la feuille (%)	Germination (%)	Racinement (%)
1	M-5	11.31	44.33	2.03	1.22	40.00	45.33	12.67	194	9.21	4.13	55.16	60.13	48.89
2	MR-2	15.53	53.12	7.03	3.02	57.04	4.8	16.44	268	11.74	3.92	66.50	73.66	53.99
3	C-1	13.45	48.75	9.02	4.18	58.55	64.33	12.22	239	8.73	3.64	58.30	50.18	39.39
4	Ichinose	7.37	11.37	1.26	0.56	55.55	18.44	10.71	41	2.94	0.71	75.05	53.13	21.39
5	BC2-59	20.64	58.96	11.63	4.19	63.97	68.53	20.40	564	18.93	6.12	67.57	85.81	76.92
6	Goshoerami	5.72	18.78	1.55	0.69	55.49	8.52	10.13	57	8.14	3.00	63.14	42.41	29.31
7	Tr-4	7.73	30.39	1.56	0.79	49.35	30.00	12.44	171	14.82	4.94	66.55	77.83	53.49
8	Tr-8	10.94	49.50	3.86	1.19	69.17	39.11	10.67	193	15.13	3.81	74.91	71.48	54.44
9	Tr-10	18.78	43.44	11.06	3.10	71.97	46.74	12.44	175	15.22	3.92	74.34	77.20	65.95
10	G-7	8.57	37.43	4.07	1.85	54.54	34.47	8.97	106	3.23	0.88	72.75	72.51	52.75
11	S-30	17.37	47.35	15.09	5.30	64.97	67.86	16.48	433	16.34	6.81	58.32	81.70	71.85
12	S-36	16.78	55.68	11.60	5.57	51.98	63.65	17.59	462	15.61	4.10	73.73	67.26	63.04
13	S-41	15.13	45.87	6.52	1.95	70.09	48.63	12.00	270	6.54	2.87	55.11	59.67	55.89
14.	ACC-235	17.84	65.50	11.02	4.52	58.98	63.31	9.84	598	13.31	3.90	70.75	85.33	71.72
	S D m	1.63	3.61	0.60	0.25	6.23	5.68	1.45	13.4	1.41	0.23	9.74	5.28	5.89
	Ecart type													
	S E m	0.73	1.62	0.27	0.11	2.79	2.55	0.65	6.01	0.63	0.10	4.37	2.37	2.64
	C V %	14.32	9.90	11.11	12.33	10.00	14.33	12.44	6.71	6.70	8.39	14.31	8.33	12.59

Table III. Ion accumulation and distribution in different organs of mulberry genotypes grown in the coastal saline soil (The values are mean of 3 different observations).

Tableau III. Accumulation et distribution d'ions dans différents organes de mûriers cultivés en sol salin côtier (Les valeurs sont les moyennes de 3 observations différentes).

S No	Mulberry genotypes	Leaves / Feuilles				Stem / Tige				Root / Racine			
		Na*	K*	Ca*	Cl**	Na*	K*	Ca	Cl**	Na*	K*	Ca	Cl**
Génotypes de mûriers													
	M-5	4.91	9.83	2.21	11.08	4.93	6.81	0.63	5.54	14.70	4.80	0.71	9.97
2	MR-2	5.54	9.86	1.82	6.09	6.82	4.81	0.80	4.43	13.01	5.22	0.71	5.54
3	C-1	6.03	12.93	1.73	7.75	9.81	5.84	1.56	5.54	17.64	4.22	0.96	5.54
4	BC2-59	3.31	12.50	1.01	9.97	3.13	17.57	0.98	3.32	8.84	10.04	0.73	6.09
5	Ichinose	4.66	12.22	1.65	8.31	8.33	6.54	1.23	7.98	9.01	2.44	0.22	8.86
6	Goshoerami	10.35	13.02	1.14	8.86	15.80	6.05	2.32	8.31	12.75	3.71	0.55	8.89
7	Tr-4	9.33	10.91	1.85	9.42	8.01	11.55	1.80	7.75	15.41	5.96	1.05	9.42
8	Tr-8	5.03	11.71	1.53	1.66	8.31	10.33	0.81	2.21	7.11	2.37	0.23	2.21
9	Tr-10	3.20	12.01	1.44	2.21	8.00	10.58	1.02	1.66	9.32	3.03	0.44	4.43
10	G-7	5.77	13.72	0.52	3.32	5.56	17.54	0.22	2.21	7.33	5.77	0.20	2.21
11	S-30	4.77	13.49	2.75	1.11	6.77	7.53	2.41	2.21	9.83	7.37	0.69	3.32
12	S-36	2.14	14.05	1.65	4.43	3.35	8.56	0.66	5.54	6.31	7.55	0.32	7.75
13	S-41	3.23	12.41	2.55	4.43	4.88	17.55	0.78	2.21	9.58	8.56	0.54	2.21
14	ACC-235	3.67	12.57	2.26	7.75	2.44	7.65	0.97	3.32	7.75	5.83	0.26	5.54
	S E m	0.29	0.35	0.12	0.46	0.42	0.47	0.09	0.32	0.51	0.45	0.03	0.30
	Ecart type												
	C V %	9.92	5.06	12.02	14.23	11.06	8.26	13.91	12.41	9.29	14.20	11.11	9.06

*mg / g dw / mg / g poids sec

** µg / g dw / µg / g poids sec

The percentage of preferential accumulation of K⁺ over other ions was higher in S-36, S-41, ACC-235, G-7, S-30 and BC2-59 (Table 4) which is positively correlated with higher sprouting and rooting percentages and also rooting characters.

Experiments of Afridi, (1988) revealed that plants tolerant to salinity and sodicity showed less accumulation of Na and Cl and maintained its specificity for K and lower Na/K ratio. Moreover, partitioning of ions within the plant body, the increasing K/Na ratios from roots to leaves indicates selective uptake and transport, and preferential partitioning of ions between organs which could be attributed to high salt tolerance (Mahmood and Malik, 1987).

Table IV. K/Na ratio and preferential accumulation of K in mulberry genotypes planted in coastal saline area of Vedaranniyam.

Tableau IV. Rapport K/Na et accumulation préférentielle de K dans les génotypes de mûrier plantés dans la zone saline côtière du Vedaranniyam.

S No	Mulberry genotypes	K/Na ratio	Preferential accumulation of K (%)
	Génotypes de mûriers	Rapport K/Na	Accumulation préférentielle de K (%)
1	M-5	0.87	19.84
2	MR-2	0.78	20.00
3	C-1	0.68	21.00
4	BC2-59	2.24	24.00
5	Ichinose	0.98	27.00
6	Goshocrami	0.46	13.00
7	Tr-4	0.86	17.00
8	Tr-8	1.19	24.69
9	Tr-10	1.24	25.00
10	G-7	1.99	24.00
11	S-30	1.33	24.00
12	S-36	2.56	32.00
13	S-41	2.19	29.00
14	Acc-235	1.89	29.00

From the overall perusal of the data, S-30, S-36, BC2-59, S-41, ACC-235 and G-7 were found to be better rooters with comparatively higher K/Na ratio and lower levels of Na and Cl. This clearly indicated that saline tolerance is accompanied by accumulation K and avoidance of Na and Cl in the promising genotypes cited. These mulberry genotypes could be used as excellent materials for studying saline tolerance as well as in future-breeding programmes for saline tolerance.

REFERENCES

- AFRIDI M.M.R.K., QUDAR A., DWIVEDI R.S. (1988) Effect of salinity and sodicity on growth and ionic composition of *Oryza sativa* and *Diplachne fusca*. J. Indian Bot. Soc. 67, 166-182.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. Exploitation of mulberry genotypes for drought resistance potential. J. Seric. Sci. Japan (in press).
- JACKSON M.D. (1967) Soil chemical analysis, Prentice Hall of India. Pvt. Ltd., New Delhi.
- KRISHNAMOORTHY R., BHAGWAT K.A. (1990) A rapid and simplified method for determination of chlorides in plant material. Indian J. Except. biol. 28, 198-200.
- MAHMOOD K., MALIK K.A. (1987) Salt tolerance studies on *Atriplex rhagodioides* F. Muell. Environmental and Experimental Botany 27, 119-125.
- SHANNAN M.C. (1984) Breeding, selection and the genetics of salt tolerance in: Salinity tolerance in plants, pp 231-254. Staples, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds) John Wiley and Sons, New York.

- SHARMA D.R., PRIHAR S.S. (1973) Effect of depth and salinity of ground water on evaporation and soil salinization. Indian J. Agric. Sci. 43, 582-586.
- STEPPUHN H., CURTIN D., SELLES F., 1991. The role of salt tolerant crops in sustainable irrigated agriculture. pp 305-313. In Proc. Irrig. Res. Dev. (IRDC 90) Conf., Lethbridge, Alberta, 17-20 July 1990. Univ. of Lethbridge Press, Lethbridge, Alberta.
- SUSHEELAMMA B.N., KUMAR J.S., MOGILI T., SENGUPTA K., PADMA M.N. & SURYANARAYANA N. (1992b) Evaluation of techniques for screening for drought resistance in mulberry. Sericologia 32, 609-614.
- YEO A. R. & FLOWERS T.J. (1986b) Ion transport in *Suaeda maritima*; its relation to growth and implications for the pathway of radial transport of ions across the root. J. Expt. Bot. 37, 143-159.

POTENTIEL DE RACINEMENT DE GENOTYPES DE MURIERS DANS DES ZONES COTIERES SALINES

S.T.P. AGASTIAN & M. VIVEKANANDAN

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirappalli
620 024, Tamilnadu, Inde.

La tolérance saline de 14 génotypes de mûriers a été étudiée dans les régions côtières salines du Taminaldou, en Inde à partir des caractéristiques de bourgeonnement et de racinement. L'observation des pourcentages de racinement, des caractéristiques des pousses, des racines tout comme du rendement en feuilles révèle que les génotypes BC2-59, S-30, S-36 et ACC-235 sont supérieurs, suivis par M-5, S-41, Tr-8, Tr-10 et Mr-2. La performance d'Ichinose, de Goshocerami et de Tr-4 est assez faible. Pour ce qui est de l'analyse en éléments on trouve plus de K et de Ca dans les feuilles de S-36, ACC-235, S-41, S-30 et BC2-59. On observe une faible absorption de K et Ca dans les feuilles de Tr-4 et de Goshocerami. Na s'accumule dans les racines tandis que Cl est également distribué entre les feuilles et les racines. Les niveaux de Na et de Cl sont plus élevés chez Goshocerami, C-1 et Tr-4 mais plus faibles chez S-30, S-36, BC2-59 et S-41. On observe une accumulation préférentielle de K par rapport aux autres ions chez S-36, S-41, ACC-235, G-7, S-30 et BC2-59, ce qui suggère évidemment que ces génotypes s'établissent bien et ont de meilleures performances dans des terrains côtiers salins. Le mûrier étant un glycophyte (C3), certaines variétés présentent un rapport K/Na plus élevé quand elles font face à une salinité plus élevée.

INTRODUCTION

La salinité du sol ou de l'eau constitue une agression pour les plantes cultivées et est un sujet de plus en plus préoccupant en agriculture. Bien que les scientifiques qui étudient le sol réussissent à minimiser le taux et l'étendue de salinité des sols en utilisant de nombreuses mesures curatives et préventives, les méthodes coûtent très cher et ne peuvent pas être appliquées en particulier dans les pays en voie de développement. Des méthodes directes de sélection et de culture pour l'amélioration de la tolérance au sel des plantes cultivées (Steppuhn et coll., 1991 ; Shannon, 1985) ont été suggérées. Cependant, notre connaissance du mécanisme physiologique de tolérance au sel est encore trop incomplète pour permettre de trouver des paramètres objectifs et rapides pour la mise au point d'importants programmes de sélection (Yeo et Flowers, 1984).

Le mûrier est l'une des principales plantes nourricières du ver à soie (*Bombyx mori*) et est très prometteur pour les pays en voie de développement car il rapporte de l'argent. La sécheresse et la salinité sont les problèmes majeurs de l'agriculture. Bien que la tolérance du mûrier à la sécheresse aie beaucoup été étudiée (Susheelamma et coll., 1992b; Dorcus et Vivekanandan, 1995), à notre connaissance, aucune étude sur le terrain n'a été faite sur la tolérance à la salinité. Ainsi, la tolérance du mûrier à la salinité est pour la première fois testée en plantant directement des boutures de différents génotypes de mûrier dans les terres côtières salines du Vedarannyam, District Q.M. au Taminaldou, en Inde, en employant le potentiel de racinement, l'absorption et la distribution préférentielles des ions comme paramètres clé, la racine étant l'organe touché en premier lieu par la salinité.

MATERIELS ET METHODES

Des boutures de mûrier de huit mois de différents génotypes M-5, MR-2, C-1, BC2-59, Ichinose, Goshorami, Tr-4, Tr-8, Tr-10, G-7, S-30, S-41 et ACC-235 de taille et d'épaisseur uniformes avec au moins trois bourgeons sont plantées en terrain bien fumé dans la zone côtière saline du Vedarannyam, Taminaldu, Inde. Tous les génotypes sont diploïdes excepté Tr-4, Tr-8, Tr-10 et G-5 (triploïdes). Ils sont irrigués trois fois par semaine et désherbés périodiquement.

Les plants de mûrier de 90 jours sont déracinés avec soin pour étudier les pourcentages de reprise et de racinement. Les caractéristiques du potentiel de racinement sont aussi étudiées. Les plants sont ensuite rincés à l'eau distillée, séchés au four, réduits en poudre afin d'analyser les éléments (Na, K et Ca) par la méthode triacide (Jackson, 1967). On extrait des spécimens des plants avec 25% HNO₃ pour l'estimation de Cl en utilisant 0,015N HgNO₃ comme solution titrante et du bleu de méthyl-diphényl-carbazone comme indicateur (Krishnamoorthy et Bagwat, 1990).

RESULTATS ET DISCUSSION

La valeur EC de l'eau d'irrigation s'élève à 4,3 mS/cm mais les valeurs EC du sol varient selon la profondeur (Tableau I). La valeur EC à la surface du sol est plus élevée à cause de l'évaporation continue de l'eau du sol, qui laisse les sels en surface (Sharma et Prihar, 1973).

L'observation de la performance générale des différents génotypes de mûrier (Tableau II), permet de déceler que ACC-235, S-30, S-36, Tr-8, Tr-10 et BC2-59 présentent des pourcentages de bourgeonnement et de racinement plus élevés (80-90%) par ordre respectif. Les caractéristiques de tolérance à l'agression les plus positives : racines plus longues, longueur des pousses, biomasses de racine et de feuille plus élevées se limitent seulement à ces génotypes. On observe de faibles pourcentages de racinement (24-50%) et une croissance et une biomasse réduites chez d'autres génotypes tels que Goshorami, Ichinose, C-1 et S-41.

Le contenu en minéraux (Na, K, Ca et Cl) des feuilles, des tiges et des racines de différents génotypes de mûriers est indiqué dans le Tableau III. Parmi les éléments analysés, K est dominant (12,5-17,5 mg/g poids sec) chez les variétés BC2-59, S-36, S-41, et G-7 mais chez toutes les autres Na domine.

En ce qui concerne la distribution des éléments en fonction des organes, les feuilles contiennent plus de K et de Ca tandis que Na est plus élevé dans les racines. La distribution des chlorures ne présente pas de différence significative entre les feuilles et les racines. Les ions osmotiques minéraux tels que K⁺ et Ca²⁺ sont plus nombreux dans les feuilles de S-36, ACC-235, S-41, S-30 et BC2-59, tandis que les éléments toxiques comme Na⁺ et Cl⁻ sont plus élevés dans les génotypes tels que Goshorami, C-1 et Tr-4.

Le pourcentage d'accumulation de K⁺ par rapport aux autres ions est plus élevé chez S-36, S-41, ACC-235, G-7, S-30 et BC2-59 (Tableau IV), ce qui est corrélié de manière positive avec les pourcentages de germination et de racinement plus élevés et avec les caractéristiques de racinement.

Les expériences d'Afridi (1988), montrent que les plantes tolérantes à la salinité et à la soude présentent une moindre accumulation de Na et de Cl et maintiennent leur spécificité en K et un ratio Na/K inférieur. De plus, la partition des ions dans la plante, les rapports K/Na croissants des racines aux feuilles indiquent que l'absorption et le transport sont sélectifs, et qu'il existe une partition préférentielle des ions entre les organes qui pourrait être attribuée à une tolérance au sel élevée (Mahmood et Malik, 1987).

D'après l'observation générale des données, S-30, S-36, BC2-59, S-41, ACC-235 et G-7 s'avèrent avoir une meilleure capacité de racinement, un rapport K/Na comparativement plus élevé et des niveaux de Na et Cl plus faibles. Cela prouve clairement que la tolérance à la salinité s'accompagne d'une accumulation de K et d'une faible présence de Na et de Cl pour les génotypes prometteurs cités. Ces génotypes de mûrier pourraient être utilisés comme d'excellents matériaux pour étudier la tolérance saline ainsi que de futurs programmes de sélection sur la tolérance saline.

SCREENING OF HIGH YIELDING MULBERRY VARIETIES AGAINST BACTERIAL BLIGHT DISEASE

R.S. TEOTIA* & S. K SEN

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

*Ten high yielding varieties of mulberry (**Morus alba**) i.e. S1, S-799, S-1635, C-766, C-1726, C-1730, Tr-4 and Tr-10 evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute Berhampore, (West Bengal, India) were studied to identify resistant/tolerant variety against bacterial blight disease caused by **Pseudomonas syringae** pv. **mori**. None of the above varieties was found either immune or resistant. However, variety S-799 was found moderately resistant to the disease whereas others were susceptible.*

Key words: Bacterial blight, *Pseudomonas syringae* pv *mori*, mulberry varieties.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) being perennial in nature is often attacked by a number of diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes (Teotia and Sen, 1994). Of these, bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *mori* is the only bacterial disease of much economic importance causing 5 to 10% loss in foliage production (Krishna Prasad and Siddaramaiah, 1978). The disease in addition, causes heavy defoliation in young leaves and impairs the nutritive value of mulberry leaves to feed the silkworms (Sato and Takahashi, 1973) in the rainy season. Disease control in mulberry using pesticides has its own limitations. Therefore, it is safe as also beneficial to cultivate mulberry varieties which are tolerant to disease for commercial silk production. A few germplasm varieties were screened against bacterial blight disease by Shree and Boraiah (1988). However, information is lacking for resistance/tolerance in high yielding mulberry varieties evolved for commercial exploitation in India. Hence, the present investigation was targeted to screen high-yielding varieties of mulberry evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal, India) and to identify genotypes resistant/tolerant to bacterial blight.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted during years 1992 and 1993 using ten high yielding varieties, i.e. S-1, S-799, S-1635, C-763, C-776, C-1726, C-1729, C-1730, Tr-4 and Tr-10 evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal), India. Varieties were grown as low bush at 60 cm × 45 cm spacing in split block design consisting of 40 plots (each plot 300 cm × 300 cm size) in four replication and fertilised with recommended dose of N, P & K @ 300 : 100 : 120 kg/ha/yr respectively in four split dosages after leaf harvest. Plants were pruned in the first week

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

Table 1. Reaction of high yielding varieties of mulberry to bacterial blight disease.**Tableau 1. Réaction de variétés de mûrier à haut rendement à la maladie de la rouille bactérienne.**

Variety / Variété	Infection* / Infestation	PDI*	Reaction**
S1-1	48.26 (44.00)	29.08 (32.62)	S
S-799	33.44 (35.33)	12.61 (20.80)	MR
S-1635	54.57 (47.63)	31.30 (33.98)	S
C-763	57.37 (49.26)	34.68 (36.08)	S
C-766	56.41 (48.68)	33.74 (35.51)	S
C-1726	47.14 (43.36)	28.84 (32.47)	S
C-1729	58.85 (50.12)	36.46 (37.13)	S
C-1730	52.57 (46.48)	30.73 (33.66)	S
Tr-4	67.92 (55.53)	44.94 (42.08)	S
Tr-10	51.59 (45.91)	30.19 (33.32)	S
CD at 5% / Cd à 5%			
Year / Année	1.44	1.19	
Treatment / Traitement	3.21	2.66	
Year × treatment / Année × traitement	NS	NS	

* Mean of two years (1992 & 1993) observation / Moyenne d'observations sur deux ans (1992 & 1993).

** MR = Moderately resistant / Modérément résistante. S = Susceptible / Sensible.

Figures in parenthesis are angular transformed values / Les chiffres entre parenthèses indiquent les transformées angulaires.

of June and observations on the incidence of bacterial blight were recorded under natural severe disease incidence conditions during August for two years (after 70 days of basal pruning in June) by randomly selecting five plants in each replication leaving border rows. Disease severity was calculated from three vigorously growing branches of each plant using 0-5 scale (Mc Kinney, 1923) and the percent disease index (PDI) was calculated using the formula:

$$PDI = \frac{\text{Sum of all numerical ratings} \times 100}{\text{Total number of leaves examined} \times \text{maximum grade (5)}}$$

0 = 5 Scale indicates :

- 0 = No infection
- 1 = 1 - 10% leaf area destroyed by blight
- 2 = 11 - 25% leaf area destroyed by blight
- 3 = 26 - 50% leaf area destroyed by blight
- 4 = 51 - 75% leaf area destroyed by blight
- 5 = 75 - 100% leaf area destroyed by blight

Data recorded during a two years study were pooled and analysed statistically. Varieties were categorised as immune (disease free), resistant (PDI up to 5%), moderately resistant (5.1% - 20% PDI), susceptible (20.1 - 50% PDI) and highly susceptible (above 50% PDI).

RESULTS AND DISCUSSION

Response of genotypes to bacterial blight disease varied significantly (Table I). Among the ten high yielding varieties, least infection percentage (33.44%) and percent disease index (12.61%) was

Table II. Influence of environmental factors on the development of bacterial blight during the study period (1992-1993).

Tableau II. Influence des facteurs climatiques sur le développement de la rouille bactérienne pendant la période d'étude (1992-93).

Year	Month	IP*	PDI*	Temperature			Relative humidity (%)			Rainy day	Total rainy day June to August.
				Min.	Max. (C °)	Daily average	Min.	Max.	Daily average		
AnnéeMois				Temperature			Humidité relative (%)			Nbre total de jours de pluie de pluie	Nbre total de jours de pluie Juin à août
				Min	Max	Moyenne Journalière	Min	Max	Moyenne journalière		
1992	June	—	—	25.0	42.6	33.8	47.0	96.0	71.5	9	32
	Juin										
	July	—	—	24.0	35.0	29.5	68.0	96.4	82.2	14	
	Juillet	—	—								
	August	50.02	29.24	25.0	34.4	29.7	68.2	96.0	82.1	9	
	Août										
		(45.00)(32.53)									
	Average			24.67	37.33	31.0	61.07	96.13	78.6		
	Moyenne										
1993	June	—	—	22.0	36.0	29.0	59.6	98.7	79.15	16	48
	Juin										
	July	—	—	25.0	36.0	30.5	63.5	99.4	81.45	21	
	Juillet										
	August	55.61	33.27	25.2	34.2	29.7	63.6	99.0	81.3	11	
	Août										
		(48.26)(35.00)									
	Average			24.07	35.4	29.7	62.33	99.03	80.3		
	Moyenne										

* Mean of all the ten varieties / *Moyenne des dix variétés.*

Figures in parenthesis are angular transformed values. / Les chiffres entre parenthèses indiquent les transformées angulaires.

recorded in variety S-799 and maximum being 67.92% and 44.94% respectively in variety Tr-4. Higher disease incidence was observed during 1993 which may be presumably due to the higher number of rainy days during the growth season (Table II). The study revealed that none of the variety tested had immunity to bacterial blight disease. As also, there were no resistant entry. However, variety S-799 was found to have moderate resistance to the disease.

In earlier studies the variety S-799 has been reported moderately resistant to *Cercospora moricola* (Teotia *et al.*, 1995) and slow mildewing to *Phyllactinia corylea* (Biswas *et al.*, 1993).

REFERENCES

- BISWAS S. MANDAL, S.K. CHINYA P.K (1993) Development of powdery mildew disease in mulberry and its control. *Sericologia*, 33(3), 653-662.
- KRISHNA PRASAD, K.S., SIDDARAMAIAH A.K. (1978) Bacterial leaf blight of mulberry in Karnataka, India. *Indian J. Seric.*, 17(1), 61-63.
- M.C. KINNEY H.H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.* 26, 195-210.
- SATO M., TAKAHASHI K. (1973) Ecological studies on the bacterial blight of mulberry III. Some factors concerning with the survival of *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambart) Stevans in soil. *J. Seric. Sci. Jpn* 42(3), 213-218.
- SHREE M.P., BORAI AH G. (1988) Incidence of Tukra and bacterial blight of mulberry plants in germplasm bank. *Curr. Sci.*, 57, 1224 -1228.
- TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. *Sericologia*, 34 (1), 1-18.
- TEOTIA R.S., SEN S.K., SINHA S.S. (1995) Effect of pruning time, genotypes and environmental factors on the development of *Cercospora moricola* Cooke on mulberry. *Sericologia*, 35(1), 99-104.

EXAMEN DE LA RESISTANCE DE VARIETES DE MURIERS A HAUT RENDEMENT A LA MALADIE DE LA ROUILLE BACTERIENNE

R.S. TEOTIA* & K. SEN

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, Bengale Ouest, Inde.

Dix variétés de mûrier (*Morus alba*) à haut rendement, S-1, S-799, S-1635, C-766, C-1726, C-1730, Tr-4 et Tr-10 mises au point au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengale Ouest, Inde) ont été étudiées pour identifier des variétés résistantes/tolérantes à la maladie de la flétrissure bactérienne provoquée par *Pseudomonas syringae* pv. *mori*. Aucune des variétés ci-dessus ne s'est révélée immunisée ou résistante. Cependant, la variété S-799 s'avère modérément résistante à la maladie tandis que les autres sont sensibles.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) étant une plante vivace, il est souvent atteint par un certain nombre de maladies provoquées par des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes (Teotia et Sen, 1994). Parmi elles, la flétrissure bactérienne provoquée par *Pseudomonas syringae* pv. *mori* est la seule maladie bactérienne d'importance économique, provoquant une perte de production de feuillage de l'ordre de 5 à 10 % (Krishna Prasad et Siddaramaiah, 1978). De plus, la maladie entraîne une défoliation élevée des jeunes feuilles et détériore la valeur nutritive des feuilles de mûrier pour la nourriture du ver à soie (Sato et Takahashi, 1973) à la saison des pluies. Le lutte contre la maladie chez le mûrier par l'utilisation de pesticides a ses limites. Ainsi, il est sûr et bénéfique pour la production de soie commerciale de cultiver des variétés de mûrier qui tolèrent la maladie. La résistance de quelques variétés à la maladie de la flétrissure bactérienne a été évaluée par Shree et Boraiah (1988). Cependant, on manque d'informations sur la résistance/tolérance de variétés de mûrier à haut rendement mises au point pour l'exploitation commerciale en Inde. Ainsi, le but de la présente étude est de passer en revue des variétés de mûrier à haut rendement mises au point au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengale ouest, Inde) et d'identifier des génotypes résistant/tolérants à la flétrissure bactérienne.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences ont été menées en 1992 et 1993 en utilisant dix variétés de mûrier à haut rendement, S-1, S-799, S-1635, C-763, C-776, C-1726, C-1729, C-1730, Tr-4 et Tr-10 mises au point au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengale ouest, Inde). Les variétés sont cultivées en taille basse à un espacement de 60 cm × 45 cm selon la méthode en blocs séparés comprenant 40 parcelles (chaque parcelle mesurant 300 cm × 300 cm) en quatre répétitions, et traités avec les doses recommandées de N, P et K de 300 : 100 : 120 kg/ha/année respectivement en quatre doses séparées après la récolte des feuilles. Les plants sont taillés après la première semaine de juin et les observations sur l'incidence de la flétrissure bactérienne sont enregistrées, dans des

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

conditions naturelles d'incidence élevée de la maladie en août pendant deux ans (70 jours après la taille basse de juin) en choisissant cinq plants dans chaque répétition de manière aléatoire, exceptées les rangées sur les bords. On calcule la sévérité de la maladie à partir de trois branches vigoureuses pour chaque plant, en utilisant une échelle 0-5 (Mc Kinney, 1923) et l'indice de pourcentage de la maladie (PDI) est calculé en utilisant la formule :

$$PDI = \frac{\text{Somme des taux} \times 100}{\text{Nombre total de feuilles examinées} \times \text{grade maximal (5)}}$$

L'échelle 0-5 indique :

- 0 = Pas d'infestation
- 1 = 1 - 10 % de la surface de la feuille détruite par la flétrissure bactérienne
- 2 = 11 - 25 % de la surface de la feuille détruite par la flétrissure bactérienne
- 3 = 26 - 50 % de la surface de la feuille détruite par la flétrissure bactérienne
- 4 = 51 - 75 % de la surface de la feuille détruite par la flétrissure bactérienne
- 5 = 75 - 100 % de la surface de la feuille détruite par la flétrissure bactérienne

Les données enregistrées pendant une étude sur deux ans sont regroupées et analysées de manière statistique. On procède à une classification des variétés : immunisées (pas de maladie), résistante (PDI jusqu'à 5 %), modérément résistante (PDI de 5,1 % - 20 %), sensible (PDI de 20,1 % - 50 %) et très sensible (PDI supérieur à 50 %).

RESULTATS ET DISCUSSION

La réponse des géotypes à la maladie de la flétrissure bactérienne varie de manière significative (Tableau I). Parmi les dix variétés à haut rendement, le pourcentage d'infestation (33,44 %) et l'indice de pourcentage de la maladie (12,61 %) les plus faibles sont enregistrés pour la variété S-799 et les plus élevés respectivement de 67,92 % et de 44,94 % pour la variété Tr-4. On observe une incidence plus élevée de la maladie en 1993 qui est sans doute due au plus grand nombre de jours de pluie pendant la période de croissance (Tableau II). L'étude révèle qu'aucune des variétés testées n'est immunisée à la maladie de la flétrissure bactérienne. Il n'existe pas non plus de variétés résistantes. Cependant, on observe que la variété S-799 est modérément résistante à la maladie. Des études précédentes ont rapporté que la variété S-799 est modérément résistante à *Cercospora moriola* (Teotia et coll., 1995) et moisit lentement quand elle est atteinte par *Phyllactinia corylea* (Biswas et coll., 1993).

SOME PHYSIO-BIOCHEMICAL CHANGES IN BLACK MILDEW (*MELIOLA AMPHITRICH* FR.) AFFECTED LEAVES OF MULBERRY VARIETIES

R.S. TEOTIA*, T. SENGUPTA & C. DAS

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

*Healthy and diseased leaves (*Meliola amphitricha*) of two mulberry varieties, i.e., S₁ and S₁₆₃₅ evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal, India) were processed to analyse the changes in moisture percentage, relative water content (%), transpiration rate and diffusive resistance among physiological processes and total chlorophyll, carotenoids, total soluble proteins, total soluble sugars, phenols, RNA and amino acids for biochemical aspects. The results revealed that physio-biochemical changes were more pronounced in diseased leaves of variety S₁₆₃₅ than in those of S₁. There was a decrease in the transpiration rate, the relative water content (%), carotenoids, total proteins, sugars, RNA and the amino acid content in diseased leaves of both varieties. The chlorophyll content increased significantly in diseased leaves of variety S₁ and vice-versa in S₁₆₃₅. Phenols accumulated significantly more in the diseased leaves of variety S₁₆₃₅ but the same decreased in variety S₁ while compared to healthy leaves. Moisture loss was insignificant and almost identical in healthy and diseased leaves of both varieties.*

Keywords: *Meliola amphitricha* Fr., mulberry varieties, physio-biochemical changes.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is attacked by a number of diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes (Teotia and Sen, 1994). Many of them are known to alter the biochemical composition and physiological processes in mulberry (Shree and Nataraja, 1993; Teotia and Sen, 1994). The fungus, *Meliola amphitricha*, is known to cause the black mildew disease in many plants (Alexopaulous and Mims, 1985). The same was reported to cause black mildew in mulberry by Teotia (1995). The fungus appears on green mature leaves in the form of black mycelial mat covering the entire upper surface during November to February. It makes leaves less nutritive and unpalatable for silkworms. Hence, the present investigation was made to study physio-biochemical changes in affected leaves of mulberry varieties S₁ and S₁₆₃₅ evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (India).

MATERIALS AND METHODS

Replicated leaf samples of healthy and diseased leaves of the same age (fifth from the apex) were collected from the plants of mulberry varieties S₁ and S₁₆₃₅ grown in the research farm of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal, India), during December and processed to analyse the moisture percentage (by Metler moisture analyser), relative water content (%) (Ritchie *et al.*, 1990), transpiration rate and diffusive resistance using LiCor 1600 steady state

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

porometer among physiological characteristics and total chlorophyll and carotenoids (Arnon, 1949), total soluble proteins (Lowry *et al.*, 1951), total sugars (Morris, 1948), amino acids and phenols (Spies, 1955) and RNA (Kirby, 1956) to study biochemical changes. Three replications were taken for biochemical estimation. The results were subjected to statistical analysis and expressed in mg/g on fresh weight basis.

RESULTS AND DISCUSSION

Observations on physiological status of healthy and diseased leaves of the two varieties of mulberry are given in Table I. It is clear from the results that there was a statistically significant reduction in transpiration rate and relative water content in diseased leaves compared to healthy leaves in both the mulberry varieties. Further, the above changes were significantly higher in mulberry variety S₁₆₃₅ when compared to variety S₁. Loss in moisture percent was insignificant and almost identical in both the varieties while the diffusive resistance increased significantly in affected leaves of variety S₁₆₃₅ but the same was insignificant in variety S₁.

The results of biochemical analysis of healthy and disease leaves indicated that the carotenoids, total soluble proteins, RNA and amino acids reduced significantly in diseased leaves in both the varieties (Table II). It could be that proteins were degraded or utilised by the fungus at a faster rate (Samborski, 1959) and also the RNA and amino acids content, as a result their level came down. Further, there was no significant change in total sugars content of diseased and healthy leaves though their level was reduced in affected leaves. The overall decrease in sugars could be due to their utilisation by the pathogen for its multiplication (Singh *et al.*, 1983).

Table I. Effect of black mildew on physiological characteristic of mulberry leaf.

Tableau I. Effets du mildiou noir sur les caractéristiques physiologiques de la feuille de mûrier.

Variety	Status of leaf	Moisture (%)	Relative water content (%)	Transpiration mol/-2 S ⁻¹	Diffusive Resistance
Variété	Etat de la feuille	Humidité (%)	Teneur relative en eau (%)	Transpiration mol/-2 S ⁻¹	Résistance Diffusion
S-1635	Healthy / Sain	73.5	84.65	37.6	0.29
	Infected / Infesté	70.8	76.7	13.7	1.20
	CD at 5% / CD à 5%	3.07	6.76	9.00	0.62
	SE / Ecart type	0.78	1.72	2.29	0.16
S ₁	Healthy / Sain	73.2	89.0	24.0	0.53
	Infected / Infesté	72.4	84.0	17.8	0.82
	CD at 5% / CD à 5%	7.70	4.04	5.62	0.34
	SE / Ecart type	1.96	1.03	1.43	0.09

Analysis of other biochemical parameters yielded variable results. The chlorophyll 'a', chlorophyll 'b' and total chlorophyll content were found to increase significantly in diseased leaves of variety S₁ whereas these decreased significantly in variety S₁₆₃₅. Variation in chlorophyll content

Table II. Effect of black mildew on biochemical characteristics of mulberry leaf.*Tableau II. Effets du mildiou noir sur les caractéristiques biochimiques de la feuille de mûrier.*

Sl no.	Variety	Adv. Status of leaf	Biochemical parameters (mg/g of fresh weight) <i>Paramètres biochimiques (mg/g de poids frais)</i>								
			Chloro phyll (A)	Chloro phyll (B)	Total chlorophyll	Carote noids	Protein	Sugar	Phenol RNA	Amino acids	
<i>Sl no.</i>	<i>Variété</i>	<i>Etat de la feuille</i>	<i>Chloro phylle (A)</i>	<i>Chloro phylle (B)</i>	<i>Chloro phylle totale</i>	<i>Caroté noïdes</i>	<i>Protéines</i>	<i>Sucres</i>	<i>Phénols</i>	<i>ARN</i>	<i>Acides aminés</i>
I.	S1635	Healthy. <i>Sain</i>	1.83	0.77	2.51	0.06	37.40	33.12	1.42	34.31	5.37
		Infected <i>Infesté</i>	0.81	0.42	1.23	0.03	14.93	31.14	3.20	27.60	2.95
		CD at 5% <i>CD à 5%</i>	0.23	0.07	0.22	0.00	5.76	2.02	0.55	3.32	0.79
		SE / <i>Ecart type</i>	0.06	0.02	0.06	0.06	0.00	1.47	.57	0.85	0.20
II	S1	Healthy <i>Sain</i>	1.06	0.49	1.5	0.04	34.67	38.75	1.37	36.69	4.57
		Infected <i>Infesté</i>	1.29	0.5	1.73	0.04	26.60	36.66	1.20	25.69	3.17
		CD at 5% <i>CD à 5%</i>	0.48	0.12	0.55	0.02	4.33	3.86	0.28	2.33	0.45
		SE / <i>Ecart type</i>	0.12	0.03	0.14	0.00	1.10	0.98	0.07	0.59	0.11

of above varieties may be due to the difference in the activity of chlorophyllase (Kaur and Deshpande, 1980). Further, accumulation of phenols was observed to be significant in diseased leaves of variety S1635 but the concentration of the same was reduced in the affected leaves of variety S1. The observed variation in total phenol content in disease leaves of the above varieties may be attributed to genetic variability in the varieties (Bell, 1981) as in general, increase or decrease in biochemical constituents of diseased leaves was more pronounced in variety S1635 than variety S1 and were statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful thanks are due to Dr S.S Sinha, Ex-Director, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal) India, for encouragement and Shri N.K.Das, Asstt. Director (Statistics) of same station for analysis of data.

REFERENCES

- ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W. (1985) Introductory Mycology. Wiley Eastern Limited, New Delhi, India pp. 316-318.

- ARNON D.I (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in Beta Vulgaris Plant. physiol. 24 (1), 1-15.
- BELL A.A. (1981) Biochemical mechanism of disease resistance. Ann Rev. plant physiol., 32, 21-81.
- KAUR M., DESHPANDE K.B. (1980) Indian phytopathol., 33, 344-345.
- KIRBY K.S. (1956) Biochem. J. 64, 405.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.S., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MORRIS D.L. (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent Science, 107, 254-255.
- RITCHIE S.W., HGUYEN H.T. & HOLADAY A.C. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Sci., 30(1), 105-111.
- SAMBORSKI D.J., FORSYTH F.R., PARSON C. (1958) Metabolic changes in detached wheat leaves florated on benzimidazole and the effect of these changes on rust reactions. Can. J. Bot., 36, 591-601.
- SHREE M.D. & NATARAJA S. (1993) Post-infectional biochemical and physiological changes in mulberry. Curr. Sci. 65(4), 337-341.
- SINGH R., SINGH H.C., SINGH R.R. (1983) Indian J. Mycol. & Pl. Pathol. , 13, 179-182.
- SPIES J.R. (1955) Colorimetric procedure for amino acid and phenol. In: Methods in enzymology. Colonick, S.P. and N O. Kaplan (eds) Vol. III, 461-477.
- TEOTIA R.S. (1995) Black mildew - A new disease of mulberry (*Morus alba* L.). Indian Phytopath., 48(4): 489.
- TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. Sericologia, 34(1), 1-18.

CHANGEMENTS PHYSIO-BIOCHIMIQUES CHEZ DES FEUILLES DE VARIETES DE MURIERS ATTEINTES PAR LE MILDIOU NOIR (*MELIOLA AMPHITRICA* FR)

R.S. TEOTIA*, T. SENGUPTA & C. DAS

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, Bengale ouest, Inde.

*Des feuilles saines et malades (*Meliola amphitricha*) de deux variétés de mûrier, S₁ et S₁₆₃₅ mises en place au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengale Ouest, Inde) sont passées en revue pour analyser les changements du taux d'humidité, de la teneur relative en eau (%), du taux de transpiration et de la résistance à la diffusion pour ce qui est des métabolismes physiologiques et la chlorophylle, les caroténoïdes, les protéines solubles totales, l'ensemble des sucres solubles, les phénols, l'acide ribonucléique et les acides aminés pour ce qui est des aspects biochimiques. Les résultats révèlent que les changements physio-biochimiques sont plus prononcés pour les feuilles malades de la variété S₁₆₃₅ que pour celles de S₁. On observe une baisse du taux de transpiration, du contenu relatif en eau (%), des caroténoïdes, de l'ensemble des protéines, des sucres, des ARN et du contenu en acides aminés dans les feuilles malades des deux variétés. La teneur en chlorophylle augmente sensiblement dans les feuilles malades de la variété S₁ et réciproquement pour S₁₆₃₅. Les phénols s'accumulent sensiblement plus dans les feuilles malades de la variété S₁₆₃₅ mais baissent dans la variété S₁ comparativement aux feuilles saines. La perte en humidité est insignifiante et presque identique entre les feuilles saines et malades des deux variétés.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L) est atteint par de nombreuses maladies provoquées par des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes (Teotia et Sen, 1994). On sait qu'il y en a de nombreuses qui altèrent la composition biochimique et les processus physiologiques du mûrier (Shree et Nataraja, 1993 ; Teotia et Sen, 1994). On sait que le champignon, *Meliola amphitricha* provoque la maladie du mildiou noir chez de nombreuses plantes (Alexopoulos et Mims, 1995). Teotia (1985) a signalé qu'il est responsable du mildiou noir chez le mûrier. Le champignon apparaît sur les feuilles vertes matures sous la forme de mycélium noir couvrant l'ensemble de la surface supérieure, de novembre à juin. Il rend les feuilles moins nutritives et moins agréables pour les vers à soie. Ainsi cette étude a été entreprise dans le but d'étudier les changements physio-biochimiques des feuilles atteintes des variétés de mûrier S₁ et S₁₆₃₅ cultivées au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Inde).

MATERIELS ET METHODES

Des échantillons de feuilles répétées de feuilles saines et malades du même âge (cinquième à partir de l'apex) sont recueillis sur les plants de mûrier des variétés S₁ et S₁₆₃₅ cultivées à la ferme de recherche du Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengale ouest,

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

Inde) en décembre et passées en revue afin d'analyser le pourcentage d'humidité (par un analyseur d'humidité Mettler), la teneur relative en eau (%) (Ritchie et coll., 1990), le taux de transpiration et la résistance à la diffusion en utilisant un poromètre Licor 1600 pour ce qui est des caractéristiques physiologiques et la totalité de chlorophylle et de caroténoïdes (Arnon, 1949), l'ensemble des protéines solubles (Lowry et coll., 1951), l'ensemble des sucres (Morris, 1948), les acides aminés et les phénols (Spies, 1955) et l'acide ribonucléique (Kirby, 1956) afin d'étudier les changements biochimiques. Trois répliques sont prises pour l'estimation biochimique. Les résultats sont analysés de manière statistique et sont exprimés en mg/g sur la base du poids frais.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les observations sur le statut physiologique des feuilles saines et malades des deux variétés de mûrier sont présentées dans le Tableau I. Il est clair d'après les résultats qu'il y a une réduction statistiquement significative du taux de transpiration et de la teneur relative en eau des feuilles malades par rapport aux feuilles saines dans les deux variétés de mûrier. De plus, ces changements sont significativement plus élevés pour la variété de mûrier *S₁₆₃₅* que pour la variété *S₁*.

La perte de pourcentage d'humidité est insignifiante et presque identique entre les deux variétés tandis que la résistance à la diffusion augmente significativement chez les feuilles atteintes de la variété *S₁₆₃₅* mais n'est pas significative pour la variété *S₁*.

Les résultats de l'analyse biochimique des feuilles saines et malades indiquent que les caroténoïdes, les protéines solubles totales, l'acide ribonucléique et les acides aminés baissent significativement chez les feuilles malades des deux variétés (Tableau II). Il se peut que les protéines aient été dénaturées ou utilisées par le champignon à un rythme plus rapide (Samborski, 1959) et par conséquent que les niveaux d'acide ribonucléique et des acides aminés baissent. De plus, il n'y pas de changement significatif pour l'ensemble du contenu en sucres des feuilles malades et saines bien que leur niveau baisse dans les feuilles atteintes. La baisse générale des sucres peut être due à leur utilisation par le pathogène pour sa multiplication (Singh et coll., 1983).

L'analyse d'autres paramètres biochimiques donne des résultats variables. On trouve que la chlorophylle « a », la chlorophylle « b » et la teneur en chlorophylle totale augmentent significativement chez les feuilles malades de la variété *S₁* tandis qu'elles baissent chez la variété *S₁₆₃₅*. La variation de la teneur en chlorophylle peut être due à la différence d'activité de la chlorophyllase (Kaur et Desh Pande, 1980). De plus, on observe que l'accumulation des phénols est significative dans les feuilles malades de la variété *S₁₆₃₅*, mais elle est réduite dans les feuilles malades de la variété *S₁*. La variation du contenu en phénols chez les feuilles malades des variétés ci-dessus peut être attribuée à la variabilité génétique des variétés (Bell, 1981) étant donné qu'en général, la hausse ou la baisse des constituants biochimiques des feuilles malades sont plus prononcées dans la variété *S₁₆₃₅* que pour la variété *S₁* et sont significatifs sur le plan statistique.

FIELD EFFICACY OF SOME SYSTEMIC FUNGICIDES IN CONTROLLING MULBERRY LEAF RUST CAUSED BY *AECIDIUM MORI* BERCLAY

R.S. TEOTIA*, C. ELANGO VAN, S.M.H. QUADRI & B. SHARATCHANDRA

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

*The results of field experiments with mulberry variety S₁ revealed that application of systemic fungicides i.e. Baycor (25 WP), Bayleton (25 WP), Bavistin (50 WP) and Calixin (80 EC) at 0.05 and 0.1 percent concentrations significantly reduced the severity of leaf rust caused by *Aecidium mori*. Bayleton was found highly effective at both concentrations tested giving 85 and 93% disease control followed by Baycor, Calixin and Bavistin with 79.2, 78.5 and 77.4% control at 0.1 percent respectively. The disease resulted in maximum defoliation loss of 26.0 percent without fungicidal protection and significantly reduced leaf yield. Significantly higher leaf yield was obtained due to Bayleton (9575.5 and 10 375.0 kg/ha), followed by Bavistin (8991.7 and 9273.5 kg/ha) and Baycor (8850.8 and 9017.1 kg/ha at 0.05 and 0.10 percent concentrations respectively) in comparison to control (7429.0 kg/ha). The economic analysis indicated that net gain per rupee invested over control was highest by spraying Bavistin.*

Keywords: Mulberry, leaf rust, disease severity, fungicides, defoliation, efficacy, economics.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) an important plantation crop is grown under wide range of ecological conditions for rearing silkworms (*Bombyx mori* L.). It is affected by a large number of diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes (Teotia and Sen, 1994). Amongst these, leaf rust caused by *Aecidium mori* Berclay has been reported by several workers (Boraiah *et al.*, 1987; Hector, 1927; Sydow *et al.*, 1906; Sydow and Sydow, 1907) from different temperate and tropical regions in India. The disease appears predominantly during September to March with symptoms consisting of irregular reddish brown pinhead sized pustules on leaves, bud shoots and petioles. It is known to bring down the nutritive value of leaves and to hasten senescence and defoliation (Wang, 1980). Information on fungicidal control of the disease is meagre and in piece-meal (Teotia *et al.*, 1994; Wang, 1980) and therefore warrants extensive studies under field conditions. The present study to evaluate some systemic fungicides for the control of leaf rust and their economics for commercial use was an effort towards filling up aforesaid gaps in disease control.

MATERIALS AND METHODS

Four systemic fungicides i.e., 'Baycor' 25 WP (a.i.g. Bitertanol), 'Bayleton' 25 WP (Triadimefon), 'Bavistin' 50 WP (Carbendazin) and 'Calixin' 80 EC (Tridemorph) were tested at 0.05 and 0.1 percent concentration applied twice at interval of 25 days. The first spray was given after 30

* Present address : Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko - 781 123, Kamrup (Assam), India.

days of ground level pruning on appearance of disease naturally. There were nine treatments, including a water sprayed control. The experiment was laid out at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal), twice during 1994-95 in a randomised block design with three replications and plot size of 12' × 10' (3.6 m × 3 m). The cultivar, S₁ of mulberry susceptible to the leaf rust disease was grown as bush at 2' × 1.5' (60 m × 45 cm) spacing. Recommended package of practices were followed in raising the crop.

Observations on disease severity were recorded 25 days after second spray. Leaves of five vigorous branches/replication were graded at random and data on disease incidence were recorded using 0-5 scale (Govindaiah *et al.*, 1989). The percent disease index (PDI) and percent efficiency of disease control (PEDC) were calculated by the following formulae :

$$\text{PDI} = \frac{\text{Sum of all numerical ratings}}{\text{Number of leaves scored} \times \text{maximum grade (5)}} \times 100$$

$$\text{PEDC} = \frac{\text{PDI in control} - \text{PDI in treatment}}{\text{PDI in control}} \times 100$$

In order to assess the effect of disease on defoliation, the data were recorded on the total number of intact leaves per plant from randomly selected ten branches of each replication. Further, to assess the impact of fungicides on biological yield, observations were recorded on shoot yield and leaf yield (kg) per plot and were computed for production per unit area.

In calculating the economic analysis of different fungicides per hectare, the cost of fungicides, application charges (Baycor (25 WP), Rs. 2766.40, Rs. 5532.80 ; Bayleton (25 WP), Rs. 3334.50, Rs. 6669.00 , Bavistin (50 WP) Rs. 287.14, Rs. 574.28 and Calixin (80 EC) Rs. 491.28, Rs. 982.57 at 0.05 and 0.1 percent (a.i), respectively, and Rs. 98.8 per spray as application charge) and leaf yield Rs. 2/- per kg were taken into consideration. The quantity of fungicides required was worked out on the basis of volume of water applied which varied as 312.5 and 625 litres per hectare for the first and second spray ,respectively, depending upon the growth of plant.

RESULTS AND DISCUSSION

The data presented in Table I revealed that application of all fungicides significantly reduced the infection percentage as well as disease severity of rust on foliage compared to the control. Bayleton, however, exhibited the highest efficacy in disease control (85.2 and 93.3% PEDC) followed by Baycor (72.7 and 79.2%), Calixin (75.8 and 78.5 %) and Bavistin (70.6 and 77.4%) at 0.05 and 0.1 percent concentrations respectively. These findings are in confirmation with Teotia *et al.* (1994) barring efficacy of Bavistin which has given better results in this study. Further, maximum defoliation per branch (26.0%) observed in the control leads to an indication that *A. mori* impairs host physiology, resulting into forced senescence. This adverse affect was put back to normal by disease control due to fungicides. Defoliation was minimised to 12.4% by Bayleton (0.1%) sprays (Table III) which appeared to be due to natural ageing in the plants. These findings that *Aecidium mori* hastens senescence and defoliation in mulberry support the earlier report (Wang, 1980).

The fungicidal protection resulted in higher biological yield in comparison to control (Table II). Total intact leaves/branch were observed higher in Bayleton treatments which had contributed greatly to stabilise total biomass and leaf yield per plot over control and followed by Bavistin, Baycor and Calixin treatments. Similarly, the net gain in leaf yield/hectare over control was highest in Bayleton (28.7 and 39.7%) followed by Bavistin (21.0 and 24.8%), Baycor (19.1 and 21.4%) and Calixin (12.4 and 14.8%) at 0.05 and 0.1 percent, respectively). A comparison within fungicides showed that Bayleton (at 0.05 and 0.1 percent) and Bavistin (at 0.1 percent) treatments were effective at par statistically for yield characteristics. Their application was significant in reducing disease incidence and stabilising leaf yield.

Table I. Effect of systemic fungicides on the development of leaf rust in mulberry (average of two seasons).*Tableau I. Effet de fongicides systémiques sur le développement de la rouille dans la feuille de mûrier (moyenne sur deux saisons)*

Fungicide <i>Fongicide</i>	Dose (%)	Inf (%)	PDI (%)	PEDC (%)
Baycor	0.05	25.7 (30.5)	8.0 (16.4)	72.7
	0.10	20.9 (27.2)	6.1 (14.3)	79.2
Bayleton	0.05	19.2 (26.0)	4.4 (12.1)	85.2
	0.10	9.4 (17.9)	2.0 (8.1)	93.3
Bavistin	0.05	26.7 (31.1)	8.6 (17.0)	70.6
	0.10	24.4 (29.6)	6.6 (14.9)	77.4
Calixin	0.05	24.3 (29.5)	7.1 (15.4)	75.8
	0.10	22.9 (28.6)	6.3 (14.5)	78.5
Control / <i>Témoin</i>	Water Spray <i>Vaporisation d'eau</i>	45.3 (42.3)	29.2 (32.7)	
CD at 5 %		3.7	2.51	
SE		1.30	0.9	

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

Inf: Infection / *Infestation*. **PDI:** Percent disease index / *Index de pourcentage de la maladie.*

The economic analysis of fungicidal sprays indicated that spraying with Bavistin (50 WP) at 0.1 percent realised higher net returns and net gain per rupee invested over control of rupees 17775.1/hectare and 3.7, respectively (Table IV). The net gain with Calixin and Bayleton sprays were less economical, though the latter was most effective to control the disease while Baycor showed negative economics. The reasons of negative analysis for Baycor and Bayleton fungicides are their high cost.

Table II. Effect of fungicides on the biomass and leaf yield of mulberry (average of two seasons).*Tableau II. Effet des fongicides sur la biomasse et le rendement en feuilles du mûrier (moyenne sur deux saisons).*

Fungicide	Dose (%)	Intact leaves/branch (nos)	Biomass/plot (kg)	Leaf yield/plot (kg)	Leaf yield hectare (kg)	Gain over control (%)
<i>Fongicide</i>	<i>Dose (%)</i>	<i>Nombre de feuilles intactes/branche</i>	<i>Biomasse/parcette (kg)</i>	<i>Rendement en feuilles par parcette (kg)</i>	<i>Rendement en feuilles par hectare (kg)</i>	<i>Gain par rapport au témoin (%)</i>
Baycor	0.05	23.9	24.0	11.5	8850.8	19.1
	0.10	23.4	25.4	11.8	9017.3	21.4
Bayleton	0.05	25.4	27.4	12.6	9575.5	28.7
	0.10	27.5	29.5	13.5	10375.1	39.7
Bavistin	0.05	24.1	26.3	11.7	8991.7	21.0
	0.10	23.7	27.0	12.1	9273.5	24.8
Calixin	0.05	23.8	23.9	10.9	8351.3	12.4
	0.10	23.8	24.2	11.1	8530.6	14.8
Control / Témoin	W/S	22.2	21.2	9.7	7429.0	—
CD at 5%		2.8	2.4	1.1	658.30	
CD at 5%						
SE		1.0	0.8	0.4	291.0	

SE: Standard error / *Ecart type.***Table III.** Effect of fungicides on defoliation caused by leaf rust disease in mulberry.*Tableau III. Effet des fongicides sur la défoliation provoquée par la rouille de la feuille chez le mûrier.*

Fungicide sprays	Total leaves /branch (Nos)	Intact leaves/branch (Nos.)	Defoliation (%)	Decrease in defoliation over control (%)
<i>Traitements fongicides</i>	<i>Nombre total de feuilles /branche</i>	<i>Nombre de feuilles intactes (%) par branche</i>	<i>Défoliation (%)</i>	<i>Baisse de la défoliation par rapport au témoin (%)</i>
A. protected/ Protégé				
Bayleton (25 wp)	30.5	25.4	16.7	35.8
@ 0.05%				
Bayleton (25 wp)	31.4	27.5	12.4	52.3
@ 0.1%				
Bavistin (50 wp)	30.2	24.1	20.2	22.3
@ 0.1%				
B. Unprotected/ Non-protégé				
Control (Water spray)	30.0	22.2	26.0	—
Témoin (Vaporisation d'eau)				

Table IV. Economics of fungicides in the management of leaf rust disease of mulberry.

Tableau IV. Etude des fongicides d'un point de vue économique dans le contrôle de la maladie de la rouille de la feuille de mûrier.

Fungicide	Concentration (%)	Leaf yield (kg / ha)	Gain in leaf production (kg / ha)	Gross return (Rs./ha)	Cost of application (Rs./ha)	Net Return (Rs./ha)	Net gain per rupee invested over control
<i>Fongicide</i>		<i>Rendement en feuilles (kg / ha)</i>	<i>Gain de production en feuilles (kg / ha)</i>	<i>Profit brut (Rs / ha)</i>	<i>Coût de l'application (Rs / ha)</i>	<i>Profit Net (Rs/ ha)</i>	<i>Gain net par roupie investie par rapport au témoin</i>
Baycor	0.05	8850.8	1421.8	17701.6	2964.0	14737.6	(-) 0.04
	0.01	9017.3	1588.3	18034.6	5730.4	12304.2	(-) 0.44
Bayleton	0.05	9575.5	2146.5	19151.0	3532.1	15618.9	0.21
	0.01	10375.1	2946.1	20750.2	6866.6	13883.6	(-) 0.14
Bavistin	0.05	8991.7	1562.7	17983.4	484.7	17498.7	5.44
	0.10	9273.5	1844.5	18547.0	771.9	17775.1	3.78
Calixin	0.05	8351.3	922.3	16702.6	688.9	16013.7	1.68
	0.10	8530.6	1101.6	17061.2	1180.2	15881.0	0.87
Control	Water spray	7429.0	-	14858.0	0.00		
Témoin	Vaporisation d'eau						

It is concluded that all the fungicides i.e Bayleton, Baycor, Bavistin and Calixin are effective to control the leaf rust disease and they had additive effects on yield. Bayleton reducing the disease incidence maximally stabilized higher leaf yield whereas Calixin the lowest. However, Bavistin was found most economical as well as being safe to silkworms also (Siddaramaiah and Krishna Prasad, 1978).

ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful thanks are due to Shri N.K. Das, Assistant Director (Statistics) Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal for help in analysis of data.

REFERENCES

- BORAIAH G., SHREE M.P., NARAYANA GOWDA S.N. (1987) Screening of mulberry plants for foliar diseases in the germplasm bank, Sericologia, 27(2), 165-176.
- HECTOR G.P. (1927) Annual Report of economic botanist to the Government of Bengal for the year 1925-26. Appendix I, pp. I-VI.
- GOVINDAIAH SHARMA, D.D., SENGUPTA K., GUNASEKHAR V., SURYANARA YAN N., MADHAVA RAO, Y.R. (1989). Screening of mulberry varieties against major fungal diseases. Indian J. Seric., 28, 207-213.
- SIDDARAMAIAH A.L., KRISHNA PRASAD K.S. (1978) Laboratory evaluation of fungicides against *Cercospora moricola* Cooke. Indian J. Seric., 17, 33-36.
- SYDOW H., SYDOW P., BUTLER E.J. (1906) Fungi indiae orientalis. Pars I, Ann. Mycol., 4, 424-425.
- SYDOW H., SYDOW P., (1907) Fungi indiae orientalis. Pars II, Ann. Mycol., 5, 405-573.

- TEOTIA R.S., MANDAL S. K., SEN, S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control, *Sericologia*, 34(1), 1-18.
- TEOTIA R.S., MANDAL S.K (1994) Studies on the fungicidal control of leaf rust disease (*Aecidium mori* Berclay) of mulberry, *Sericologia*, 34(3), 555-557.
- WANG H. (1980) Rust of mulberry (*Aecidium mori*) Nat. Sci. Counc. Mou 8, 604-615.

EFFICACITE SUR LE TERRAIN DE FONGICIDES SYSTEMIQUES CONTRE LA ROUILLE DE LA FEUILLE DE MURIER PROVOQUEE PAR *AECIDIUM MORI* BERCLAY

R. S. TEOTIA, C. ELANGO VAN, S.M.II. QUADRI & B. SHARATCHANDRA

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, Bengale Ouest, Inde.

Les résultats d'expériences sur le terrain avec la variété de mûrier S1 révèlent que l'application de fongicides systémiques tels que Baycor (25 WP), Bayleton (25 WP), Bavistin (50 WP) et Calixin (80 EC) à des concentrations de 0,05 et 0,1 % réduisent de manière significative la sévérité de la rouille de la feuille provoquée par *Aecidium mori*. Bayleton s'avère très efficace aux deux concentrations testées et présente un contrôle de la maladie de 85 et 93 %, suivis par Baycor, Calixin et Bavistin avec un contrôle respectivement de 79,2, 78,5 et 77,4 % à 0,1 %. La maladie provoque une perte de défoliation maximum de 26 % sans protection fongique et diminue le rendement en feuilles de manière significative. Un rendement en feuilles sensiblement plus élevé est obtenu avec Bayleton (9575,5 et 10 375 kg/ha), suivis par Bavistin (8991,7 et 9273,5 kg/ha) et Baycor (8850,8 et 9017,1 kg/ha) à des concentrations respectivement de 0,05 et 0,10 % par rapport au témoin (7429 kg/ha). L'analyse économique indique que le gain net par roupie investie par rapport au témoin est le plus élevé avec des vaporisations de Bavistin.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.), importante plante de culture pour l'élevage du ver à soie (*Bombyx mori* L.), est cultivé dans des conditions écologiques variées. Il est affecté par un grand nombre de maladies provoquées par des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes (Teotia et Sen, 1994). Parmi eux, la rouille de la feuille causée par *Aecidium mori* Berclay a été rapportée par plusieurs chercheurs (Boraiah et coll., 1987 ; Hector, 1927 ; Sydow et coll., 1906 ; Sydow et Sydow, 1907) dans différentes régions tempérées et tropicales en Inde. La maladie apparaît principalement de septembre à mars avec les symptômes suivants : pustules de la taille d'une épingle d'un marron rougeâtre sur les feuilles, les pousses bourgeonnantes et les pétioles. On sait qu'elle réduit la valeur nutritive des plantes et accélère la sénescence et la défoliation (Wang, 1980). L'information sur le contrôle fongique de la maladie est maigre et morcelée (Teotia et coll., 1994 ; Wang, 1980) et nécessite des études approfondies sur le terrain. La présente étude qui se propose d'évaluer certains fongicides systémiques contrôlant la rouille de la feuille, notamment d'un point de vue économique en vue d'une utilisation commerciale a été entreprise dans l'optique de combler les manques en matière de contrôle de la maladie, cités plus hauts.

MATERIELS ET METHODES

Quatre fongicides systémiques « Baycor » 25 WP (a.i.g Bitertanol), « Bayleton » 25 WP (Triadimefon), « Bavistin » 50 WP (Carbendazin) et « Calixin » 80 EC (Tridemorph) sont testés à des concentrations de 0,05 et 0,1 % appliquées deux fois à un intervalle de 25 jours. La première vaporisation a lieu 30 jours après la taille au sol à l'apparition naturelle de la maladie. Il y a neuf traitements y compris un témoin vaporisé à l'eau. L'expérience a été organisée deux fois en 1994-95

au *Central Sericultural Research and Training Institute*, Berhampore (Bengale Ouest) selon la méthode des blocs aléatoires, avec trois répétitions et une parcelle de $12' \times 10'$ ($3,6 \times 3\text{ m}$). Le cultivar S_1 de mûrier sensible à la rouille est cultivé en buisson à un espacement de $2' \times 1,5'$ ($60\text{ m} \times 45\text{ cm}$). L'ensemble des pratiques recommandées est suivi pour cultiver la plante.

Les observations sur la sévérité de la maladie sont enregistrées 25 jours après la deuxième vaporisation. Les feuilles de cinq branches/répétitions vigoureuses sont classées au hasard et les données sur l'incidence de la maladie sont enregistrées en utilisant une échelle 0-5 (Govindaiah et coll., 1989). L'indice de pourcentage de la maladie (PDI) et l'efficacité en pourcentage du contrôle de la maladie (PEDC) sont calculés en suivant les formules :

$$\text{PDI} = \frac{\text{Somme de tous les indices numériques}}{\text{Nombre de feuilles atteintes} \times \text{indice maximum (5)}} \times 100$$

$$\text{PEDC} = \frac{\text{PDI du témoin} - \text{PDI en traitement}}{\text{PDI du témoin}} \times 100$$

Afin d'évaluer l'effet de la maladie sur la défoliation, les données quant au nombre total de feuilles intactes par plant de dix branches choisies aléatoirement pour chaque répétition sont enregistrées. De plus, pour évaluer l'impact des fongicides sur le rendement biologique, les observations sont enregistrées sur le rendement en pousses et le rendement en feuilles (kg) par parcelle et pour calculer la production par unité de surface.

Pour procéder à l'analyse économique de différents fongicides par hectare, le coût des fongicides et les frais de chaque application sont pris en considération : Baycor (25 WP), 2766,40 roupies, 5532,80 roupies ; B0EC Bayleton (25 WP), 3334,50 roupies, 6669 roupies ; Bavistin (50 WP) 287,14 roupies, 574,28 roupies et Calixin (80 EC) 491,28 roupies, 982,57 roupies respectivement à 0,05 et 0,1 % (a.i), et un coût d'application par vaporisation de 98,8 roupies. Un revenu de 2 roupies par kg de feuilles est pris également en compte. La quantité de fongicides nécessaire est calculée sur la base du volume d'eau appliqué qui varie entre 312,5 et 625 litres par hectare pour la première et la deuxième vaporisation, respectivement, en fonction de la croissance de la plante.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le tableau I montrent que l'application de tous les fongicides réduit de manière significative le pourcentage d'infestation et la sévérité de la maladie de la rouille sur le feuillage par rapport au témoin. Cependant, Bayleton, présente l'efficacité la plus élevée dans le contrôle de la maladie (PEDC de 85,2 et 93,3 %) suivis par Baycor (72,7 et 79,2 %), Calixin (75,8 et 78,5 %) et Bavistin (70,6 et 77,4 %) à des concentrations respectives de 0,05 et 0,1 pour cent. Ces observations confirment celles de Teotia et coll., excepté l'efficacité de Bavistin qui donne de meilleurs résultats dans cette étude. De plus, la défoliation maximum par branche (26 %) observée chez le témoin indique que *A. mori* dénature la physiologie de l'hôte, ce qui provoque une sénescence forcée. Cet effet adverse revient à la normale lorsqu'on lutte contre la maladie avec des fongicides. Les vaporisations de Bayleton (0,1 %) minimisent la défoliation (12,4 %) (Tableau III) due au vieillissement naturel des plantes. Ces observations sur le fait qu'*Aecidium mori* accélère la sénescence et la défoliation du mûrier confirment les rapport précédents (Wang, 1980).

La protection fongique donne un rendement biologique plus élevé comparativement au témoin (Tableau II). Le nombre total de feuilles intactes par branche est plus élevé avec les traitements au Bayleton qui contribuent grandement à stabiliser la biomasse totale et le rendement en feuilles par parcelle comparativement au témoin, suivis par les traitements à la Bavistin, au Baycor et à la Calixin. De même, le gain net du rendement en feuilles par hectare comparativement au témoin est plus élevé

pour Bayleton (28,7 et 39,7 %) suivis par Bavistin (21 et 24,8 %), Baycor (19,1 et 21,4 %) et Calixin (12,4 et 14,8 %) à 0,05 et 0,1 pourcent respectivement. Une comparaison entre les fongicides montre que les traitements Bayleton (à 0,05 et 0,1 %) et Bavistin (à 0,05 et 0,1 %) sont statistiquement aussi efficaces en ce qui concerne les caractéristiques de rendement. Leur application réduit l'incidence de la maladie et permet de stabiliser le rendement en feuilles.

L'analyse économique des vaporisations de fongicides indique que les vaporisations de Bavistin (50 WP) à 0,1 % réalisent les gains nets et le gain net par roupie investie les plus élevés comparativement à ceux du témoin respectivement de 17775,1 roupies par hectare et 3,7 (Tableau IV). Le gain net avec les vaporisations de Calixin et de Bayleton est moins important, bien que ce dernier soit le plus efficace pour lutter contre la maladie tandis que les résultats économiques de Baycor sont négatifs. Les fongicides Baycor et Bayleton présentent des résultats économiques négatifs en raison de leur coût élevé.

En conclusion, tous les fongicides, en l'occurrence Bayleton, Baycor, Bavistin et Calixin sont efficaces pour lutter contre la maladie de la rouille de la feuille et ils ont des effets positifs sur le rendement. Cependant, Bavistin s'avère le plus économique et il est de plus sans danger pour les vers à soie (Siddaramaiah et Krishna Prasad, 1978).

EFFECT OF PRUNING TIME, GENOTYPES AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF *AECIDIUM MORI* BERCLAY ON MULBERRY

R.S. TEOTIA* & S.K. SEN

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

Development of leaf rust (Aecidium mori) was studied during 1990-91 and 1991-92 on ten high yielding varieties of mulberry, i.e. S-1, S-799, S-1635, C-763, C-776, C-1726, C-1729, C-1730, Tr-4 and Tr-10, evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal, India) in relation to pruning time, genotypes and environmental factors. The disease incidence was significantly low when plants were pruned in the second week of January and February. On the other hand, plants pruned during October, November and December were found to be infected maximally. Variety S-1635 was observed to be the least infected consistently throughout the study followed by C-1729, C-1730, and C-1726 and categorised as comparatively resistant, whereas the maximum disease incidence was recorded in Tr-10 followed by S-799, C-776 and C-763. Besides, effect of genotypes and pruning time individually as well as their interaction were found to be highly significant. The higher incidence of leaf rust during autumn and winter was discussed in relation to the prevalence of favourable environmental factors during the growth season.

Keywords: *Aecidium mori*, pruning time, disease incidence, genotype reaction, environmental factors.

INTRODUCTION

Leaf rust is a common foliar disease of mulberry caused by *Aecidium mori* Berclay (Teotia and Sen, 1994). It is prevalent during winter and spring season and brings down the nutritive value of leaves and hastens yellowing, senescence and defoliation (Wang, 1980). A few chemicals are known to control the disease (Teotia *et al.*, 1994; Wang, 1980). Management of diseases through cultivation of resistant/tolerant varieties and appropriate cultural practices is the best method of disease control both in terms of economy as well as environmental hazards of chemicals particularly to silkworms. Identification of resistant genotypes to leaf rust is still at juvenile stage (Boraiah *et al.*, 1987) and information on its cultural control is lacking. Hence in the present study emphasis was given to understand the effect of pruning schedule, high yielding genotypes and environmental factors on the development of leaf rust disease on mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted during 1990-91 and 1991-92 on two years old potted plants (pot size: 37.5 cm diameter) of ten high yielding mulberry varieties, i.e. S-1, S-799, S-1635, S-763, C-776, C-1726, C-1729, C-1730, Tr-4 and Tr-10 evolved at the Central Sericultural Research and Training

* Present address : Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko - 781 123, Kamrup (Assam), India.

Institute, Berhampore (West Bengal, India). Five sets comprising five replications of all the ten high yielding varieties were kept in simple randomised design. Sets were pruned following the schedule in Table I.

To maintain the plants, recommended doses of N:P: K fertilisers (300 :180 : 120 kg/ha/yr) were applied in the form of urea (N), single super phosphate (P₂O₅) and muriate of potash (K₂O) after conversion into pot doses (considering the surface area of pots) after pruning. Watering of the potted plants was done regularly twice per week with tap water of agricultural sources.

The plants were left to be infected by *Aecidium mori* under natural conditions. The disease was appraised 60 days after pruning of each set (Table I) following the method of Teotia *et al.*, (1994). Percent disease index (PDI) was calculated using the formula:

$$\text{PDI} = \frac{\text{Sum of all numerical ratings} \times 100}{\text{Total number of leaves examined} \times \text{Max. grade (5)}}$$

The numerical ratings were obtained by multiplying the number of leaves with their respective grading as given below.

- 0 = No infection
- I = 1-10% leaf area infected
- II = 11-25% leaf area infected
- III = 26-50% leaf area infected
- IV = 51-75% leaf area infected
- V = 76-100% leaf area infected

RESULTS AND DISCUSSION

Development of leaf rust varied significantly in all the high yielding varieties (HYV) of mulberry. Of ten HYV tested, none was found immune or resistant. However, variety S-1635 was found to be least infected consistently throughout the study followed by C-1729, C-1730 and C-1726. On the other hand, the maximum infection percentage (60.45%) and PDI (23.52%) were recorded in variety Tr-10 followed by S-799, C-776 and C-763 where the mean infection percentage and PDI were recorded to be 55.20% (23.20%), 51.78% (23.10%) and 59.03% (22.66%) respectively (Table II).

Table I. Schedule for pruning the plants and recording of observations on the incidence of leaf rust.

Tableau I. Calendrier des tailles des plants et d'enregistrement des observations sur l'incidence de la rouille de la feuille.

Sets	Pruning time (IInd week)	Recording of observation (IInd week)
Lots	Période de taille (Deuxième semaine)	Enregistrement des observations (Deuxième semaine)
I	October / Octobre	December / Décembre
II	November / Novembre	January / Janvier
III	December / Décembre	February / Février
IV	January / Janvier	March / Mars
V	February / Février	April / Avril

Table II. Effect of pruning time and genotypes on the development of leaf rust on mulberry.

Tableau II. Effets de l'époque de taille et des génotypes sur la contamination par la rouille de la feuille chez le mûrier.

Varieties	Pruning time / <i>Epoque de la taille</i>												Mean Value
	October		November		December		January		February				
<i>Variétés</i>	<i>Octobre</i>		<i>Novembre</i>		<i>Décembre</i>		<i>Janvier</i>		<i>Février</i>		<i>Valeur Moyenne</i>		
	IP	PDI	IP	PDI	IP	PDI	IP	PDI	IP	PDI	IP	PDI	
S1	75.33	21.41	50.30	19.08	52.88	27.04	32.22	14.90	48.51	14.77	51.85	19.44	
S-799	73.03	23.81	61.11	32.57	56.34	29.04	40.29	15.96	45.24	14.63	55.20	13.20	
S-1635	75.35	16.64	47.76	18.80	55.64	21.25	28.58	7.56	33.29	5.89	48.14	14.01	
C-763	71.76	25.69	64.95	25.27	72.17	36.48	34.15	11.79	47.13	14.06	58.03	22.66	
C-776	69.87	28.03	52.50	28.08	63.36	35.57	34.62	11.56	38.57	12.24	51.78	23.10	
C-1726	72.30	18.14	54.38	22.80	59.21	27.48	40.82	9.72	42.56	9.42	53.85	17.51	
C-1729	64.33	15.25	54.33	22.70	68.84	28.67	38.20	8.92	31.19	6.43	51.38	16.39	
C-1730	72.43	18.90	49.09	18.52	66.38	25.36	40.92	10.95	35.68	8.57	52.90	16.46	
Tr-4	74.31	26.64	61.67	26.76	75.43	33.36	24.63	7.43	34.21	9.34	54.05	20.71	
Tr-10	80.19	27.46	64.41	29.10	79.80	36.16	36.17	13.61	41.67	11.26	60.45	23.52	
Means	72.89	22.20	56.05	24.37	65.00	30.04	35.06	11.24	39.81	10.66	—	—	
<i>Moyennes</i>													

CD at 5% for IP (Infect) / CD à 5% pour IP (Pourcentage d'infestation)

Year / Année: 1.737

Variety × Pruning time: 8.684

Variety / Variété: 3.884

Year × Variety × Pruning time

Pruning time / *Epoque de taille*: 2.746

Année × Variété × *Epoque de taille*: 12.282

Year × Variety / Année × Variété: 5.492

Standard Error / *Ecart type*: 4.386

Year × Pruning time Année × *Epoque de taille*: 3.884

CD at 5 % for PDI (Percentage disease index) / CD à 5% pour PDI (Indice de pourcentage de la maladie)

Year / Année: 0.675

Variety × Pruning time

Variety / Variété: 1.508

Variété × *Epoque de taille*: 3.373

Year × Variety / Année × Variété: 2.133

Year × Variety × Pruning time

Year × Pruning time

Année × Variété × *Epoque de taille*: 4.770

Année × *Epoque de taille*: 1.508

Standard Error / *Ecart type*: 1.704

Further, the development of the disease was also markedly affected by the seasonal variations. In general, the incidence of leaf rust was significantly higher in the sets that were pruned and grown during autumn and winter (Set I: 72.89%; 22.20%), (Set II: 56.05%; 24.37%) and (Set III: 65.00%; 30.04% infection percentage and PDI respectively). All the varieties were infected maximally when pruned in the second week of December followed by November and October and least when pruned in January and February. Besides, effects of genotypes and pruning time individually as well as their interactions were found to be highly significant (Table III). The variability among genotypes to *Aecidium mori* may be attributed to environmental factors at the experimental site during the growth season and are governed by certain genes (Bell, 1981).

Table III. Analysis of variance (Mean sum of squares)

Tableau III. Analyse de variance (Somme moyenne des carrés)

Source	DF	PDI
Replication / Réplicat	2	2197187 E + 01
Year / Année	1	4793574 E + 04**
Variety / Variété	9	355834 E + 03**
Year × Variety / Année × Variété	9	4454638 E + 02**
Pruning time / Epoque de taille	4	4324190 E + 04**
Year × Pruning time / Année × Epoque de taille	4	8859275 E + 04**
Variety × Pruning time / Variété × Epoque de taille	36	4831761 E + 02**
Year × Variety × Pruning Time / Année × Variété × Epoque de taille	36	7609730 E + 02**
Error / Ecart	198	8706597 E + 01

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

PDI = Percent disease index / Index de pourcentage de la maladie. DF = Degree of freedom / Degrés de liberté.

Table IV. Effect of enviromental factors on the development of leaf rust.

Tableau IV. Effet des facteurs climatiques sur la propagation de la rouille de la feuille.

Year	Growth period	Disease incidence		Environmental factors						
		IP	PDI	Temp (C°)			R.H. (%)			Rainfall Rainy days
			(%)	Max.	Min.	Daily average	Max.	Min.	Daily average	(mm)
Année	Période de Croissance	Incidence de la maladie		Facteurs agro- climatiques						
		IP	PDI	Temp			R.H. (%)			
			(%)	Max.	Min.	Moyenne journalière	Max	Min	Moyenne journalière	Précipi tations de pluie (mm)
1990-91	Oct-Dec.	68.86	23.16	28.78	15.56	22.17	95.50	57.50	76.50	82
	Nov-Jan.	44.94	11.73	26.27	11.02	18.65	91.00	51.00	71.00	—
	Dec-Feb.	42.57	9.50	26.20	9.48	17.84	87.00	41.17	64.09	—
	Jan-Mar.	57.52	19.96	20.60	12.33	16.47	77.30	47.50	62.40	—
	Feb-Apr.	46.92	14.15	33.29	13.59	23.44	74.25	42.67	58.46	—
1991-92	Oct-Dec.	76.92	21.24	28.11	15.75	21.93	96.00	55.50	75.75	148.5
	Nov-Jan.	67.16	37.01	24.55	12.19	18.37	91.67	49.83	70.75	65.0
	Dec-Feb.	87.44	50.57	24.03	11.65	17.84	91.60	49.67	70.64	22.0
	Jan.-Mar.	12.60	2.51	27.18	14.78	20.18	89.33	36.33	62.84	34.0
	Feb.-Apr.	32.71	7.16	34.66	18.33	26.50	84.00	34.33	59.33	19.5

IP = Infection percentage / Pourcentage d'infestation.

PDI = Percent disease index / Indice de pourcentage de la maladie.

In the present study, effect of abiotic factors like maximum temperature (°C), minimum temperature (°C), average daily temperature (°C), maximum relative humidity (%), minimum relative humidity (%), average daily humidity of the days (all average on growth period), total rainfall and number of rainy days in the growth season were also estimated on disease intensity in the respective season. It was found that infection percentage and PDI of leaf rust were higher when average minimum and maximum temperature of 11° C and 24° C, respectively, prevailed with an average minimum and maximum relative humidity of 45 to 96% (Table IV).

These findings are in concurrence to Wang (1980) who reported 24 °C temperature optimum for aeciospore germination of *Aecidium mori*. The higher incidence of leaf rust in the sets grown during autumn and winter (sets II and III) can be explained by the prevalence of favourable environmental conditions available for multiplication and spread of disease during this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Dr S.S. Sinha, Ex-Director, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal) for encouragement and Shri B.P. Nair, Assistant Director (Statistics) of the above station, for analysis of the data.

REFERENCES

- BELL A.A. (1981) Biochemical mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. plant physiol.* 32, 21-81.
 BORAI AH G., SHREE M.P., NARAYANA GOWDA S.N., (1987) Screening of mulberry plants for foliar diseases in the germplasm bank. *Sericologia*, 27 (2), 165-176.
 TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. *Sericologia*, 34(1), 1-18.
 TEOTIA R.S., MANDAL S.K., SEN S.K (1994) Studies on the fungicidal control of leaf rust disease (*Aecidium mori* Berclay) of mulberry. *Sericologia*, 34(3), 555-557.
 WANG H.(1980) Rust of mulberry (*Aecidium mori*). *Nat. Sci. Counc. Mou.* 8, 604-615.

EFFET DE LA PERIODE DE TAILLE, DES GENOTYPES ET DES FACTEURS AGRO-CLIMATIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT D'*AECIDIUM MORI* CHEZ LE MURIER

R.S. TEOTIA* & S.K. SEN

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

Le développement de la rouille de la feuille (Aecidium mori) a été étudié en 1990-91 et 1991-92 sur dix variétés de mûrier à haut rendement, S-1, S-799, S-1635, C-763, C-776, C-1726, C-1729, C-1730, Tr-4 et Tr-10, cultivées au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (Bengal Ouest, Inde) en fonction de la période de taille, des génotypes et des facteurs agro-climatiques. L'incidence de la maladie est faible quand les plants sont taillés pendant la deuxième semaine de janvier et de février. D'autre part, on observe que les plants taillés en octobre, novembre et décembre sont infestés au maximum. On observe que la variété S-1635 est la moins infestée de manière significative pendant toute l'étude suivie par C-1729, C-1730, et C-1726 classées comparativement comme résistantes, tandis que l'incidence maximum de maladie est enregistrée pour Tr-10, suivie de S-799, C-776 et de C-763. De plus on observe que l'effet des génotypes et de la période de taille pris individuellement ainsi que leur interaction sont hautement significatifs. L'incidence plus élevée de la rouille de la feuille en automne et en hiver est étudiée en rapport avec la présence de facteurs agro-climatiques favorables pendant la saison de croissance.

INTRODUCTION

La rouille de la feuille est une maladie commune de la feuille provoquée par *Aecidium mori* Berclay (Teotia et Sen, 1994). Elle est répandue en hiver et au printemps, elle amoindrit la valeur nutritive des feuilles et accélère le jaunissement, la sénescence et la défoliation (Wang, 1980). On sait que quelques produits chimiques permettent de contrôler la maladie (Teotia et coll., 1994 ; Wang, 1980). La gestion des maladies par la culture de variétés résistantes/tolérantes et le recours à des pratiques de culture appropriées est le meilleur moyen de lutte contre la maladie à la fois sur le plan économique et compte tenu des dangers des produits chimiques en matière d'environnement, particulièrement pour les vers à soie. L'identification de génotypes résistants à la rouille de la feuille est encore à un stade précoce (Boraiah et coll., 1987) et on manque d'informations sur son contrôle cultural. Ainsi, dans cette étude l'accent est mis sur la compréhension des effets du calendrier de taille, des génotypes à haut rendement et des facteurs agro-climatiques sur le développement de la maladie de la rouille de la feuille chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences ont été réalisées en 1990-91 et 1991-92 sur des plants de deux ans mis en pots (taille du pot : diamètre de 37,5 cm) de dix variétés de mûrier à haut rendement, S-1, S-799, S-1635, S-763, C-776, C-1729, C-1730, Tr-4 et Tr-10 cultivées au *Central Sericultural Research and Training*

* Adresse actuelle : Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko - 781 123, Kamrup (Assam), Inde.

Institute, Berhampore (Bengal Ouest, Inde). Cinq lots comprenant cinq répétitions de toutes les variétés à haut rendement sont disposés de manière aléatoire. Les lots sont taillés en suivant le calendrier du Tableau I.

Pour entretenir les plantes, les doses recommandées d'engrais N:P:K (300:180:120 kg/ha/année) sont appliquées sous la forme d'urée (N), de super phosphate simple (P₂O₅) et de muriate de carbonate de potassium (K₂O) après conversion en doses pour pots (en tenant compte de la surface des pots) après la taille. Les plants en pots sont arrosés régulièrement deux fois par semaine avec de l'eau de sources pour l'agriculture.

On laisse les plantes être infestées par *Aecidium mori* dans des conditions naturelles. La maladie est évaluée 60 jours après la taille de chaque lot (Tableau I) en suivant la méthode de Teotia et coll., (1994). L'indice de pourcentage de la maladie (PDI) est calculé en utilisant la formule :

$$PDI = \frac{\text{Somme de tous les indices numériques} \times 100}{\text{Nombre total de feuilles examinées} \times \text{Indice maximum (5)}}$$

Les évaluations numériques sont obtenues en multipliant le nombre de feuilles par leur indice respectif indiqué au-dessous.

- 0 = Pas d'infestation
- I = 1-10% de la surface de la feuille infestée
- II = 11-25% de la surface de la feuille infestée
- III = 26-50% de la surface de la feuille infestée
- IV = 51-75% de la surface de la feuille infestée
- V = 76-100% de la surface de la feuille infestée

RESULTATS ET DISCUSSION

Le développement de la rouille de la feuille varie sensiblement chez toutes les variétés de mûrier à haut rendement (HYV). Des dix variétés HYV testées, aucune n'est résistante. Cependant, on observe que la variété S-1635 est la moins infestée de manière consistante pendant toute l'étude, suivies par C-1729, C-1730 et C-1726. D'autre part, on enregistre le pourcentage d'infestation maximum (60,45 %) et PDI (23,52%) pour la variété Tr-10 suivie par S-799, C-776 et C-763 pour lesquelles on enregistre un pourcentage d'infestation moyen et un PDI de 55,20 % (23,20%), 51,78% (23,10%) et 59,03% (22,66%) respectivement (Tableau II).

De plus, le développement de la maladie est affecté de manière marquée par les variations saisonnières. En général, l'incidence de la rouille de la feuille est sensiblement plus élevée pour les lots taillés et cultivés en automne et en hiver : Lot I : 72,89% ; 22,20%, Lot II : 56,05% ; 24,37% et Lot III : 65,00% ; 30,04% de pourcentage d'infestation et de PDI respectivement. Toutes les variétés sont infestées au maximum quand elles sont taillées pendant la deuxième semaine de décembre puis en novembre et en octobre et au minimum quand elles sont taillées en janvier et en février. De plus, on observe que les effets des génotypes et de la période de la taille pris individuellement tout comme leurs interactions sont hautement significatifs (Tableau III). Il se peut que la variabilité parmi les génotypes puisse être attribuée à des facteurs agro-climatiques du site d'expérimentation pendant la saison de croissance et soit gouvernée par certains gènes (Bell, 1981).

On a aussi estimé aussi l'effet de facteurs abiotiques comme la température maximum (°C), la température minimum (°C), la température journalière moyenne (°C), l'humidité maximum relative (%), l'humidité minimum relative (%), l'humidité moyenne journalière (moyenne totale sur la période de croissance) ; les précipitations totales et le nombre de jours de pluie pendant la période de croissance sont aussi comparés à l'intensité de la maladie aux saisons respectives. On observe que le pourcentage d'infestation et le PDI de rouille de la feuille sont plus élevés quand la température moyenne minimum

et la température maximum respectivement de 11° C et de 24° C dominant avec une humidité moyenne maximum et minimum de 45 à 96% (Tableau IV).

Ces observations concordent avec celles de Wang (1980) qui a relevé qu'une température de 24 ° C est optimale pour la germination des spores d'*Aecidium mori*. L'incidence plus élevée de la rouille de la feuille pour les lots cultivés pendant l'automne et l'hiver (lots II et III) peut s'expliquer par la présence de conditions agro-climatiques favorables à la multiplication et au développement de la maladie pendant cette étude.

BREEDING OF NEW ARTIFICIAL TRIPLOID MULBERRY VARIETY 'JIALING 16'

MAODE Y., CUNLI L. & ZHONGHUAI X.

The Key Sericulture Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing, China, 400716.

With the artificially-created tetraploid parents and natural diploid parents, the project screened 50 hybrid sets from which F1 hybrid progeny that was bred by using the tetraploid mulberry 'Xiqing 1' as female parent and 'Yu 2' as male parent was of the strongest heterosis and polyploid vigour. From this F1 hybrid progeny a new artificial triploid mulberry variety 'Jialing 16' was bred for the first time in China and had a high product, excellent leaf quality and agronomic characters, including large and thick leaves, sterile and vegetative growth. Its leaf production was 20% higher than that of the diploid mulberry variety, 'Husang 32', which was approved to be a control variety by the government in China. In rearing test, the results of silkworms fed with the leaves of triploid was 10% higher than that of silkworms fed with the leaves of the control and the protein content of dried mulberry leaf powder reached 28.08%.

Keywords: Mulberry, variety, breeding, artificial triploid, Jialing 16.

INTRODUCTION

It is known that the diploid mulberry variety used in fields has greater advantages in leaf product, number of branches, number of sprouting buds, better branch perpendicularity and so on. However, its leaf has thinner mesophyll, dull green and non large area and does not have a desirable quality. Furthermore, this kind of varieties are subject to flower and produce seed.

The leaf quality of tetraploid is very good. It was found by our studies in 1983 that the whole cocoon weight, weight of cocoon shell, ratio of weight of cocoon shell to the whole cocoon weight and number of eggs produced by the silkworm fed with the tetraploid mulberry variety, 'Ichinose', were obviously higher than those produced by the silkworm fed with the diploid variety, 'Ichinose'. The leaf quality of the tetraploid mulberry variety was obviously more advantageous than that of the diploid mulberry variety. However, the number of bud sproutings of the tetraploid mulberry was less, its branch growth was poorer and lower and its leaf product was lower than the diploid mulberry's one. Hence, it is limited to produce leaf by which silkworm is fed.

The cell volume of the artificially bred and created triploid mulberry variety, which was crossed with the tetraploid and the diploid parents was two times more than that of the diploid mulberry and behaved sterility but vigorous vegetative growth. Its leaf production was obviously higher than that of the diploid and tetraploid leaf production of the triploid mulberry was 20% higher than that of the diploid mulberry, the length of silk filament per cocoon of the silkworm fed with the leaf of triploid mulberry was 139 meters longer than for the silkworm fed with that of the diploid mulberry (Minamizawa, 1984 and Lin, 1989). For a kind of plant for application of their leaves, breeding the artificial triploid mulberry has been regarded as a new and important subject in the field of the mulberry breeding.

MATERIALS AND RESULTS

1. The artificially created tetraploid parent:

During the breeding of the artificial triploid, the tetraploid parent is the most important base material. However, tetraploid material of the mulberry is very rare. Now there are only five wild tetraploid mulberry species (Lin, 1989). The wild tetraploid mulberry species cannot be used as parents because of their inferior economic characters. For this reason, an artificial tetraploid mulberry needs to be created as a parent. At first the excellent diploid mulberry variety, 'Yu 2', which has been introduced and generalised all over the country is used as material. In order not to change its excellent genetic background, colchicine which can not only double the chromosomes but also not change the constructure of chromosome was used to induct chromosomes of diploid mulberry variety, 'Yu 2', to be doubled. An artificial tetraploid, named 'Xiqing 1' was obtained. This tetraploid is a desirable material which may be used to breed triploid varieties.

2. Breeding of new artificial mulberry varieties.

With the artificially created tetraploid parents and diploid parents, more than 50 hybrid sets were obtained in 1986. One of them was crossed by using the excellent tetraploid mulberry, 'Xiqing 1', as female parent and the excellent diploid 'Yu 2', as male parent. This F1 progeny showed significantly polyploid predominance and heterosis. Having compared and identified the number of chromosomes, biological characters and economic characters of the plants of this F1 set were analysed for several years. A conformity new artificial triploid mulberry, named 'Jialing 16', which has high product, a

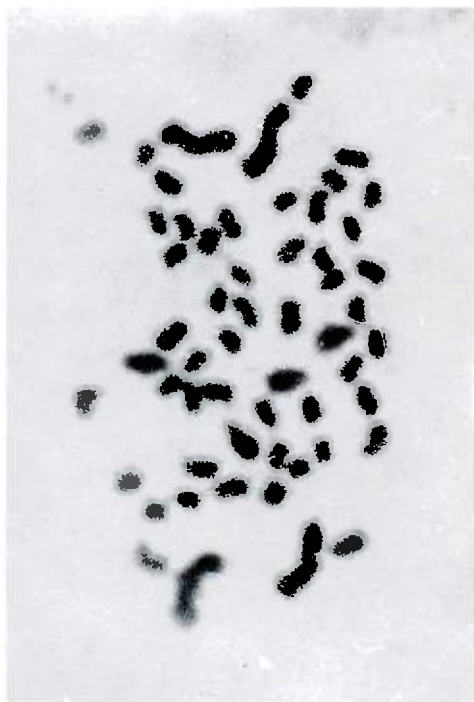


Fig 1: 'Xiqing1' (female) soma chromosome set
Fig 1: Lot des chromosomes de "Xiqing 1" (femelle)
($2n = 4x = 56$).



Fig 2: 'Yu 2' (male) soma chromosome set
Fig 2: Lot des chromosomes de "Yu 2" (mâle)
($2n = 2x = 28$.)

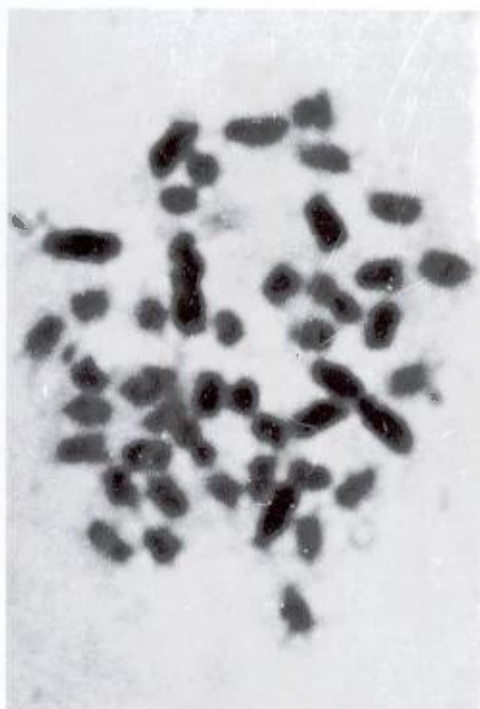


Fig 3: 'Jialing 16' (F1) Artificial triploid soma chromosomes set.

Fig 3: "Jialing 16" (F1) Lot chromosomique somatique du triploïde artificiel "Jialing 16" (F1).



Fig 4: Spring growing way of leaf of Jialing no. 16, an artificial triploid new mulberry variety (taken on may 18, 1995).

Fig 4: Croissance printanière de la feuille de Jialing no. 16, nouvelle variété triploïde artificielle (pris le 18 mai 1995).

good quality of leaf and good agronomic characters was selected and bred (Fig 1-5).

After field trial comparison of varieties and generalisation of 'Jialing 16' for several years, it was found that it has considerable good characters and shows not only polyploid predominance but heterosis. Its leaf product was 20% higher than that of the diploid mulberry variety, 'Husang 32', a standard variety, which was recommended by the government in China. The whole cocoon weight and weight of cocoon shells per ten thousands silkworms fed with the leaf of 'Jialing 16' were 10% and 12% higher than those with that of 'Husang 32' respectively. The cocoon weight per 100 kg leaves of this variety was 15% higher than that of the control. On the other hand, the protein content of its leaf (dried mulberry leaf powder) reached 28.08% (1.18% higher than for the control). It has a large lobed leaf (it has more wind-resistance and light-transparency than diploid entire leaf varieties which



Fig 5: Spring growing way of Jialing no. 16, an artificial triploid new mulberry variety (taken on may 18, 1995).

Fig 5: Croissance printanière de la feuille de Jialing no. 16, nouvelle variété triplaide artificielle (pris le 18 mai 1995).

are popular all over the country) with massive mesophyll (its leaf thickness is 185.0 μm and 20% thicker than control's), dark-green colour and good agronomic characters.

DISCUSSION

In order to obtain a new ideal triploid mulberry variety, the selection of parents is very important. In the course of the breeding of an artificial triploid variety, the tetraploid and diploid parents should show more merits than demerits and their merits and demerits can be complementary. On the other hand, the parents should have larger genetic divergences, higher heritability for good characters and their larger heterosis and an advanced triploid variety can be bred by using only such parents. Among diploids, a good number of parents are available for the desirable characters as mentioned above, as it will be difficult to find natural tetraploids with those above good characters, they have to be artificially bred. So one should pay attention to select the tetraploid parent. In the course of breeding 'Jialing 16', 'Xiqing 1' was selected as female parent. It is an induced tetraploid variety which has high leaf product and an excellent leaf quality and stronger adversity-resistance. The new breeding

tetraploid came from a diploid mulberry, 'Yu 2', with high breeding value, that was a major male parent for many breeding mulberry varieties in China, whose chromosomes were doubled with colchicine. Selection of excellent parents is a key technique for breeding a new artificial triploid variety.

The number of female inflorescences for cross was increased at least by one time more than that in usual cross in order to obtain effective number of crossing seeds (F1) during our breeding of polyploid because there are fewer crossing seeds (F1) and seedlings (F1) obtained in cross between tetraploid and diploid in mulberry. This may be because during meiotic stage I, there are two bivalents (II+II), one bivalent and two univalents (II+I+I), one trivalent and one univalent (III + I) besides tetravalents (IV) in metaphase I for tetraploid. When cell division goes into anaphase I (II + II) synaptonemal complex is divided as the pattern of 2/2 equational disjunction, while the other three synaptonemal complexes were divided as pattern of 2/2 disjunction, or of 3/1 unequational disjunction, which leads to change the number of chromosomes in parental gamete cell of tetraploid and decreases the fertility and equilibrium of chromosome number in progeny.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge professor Huang Junting for providing useful advice. This research was supported by a research fund from the national fund for science.

REFERENCES

- KICHISABURO, MINAMIAZWA (1984) Science of mulberry cultivation, Fundamental and practice, Second Edition ISBN 4-943916-82-1 C2061 Meino-sha, Japan Science press, 2-23 Kanda-jinbocho, Chiyoda, Tokyo, Japan, 170-190.
- MAODE Y. (1992) The studies on the Pollengerm of different polyploid mulberry. Sichuan Sericulture, Vol. 2, 5-7
- SHOU KANG L. (1989) Application of mulberry breeding, ISBN 7-5364- 1300-9/s 20 1-96 and 199-218, Sichuan Science and Technique Press, Cheng-Du, China.
- ZHONGHUAL X. (1986) The studies on digestibility of polyploid mulberry. Sichuan Sericulture, Vol 2, 2-4

SELECTION D'UNE NOUVELLE VARIETE ARTIFICIELLE TRIPLOIDE DE MURIER «JIALING 16»

MAODE Y., CUNLI L. & ZHONGHUAI X.

The Key Sericulture Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University,
Chongqing, Chine, 400716.

Le projet passe en revue 50 lots d'hybrides avec des parents tétraploïdes créés de manière artificielle et des parents naturels diploïdes, dont la descendance hybride F1 obtenue à partir du mûrier tétraploïde « Xiqing1 » comme parent femelle et « Yu 2 » comme parent mâle présente l'hétérosis et la vigueur polyploïde les plus fortes. A partir de la descendance hybride F1, une nouvelle lignée artificielle de mûrier artificielle triploïde « Jialing 16 » est obtenue pour la première fois en Chine. Elle donne une production élevée et présente une feuille et des caractères agronomiques d'excellente qualité avec des feuilles grandes et épaisses et une croissance végétative et stérile. La production de feuilles est supérieure de 20 % à celle de la variété de mûrier diploïde, « Husang 32 », approuvée comme variété témoin par le gouvernement chinois. Pendant les essais d'élevage, les résultats obtenus pour les vers à soie nourris avec ses feuilles sont supérieurs de 10% à ceux obtenus pour les vers à soie nourris avec les feuilles témoins et le contenu en protéines de la poudre de feuille de mûrier séchée atteint 28,08 %.

INTRODUCTION

On sait que la variété de mûrier diploïde utilisée en culture présente plus d'avantages quant au produit de la feuille, au nombre de branches, au nombre de bourgeons adventifs, à la perpendicularité des branches et ainsi de suite. Toutefois, sa feuille a un mésophile fin, une surface faible, est vert sombre et n'a pas les qualités souhaitées. De plus ce type de variétés fleurit et produit des graines.

La qualité de la feuille tétraploïde est très bonne. Nous avons trouvé dans nos études en 1983, que le poids du cocon, le poids de la coque, le rapport poids de la coque sur poids total du cocon et le nombre d'oeufs produits par le ver à soie nourri avec la variété de mûrier tétraploïde « Ichinose », étaient notablement plus élevées que ceux obtenus avec le ver à soie nourri avec la variété diploïde « Ichinose ». La qualité de la feuille de la variété de mûrier tétraploïde est évidemment meilleure que celle de la variété de mûrier diploïde. Toutefois, le nombre de bourgeons du mûrier tétraploïde est inférieur, la croissance de ses branches inférieure et sa production en feuilles moins élevée que ceux du mûrier diploïde. Ainsi, il est limité à la production de feuilles pour l'alimentation des vers à soie.

Le volume de la cellule de la variété de mûrier triploïde artificielle, obtenue par croisement entre les parents tétraploïde et diploïde, est deux fois plus grand que celui du mûrier diploïde et a une croissance végétative vigoureuse mais stérile. Sa production en feuilles est évidemment plus élevée que celle du diploïde et du triploïde. La production en feuilles du mûrier triploïde est plus élevée de 20 % que celui du mûrier diploïde, la longueur du filament de soie par cocon pour le ver à soie nourri à la feuille du mûrier triploïde est plus long de 139 mètres à celle du ver à soie nourri au mûrier diploïde (Minamizawa, 1984 et Lin, 1989). L'obtention d'un mûrier artificiel triploïde, comme plante dont les feuilles servent d'application, a été considéré comme un objectif nouveau et important dans le domaine de la sélection du mûrier

MATERIELS ET RESULTATS

1. Parent tétraploïde créé artificiellement :

Au cours de la sélection du triploïde artificiel, le parent tétraploïde est le matériel de base le plus important. Toutefois, le matériel mûrier tétraploïde est très rare. A présent, il n'y a que cinq espèces de mûrier tétraploïdes sauvages (Lin, 1989). Les espèces de mûrier tétraploïdes sauvages ne peuvent être utilisées comme parents à cause de leurs caractères économiques inférieurs. Pour cette raison, il est nécessaire de créer un parent tétraploïde artificiel. En premier, on utilise comme matériel l'excellente variété de mûrier diploïde « Yu 2 », qui a été introduite et généralisée dans tout le pays. On utilise de la colchicine pour doubler le nombre de chromosomes tout en conservant son excellent patrimoine génétique. On obtient un tétraploïde artificiel, nommé « Xiqing 1 ». Ce tétraploïde est un matériel qui peut être utilisé pour obtenir des variétés triploïdes.

2. Sélection de nouvelles variétés de mûrier artificielles :

Nous avons obtenu plus de 50 lots d'hybrides en 1986, à partir des parents tétraploïdes artificiellement créés et des parents diploïdes. L'un d'eux a été croisé en utilisant l'excellent mûrier tétraploïde « Xiqing 1 » comme parent femelle et l'excellent diploïde « Yu 2 » comme parent mâle. Cette descendance F1 présente une prédominance polyploïde et une hétérosis. Après avoir comparé et identifié le nombre de chromosomes, les caractéristiques biologiques et économiques des plantes de ce lot F1 ont été sélectionnées pendant plusieurs années. Un nouveau mûrier artificiel triploïde, nommé « Jialing 16 », à la production élevée, à la feuille de bonne qualité et aux bonnes caractéristiques agronomiques, a été sélectionné et cultivé (Fig. 1-5).

Après essais comparés en champs des variétés et la généralisation de « Jialing 16 » pendant plusieurs années, nous avons trouvé qu'elle a de bonnes caractéristiques et qu'elle est non seulement à dominante polyploïde mais aussi à forte hétérosis. Sa production de feuilles est supérieure de 20% à celle de la variété diploïde. « Husang 32 » recommandée par le gouvernement chinois. Le poids du cocon et le poids des enveloppes de cocons de dix mille vers à soie nourris avec la feuille de « Jialing 16 » sont respectivement 10 % et 12 % plus élevés que ceux nourris avec « Husang 32 ». Le poids en cocons pour 100kg de feuilles de cette variété est supérieur de 15 % à celui du témoin. D'autre part, la teneur en protéines de sa feuille (poudre de feuille de mûrier séchée) atteint 28,08 % (1,18 % de plus que le témoin). La feuille présente un grand lobe (elle résiste plus au vent et est plus transparente à la lumière que la feuille entière de variété diploïdes populaires dans tout le pays) avec un mésophylle massif (l'épaisseur de sa feuille est de 185,0 µm, 20 % plus épaisse que le témoin), est d'un vert sombre et présente de bons caractères agronomiques.

DISCUSSION

Pour obtenir une nouvelle variété mûrier triploïde idéale, la sélection des parents est très importante. Au cours du lignage de la variété artificielle triploïde, les parents tétraploïdes et diploïdes doivent montrer plus de mérites que de démérites et leurs mérites et démérites peuvent être complémentaires. D'autre part, les parents doivent avoir de plus grandes divergences génétiques, une plus grande héritabilité de leurs bonnes caractéristiques et une plus grande hétérosis, et l'on ne peut sélectionner une variété triploïde évoluée qu'en utilisant de tels parents. Parmi les diploïdes, il existe un bon nombre de parents présentant les caractéristiques désirables mentionnés plus hauts ; comme il est difficile de trouver des tétraploïdes avec les bons caractères, il faut les obtenir de manière artificielle. Il faut faire attention à la sélection du parent tétraploïde. Au cours de la sélection de « Jialing 16 », « Xiqing 1 » est utilisé comme parent femelle. C'est une variété tétraploïde induite qui a une production en feuilles élevée et une excellente qualité de feuille et une plus grande résistance aux conditions adverses. Le nouveau tétraploïde provient d'un mûrier diploïde « Yu 2 », à haute valeur, qui a été utilisé comme parent mâle pour de nombreuses variétés de mûrier de culture en Chine,

dont les chromosomes sont doublés avec de la colchicine. La sélection d'excellents parents est une technique clé pour obtenir une nouvelle variété triploïde artificielle.

Le nombre d'inflorescences femelles pour le croisement est augmenté d'au moins une fois plus que pour les croisements habituels afin d'obtenir un nombre efficace de graines de croisement (F1) pendant la culture du polyploïde parce qu'il y a moins de graines de croisement (F1) et de plantules (F1) obtenues par croisement entre un tétraploïde et un diploïde chez le mûrier. Cela est peut-être dû au fait que pendant la phase méiotique I, il y a deux bivalents (II + II), un bivalent et deux univalents (II+I+I), un trivalent et un univalent (III+I) en plus de tétravalents (IV) à la métaphase I pour le tétraploïde. Quand la division cellulaire passe en anaphase I (II+II), le complexe synaptonémique se divise selon le modèle de disjonction équationnelle 2/2, tandis que les trois autres complexes synaptonémiques se divisent selon le modèle de disjonction 2/2 ou non équationnel 3/1 qui entraîne le changement du nombre de chromosomes dans les gamètes du parent tétraploïde, ce qui diminue la fertilité et l'équilibre du nombre de chromosomes dans la descendance.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	573
General sericulture	
Mûrier	575
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	581
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	587
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	589
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	593
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : œufs, embryologie	597
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	599
Silkworms: silkglands	
Soie	601
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

Silk carpets of Kashmir.

Tapis de soie du Cachemire.

DHAR A.K.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(5), 33-35. (E)

Analysis on Brazilian sericultural industry and cocoon-raw silk trade.

Analyse de l'industrie séricicole brésilienne et du commerce de la soie grège et des cocons.

GU G.

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

1997 Canye Kexue, Vol. 23(4), 226-229. (C,e)

Rearer's classification, technology adoption and extension package.

Classification des éleveurs, adoption de technologies et ensemble de méthodes de vulgarisation.

GUPTA B.K., GUPTA Y.K.

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

1997 Indian Silk, Vol. 36(6), 22-26. (E)

The reason for the decline of cocoon quality in Huzhou City and its policy.

La raison du déclin de la qualité des cocons dans la ville de Huzhou et sa politique.

HU D.

Huzhou Holding Group of Silk, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 1-2. (C,e)

Spot investigation and analysis of sericultural economic benefits of Haining city 1996.

Enquête locale et analyse des bénéfices économiques séricicoles de la ville de Haining en 1996.

HU J. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 36-37. (C)

The policy to propel sericultural science and technology forward.

Une politique pour faire avancer la science séricicole et la technologie.

LI S.

Deqing County Allied Company of Sericulture and Silk, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 1-3. (C,e)

Health hazards in sericulture.

Les dangers pour la santé dans la sériciculture.

MARIBASHETTY V.G., CHANDRAKALA M.V., NARAYANA SWAMY K.C.

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

1997 Indian Silk, Vol. 36(6), 38-39. (E)

Review on the silkworm variety certification in Zhejiang Province over 15 years.

Revue sur l'authentification des variétés de ver à soie dans la province du Zhejiang sur une période de 15 ans.

WANG Y., YAO L., CHEN H., JIN Y.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 7-10. (C,e)

Role of technical demonstrator in the sericulture.

Rôle du démonstrateur technique en sériciculture.

WU K.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 42-43. (C)

The present situation of stock production in Zhejiang Province and its policy.

Situation actuelle de la production du stock dans la province du Zhejiang et sa politique.

ZHANG Q.

Silkworm Eggs Company of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 3-5. (C,e)

Technique of laborsaving silkworm rearing and its application.

Technique de gain de travail pour l'élevage des vers à soie et son application.

ZHOU J., WANG P., XU C.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 4-7. (C,e)

Problems encountered in the production and development of plat-way spinning in Zhejiang Province.

Problèmes rencontrés dans la production et le développement du filage tressé dans la province du Zhejiang.

ZHOU Q. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 38-39. (C)

Mûrier

Mulberry

Effect of various sericultural composts on mulberry leaf yield and quality under irrigated condition.

Effet de différents composts séricicoles sur le rendement et la qualité des feuilles de mûrier en conditions d'irrigation.

BHOGESHA K., DAS P.K., MADHAVARAO Y.R.

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 30-34. (E)

Potassium deficiency symptoms in certain important varieties of mulberry (*Morus* sp.) under field plantations in Karnataka (India).

Les symptômes de déficience en potassium chez certaines variétés importantes de mûrier (*Morus* sp.) cultivés en mûraies au Karnataka (Inde).

BONGALE U.D.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 78-80. (E)

Soil micronutrients status of mulberry gardens in relation to the pH and organic carbon contents.

L'état des micronutriments du sol des mûraies en relation avec le pH et les contenus en carbone organique.

BONGALE U.D., LINGAIAH.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 74-77. (E)

Management of spiralling whitefly.

Lutte contre la mouche blanche spiralee.

DOURESSAMY S. *et al.*

Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural Univ., Coimbatore, Tamil Nadu, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(6), 15-16. (E)

Investigation of high yield mulberry fields in Taizhou city.

Investigation sur les mûraies à haut rendement dans la ville de Taizhou.

FANG L. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 40-42. (C)

Chemical composition and feeding studies of different elite mulberry genotypes under temperate conditions.

Etudes alimentaires et de la composition chimique de différents génotypes de mûriers élite sous des conditions tempérées.

FOTADAR R.K., DANDIN S.B.

Research Extension Centre, Kathua 184 101, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 22-26. (E)

Performance of recommended mulberry varieties in Purvanchal Region.

Performance des variétés de mûriers recommandées dans la région de Purvanchal.

GARGI, KUMAR R., SHUKLA P., PANDEY R.K., SARASWAT S.B., KUMAR D.

PSDP, Central Silk Board, Varanasi, Uttar Pradesh, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 17-19. (E)

Experiment on the effect of spraying potassium dihydrogen phosphatase onto mulberry trees as a substitute for pinching off the young shoots in spring.

Expérimentation sur l'effet de la pulvérisation de phosphatase dihydrogène de potassium sur les mûriers comme substitut pour épincer les jeunes pousses au printemps.

JIN Y., CHEN W., XIA J.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(1), 41-43. (C,e)

The cultural technique of Nongsang-8 on the seabeach.

Technique culturale du Nongsang-8 sur la plage.

LAI Z.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 45-46. (C)

Study on resistance of different mulberry varieties to *Hishimonus sellatus* Uhler.

Etude sur la résistance de différentes variétés de mûrier à *Hishimonus sellatus* Uhler.

LEI G., JIN Y., LI Z., TAN S., PENG S.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(1), 32-34. (C,e)

Biological characteristics of mulberry white fly and its generation.

Caractéristiques biologiques de la mouche blanche du mûrier et sa génération.

LIU B., LI Y., CHEN D., WANG W.

Huzhou Institute of Sericulture, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 6-9. (C,e)

Induced effects of CPPU on differentiation of adventitious bud in mulberry leaf culture.

Effets induits du CPPU sur la différenciation des bourgeons adventifs dans la culture de feuilles de mûrier.

LOU C. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 232-233. (C)

Mulberry scale insect fauna of the world - A review.

La faune des cochenilles du mûrier dans le monde - Une revue.

NARAYANASWAMY K.C., REDDY D.N.R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 1-10. (E)

Efficiency of selection among different crosses of mulberry (*Morus* spp.).

Efficacité de la sélection parmi différents croisements de mûrier (*Morus* spp.).

PRAKASH B.G., SARKAR A.

Regional Research Station, Bijapur 586 101, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 70-71. (E)

Study on monitoring, forecasting and control of mulberry clearing moth populations with a synthetic sex pheromone.

Étude sur la surveillance, la prévision et le contrôle des populations de papillons ravageurs du mûrier grâce à une phéromone sexuelle synthétique.

PU G., DU H., MAO J.

Biotechnology College of Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1997 Canye Kexue, Vol. 23(4), 193-196. (C,e)

Characteristic investigation of mulberry white caterpillar and its policy to control.

Investigation sur les caractéristiques de la chenille blanche du mûrier et politique de lutte.

QIAN W. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 51. (C)

In vitro screening of mulberry genotypes (*Morus* spp.) for drought tolerance.

Sélection *in vitro* des génotypes de mûrier (*Morus* spp.) pour la tolérance à la sécheresse.

RAM RAO D.M., SUSHEELAMMA B.N., RAJASHEKAR K., SARKAR A., BAJAPI A.K.

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 60-62. (E)

Effects of culture conditions on adventitious-bud formation from cotyledons and primary leaves of mulberry.

Effets des conditions de culture sur la formation des bourgeons adventifs issus des cotyledons et des premières feuilles de mûrier.

SAWAGUCHI T., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H.

Iwate Prefectural Sericulture Experiment Station, 61 Ryuganobaba, Mizusawa, Iwate 023, Japan.

1997 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(5), 360-363. (E)

Management information system in germplasm maintenance.

Système d'information de gestion pour la conservation des ressources génétiques.

SEKHAR S., GOEL A.K., MUKHERJEE P., THANGAVELU K.

State Sericulture Research and Development Institute, Hindupur, Andhra Pradesh, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(6), 6-9. (E)

Study on light-duty harvest of mulberry trees and its necessary techniques.

Étude sur la récolte des mûriers en fonction de la lumière et ses techniques.

SHEN G., YANG J.

Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Sericultural Sciences, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 24-25. (C,e)

Analysis of the occurrence of mulberry pyralid and its policy to control.

Analyse de la présence de la pyrale du mûrier et politique de lutte.

SHEN Y.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol.28(3), 49. (C)

Natural enemy complex of the pink mealy bug *Maconellicoccus hirsutus* (Green) in mulberry corp system.

Ensemble des ennemis naturels de la cochenille rose *Maconellicoccus hirsutus* (Green) dans le système de culture du mûrier.

SIDDE GOWDA D.K. *et al.*

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 55-56. (E)

Breeding of a new mulberry variety Lizhou 7.

Sélection d'une nouvelle variété de mûrier Lizhou 7.

TANG H. *et al.**1997 Canye Kexue, Vol. 23(4), 230-231. (C)***Biological characters of yellow mulberry twig borer and space distribution of its eggs.**

Caractères biologiques du térébrant jaune des brindilles du mûrier et distribution spatiale de ses oeufs.

TAO J., DU H., MAO J., XIE L.

Taicang Sericultural Extension Station, Jiangsu Province, Taicang 215400, China.

*1997 Canye Kexue, Vol. 23(4), 197-201. (C,e)***Cultural methods to control root-knot in mulberry.**

Méthodes culturales pour lutter contre les galles du mûrier.

TOMY PHILIP

Research Extension Center, CSB, Angamaly, Kerala, India.

*1997 Indian Silk, Vol. 36(5), 9-10. (E)***Fungal and bacterial association with root rot of mulberry.**

Association bactérienne et fongique avec la pourriture de la racine du mûrier.

TOMY PHILIP, SHARMA D.D., GOVINDAIAH.

Research Extension Centre, Angamaly 683 572, India.

*1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 27-29. (E)***Predisposition of powdery mildew infected mulberry leaves to *Phoma mororum* infection (*Phoma* leaf spot).**Prédisposition des feuilles de mûrier infestées par la rouille poudreuse à l'infestation par *Phoma mororum* (taches de *Phoma* sur les feuilles).

VIDYASAGAR G.M., RAJASAB A.H.

Plant Pathology Laboratory, Department of Botany, Gulbarga University, Gulbarga 585 106, India.

*1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 65-66. (E)***Influence of foliar application of secondary and micronutrients on growth, yield and quality parameters of mulberry.**

Influence de l'application foliaire de micronutriments et de nutriments secondaires sur les paramètres de qualité, le rendement et la croissance du mûrier.

VISWANATH G.K., JAYARAMAIAH M., SHANKAR M.A.

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

*1997 Mysore J. Agric. Sci., Vol. 31(3), 209-212. (E)***The effect of 'Duoxiaoling' on preventing and controlling several pests in mulberry field.**

L'effet du "Duoxiaoling" sur la prévention et la lutte contre plusieurs parasites dans les mûraies.

WANG Y., ZHENG M.

*1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 13-14. (C,e)***Sudden occurrence of mulberry diseases and pests and its control.**

Présence soudaine et lutte contre des maladies et des parasites du mûriers.

ZHANG Z.

*1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 47-48. (C)***Occurrence of termite on mulberry shoot and its control.**

Présence et lutte contre les termites sur les pousses de mûriers.

ZHAO G.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 50. (C)

Effect of ground covering with plastic film on the growth of young mulberry tree.

Effet de la couverture du sol par un film plastique sur la croissance des jeunes mûriers.

ZHENG Y., ZHOU M., JIN B.

Sericultural Station of Linhai City, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 31-35. (C,e)

The effect of capsulated urea applied to mulberry field.

Effet de l'urée capsulée appliquée dans les mûraies.

ZHOU J. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 40. (C)

Report on the effect of 'Kehanhan' applied onto mulberry trees.

Rapport sur l'effet du "Kehanhan" appliqué sur les mûriers.

ZHU L., MA A., ZHOU J., BAO D., WU Z.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 11-12. (C,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: feeding, rearing, pathology**

Studies on PCR amplification of DNA of pebrine spore *Nosema bombycis* from silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'amplification PCR de l'ADN des spores de pébrine *Nosema bombycis* du ver à soie *Bombyx mori*.

CAI P., XU X., HUANG Z., LU K., ZHUANG C., SHAO H., LIU Z., ZHENG X.

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 207-210. (C,e)

Improving the quality of silkworm egg by enhancing management and controlling pebrine.

Amélioration de la qualité des oeufs de ver à soie par une meilleure gestion et la lutte contre la pébrine.

CAI Z. *et al.*

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(1), 37-38. (C)

Report on the chemical injury of 50 % of dichloroquinolinic acid on silkworm.

Rapport sur les dommages chimiques causés par l'acide dichloroquinolinique chez les vers à soie.

CHEN Z. *et al.*

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 56. (C)

Comparison test on three silkworm races for spring rearing.

Test de comparaison sur trois races de ver à soie pour l'élevage de printemps.

FAN J., KONG Y.

Agricultural School of Jiaxing City, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 16-17. (C,e)

Effect of leaves from waterlogged mulberry field on the quality and production of parent silkworms.

Effets des feuilles provenant des mûraies détrempées sur la qualité et la production des vers à soie parents.

GU X., ZHAN H.

Anhua Sericultural Station, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 32-33. (C,e)

Brief report on the mid-test of spring silkworm race 871 x 872 in rural area.

Bref rapport sur le test moyen de la variété de ver à soie de printemps 871 x 872 en zone rurale.

GUAN S.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(1), 50-51. (C,e)

Studies on attenuation of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Études sur l'atténuation du virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori*.

HASHIMOTO Y., SHIKATA M., NAKAGAWA M., YANASE T., MATSUMOTO T.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute, No 45, 51-80. (J,e)*

Daily consumption and utilization of dietary dry matter by the silkworm, *Bombyx mori*, reared on the artificial pellet diet.

Consommation quotidienne et utilisation de matière sèche alimentaire par le ver à soie *Bombyx mori* élevé sur de l'aliment artificiel en granulés.

HORIE Y., SUDO M., FUJIWARA Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1053 Iikura, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute, No 45, 7-21. (J,e)*

Insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* and its mode of action.

Cristal protéique insecticide de *Bacillus thuringiensis* et son mode d'action.

IIZUKA T.

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 66(5), 311-322. (J)*

Introduction and application of new silkworm eggs for summer-autumn rearing Fangcao x Chen . Xing.

Introduction et application de nouveaux oeufs de ver à soie Fangcao x Chen . Xing pour l'élevage d'été-automne.

JIN Q.

Yuhang City Head Station of Special Local Product, China.

1997 *Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 19-21. (C,e)*

Analysis on individual cooperative rearing of young silkworm.

Analyses des élevages coopératifs individuels des jeunes vers à soie.

JIN Q.

1997 *Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 44-45. (C)*

Studies on the spermatogenesis and spermiogenesis in the uzi fly, *Exorista bombycis* (Louis) (Diptera: Tachinidae).

Études sur la spermatogénèse et la spermiogénèse chez la mouche uzi *Exorista bombycis* (Louis) (Diptera: Tachinidae).

KATIYAR R.L., PRADIP KUMAR, MAJUNATH D., DATTA R.K.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1997 *Indian J. Seric., Vol. 36(1), 43-46. (E)*

Development of the optimum control method of cocoon cooking by the application of Expert system.

Développement de la méthode de contrôle optimum de l'étouffage des cocons par application d'un système Expert.

KINOSHITA H.

1997 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 19., 1-119. (J,e)*

New bivoltines for tropical conditions.

De nouveaux bivoltins pour les conditions tropicales.

KRISHNA RAO S. *et al.*

KSSRDI, Silkworm Breeding Unit, Government Silk Farm, Bidadi, Bangalore, India.

1997 *Indian Silk, Vol. 36(7-8), 5-10. (E)*

Influence of light on occurrence of thin end cocoon.

Influence de la lumière sur la présence de cocons à bout fin.

LIU H.

Silk Company of Lan Shan District, Linyi City, Shandong Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 28-29. (C,e)

Study and popularization of silkworm rearing with mulberry shoots for three seasons year-round.

Etude et popularisation de l'élevage des vers à soie avec des rameaux de mûriers pendant trois saisons par an.

LIU X., XIAO L., CHEN Z., ZHANG B., ZHENG Y.

Anji General Company of Cocoon and Silk, People's Government of Dipu Town, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 11-15. (C,e)

Application and popularization of the bag for larvae newly hatched from loose eggs.

Application et popularisation du sac pour les larves nouvellement écloses provenant des oeufs détachés.

MA H.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 44. (C)

A simple technique to prevent ant attack.

Une technique simple pour prévenir les attaques de fourmis.

MATHEW P.J.

Centrat Tasar Research and Training Institute, Ranchi, Bihar, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(7-8), 16. (E)

Isolation chambre : a tool for chawki silkworm rearing.

Chambre d'isolement : un outil pour l'élevage des jeunes vers à soie.

MUNIRAJU E., SHEKARAPPA B.M., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Inst., Thalaghattapura, Kanakapura Road, Bangalore 560 062, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(5), 6-8. (E)

Rate of spread of white muscardine in silkworm rearing.

Taux de propagation de la muscardine blanche dans les élevages de vers à soie.

PRABHAKARA M.K., BALAVENKATASUBBAIAH M., SIVAPRASAD V., BAIG M., DATTA R.K.*

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 81-84. (E)

Susceptibility status of the silkworm (*Bombyx mori*) germplasm stocks in India to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Sensibilité au virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* dans les germoplasmes de vers à soie (*Bombyx mori*) en Inde.

RATNA SEN, PATNAIK A.K., MAHESWARI M., DATTA R.K.

Central Seric. Research and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 51-54. (E)

Experiment on rearing silkworm with mulberry shoots twice a day at grown silkworm stage in summer.

Expérimentation sur l'élevage des vers à soie nourris deux fois par jour au stade de croissance avec des rameaux de mûriers en été.

RUI M., YAN K., JU G.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 27-28. (C,e)

Anterior inhibition in the ligated fly larvae of *Exorista bombycis* (Diptera: Tachinidae) and its physiological basis.

Inhibition antérieure chez les larves ligaturées de la mouche *Exorista bombycis* (Diptera: Tachinidae) et ses bases physiologiques.

SASHINDRAN NAIR K., KANIKA TRIVEDI, MAGADUM S.B., AHSAN M.M., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 17-21. (E)

Cost-effective heating system for chawki rearing in China.

Système de chauffage économique pour l'élevage des jeunes vers à soie en Chine.

SATYANARAYANA RAJU Ch. *et al.*
SCPC, Gorantla, Andhra Pradesh, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(7-8), 11-123. (E)

Probe into the mathematical model for forecasting the optimum time to take the spring silkworm eggs out of cold storehouse.

Investigation sur le modèle mathématique pour la prévision du moment optimum pour sortir de la chambre froide les oeufs des élevages de printemps.

SHAO G.
Sericultural Station, Chunan General Company of Cocoon and Silk.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 26-27. (C,e)

Factors which affect the production of extracellular protease in the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*.

Les facteurs affectant la production de protéase extracellulaire chez le champignon entomopathogène *Paecilomyces fumosoroseus*.

SHIMIZU S., YOSHIOKA T.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 357-359. (J)

Influence of spacing on the incidence of grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L.

Influence de l'espacement sur l'incidence de la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L..

SIVAPRAKASAM N., JAYARANI S., RABINDRA R.J.

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 72-73. (E)

Rearing the silkworm larvae on the diets with gradually reducing content of mulberry leaf powder.

Elevage des vers à soie sur les aliments avec une réduction graduelle de la teneur en poudre de feuilles de mûrier.

SUDO M., HIRATA Y., FUJIWARA Y., HORIE Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1053 Ikura, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute*, No 45, 23-33. (J,e)

Multivariant linear regression of cocoon yield with meteorological factors in 5th instar of silkworm.

Régression linéaire multivariée du rendement en cocons en fonction des facteurs météorologiques au 5ème âge larvaire chez le ver à soie.

SUN Z. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 246-247. (C)

Influence of sewage water irrigation on mulberry leaf quality and its impact on the silkworm, *Bombyx mori* L.

Influence de l'irrigation par les eaux de vidange sur la qualité des feuilles de mûrier et son impact sur le ver à soie, *Bombyx mori* L.

SURENDRA NATH B. *et al.*

Central Silk Board, Madivala, Bangalore 560 065, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 57-59. (E)

Detective difference of pebrine spores (*Nosema bombycis*) by mass and traditional mother moth examination.

Différence de détection des spores de pébrine (*Nosema bombycis*) par contrôle en masse et contrôle traditionnel des papillons.

WANG P. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 234-236. (C)

Comparison and evaluation of silkworm eggs for spring rearing of Zhejiang Province.

Comparaison et évaluation des oeufs de ver à soie pour l'élevage de printemps dans la province du Zhejiang.

WU H. *et al.*

Silkworm Egg Corporation of Zhejiang Province, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 8-10. (C,e)

Investigation of silkworm egg quality under incubation in spring.

Investigation sur la qualité des oeufs de ver à soie en incubation au printemps.

XU C.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 43. (C)

Character of the Feng 1 and Furi for summer and autumn rearing and their hybrid.

Caractères de Feng 1 et de Furi et de leur hybride pour l'élevage d'été et d'automne.

YAO Y., JIN Y.

Sericultural Institute of Huzhou City, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 29-30. (C,e)

ZJH92-1 and ZJH92-2 cocoon drying chambers.

Pièces d'étouffage des cocons ZJH92-1 et ZJH92-2.

YU A.

Cotton and Cocoon Company of Jinghua, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 13-15. (C,e)

The correlativity of pebrine contamination rate between silkworm mother moth and its next offspring.

Corrélation du taux de contamination par la pébrine entre les papillons mères des vers à soie et leurs progénitures.

YU J., CHEN Z., YUAN X.

Jixi Silkworm Egg Station of Anhui Province, 245300, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 30-31. (C,e)

Analysis of the relations between meteorology and cocoon quality.

Analyse des relations entre la météorologie et la qualité des cocons.

YU R.

General Station of Sericultural Management of Chunan County, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(3), 10-12. (C,e)

A study of 'Canbaokang' on the control of bacteriosis of silkworm (*Bombyx mori*).

Etude de "Canbaokang" pour la lutte contre les bactérioses du ver à soie (*Bombyx mori*).

ZENG J., DING H., XU W., HE L., YANG M.

Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 26-18. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Eri culture: Nature's gift.

La culture eri : un don de la nature.

ALOK SAHAY, SINGH B.K., SARAT DEORI, MUKHERJEE P.K.

Central Silk Board, Guwahati, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(5), 25-28. (E)

Foliar constituents of the food plants of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood.

Constituents foliaires des plantes hôtes du ver à soie muga *Antheraea assama* Westwood.

DUTTA L.C., KALITA M.N., SARKAR C.R.

Assam Agricultural University, Jorhat 785 013, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 85-86. (E)

Chinese oak tasar farm technology and its relevance to Indian conditions.

La technologie des fermes du tasar du chêne chinois et sa pertinence dans les conditions indiennes.

MATHUR S.K., VISHWAKARMA S.R.

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

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(5), 11-15. (E)

Chestnut for oak tasar silkworm.

Le marronnier pour le ver à soie tasar du chêne.

PANDEY R.K., SUMBLI S.N.

P.S.D.P., Varanasi, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(7-8), 13-15. (E)

Vegetable disinfectants for tasar eggs.

Désinfectants végétaux pour les œufs tasar.

PATRO K.B.G., NAYAK B.K., DASH C.

E.S.S., Pottangi, Koraput, Directorate of Textiles, Bhubaneswar, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(5), 29-32. (E)

Sericigenous fauna and flora of Himachal Pradesh.

Faune et flore séricigènes du Himachal Pradesh.

RAJA RAM

Research Extension Centre of Central Tasar Research and Training Institute, Palampur, Himachal Pradesh, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(5), 17-21. (E)

Influence of feeding gall infested tasar leaves on rearing performance of the silkworm *Antheraea mylitta*.

Influence du nourrissage avec des feuilles de tasar infestées par la galle sur les performances d'élevage du ver à soie *Antheraea mylitta*.

RAM KISHORE, RAKESH GUPTA, BARDAIYAR V.N., SINHA B.R.R.Pd., SINHA S.S.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 63-64. (E)

Age specific changes in reproductive potential and longevity in female moths of *Antheraea mylitta* D. (Lepidoptera: Saturniidae).

Changements spécifiques de l'âge dans le potentiel de reproduction et de longévité chez les papillons femelles d'*Antheraea mylitta* D. (Lepidoptera : Saturniidae).

RATH S.S., SINHA B.R.R.P., SINHA S.S.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 39-42. (E)

Impact of abiotic factors and microclimate on cocoon and seed productivity of *A. mylitta*.

Impact des facteurs abiotiques et du micro-climat sur la productivité des graines et des cocons d'*A. mylitta*.

SAXENA S.K., YADAV G.S., SOMASUNDARAM P., HARLAPUR V.K., SRINIVASU R.

BSM & TC, Chandrapur, India.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(6), 27-29. (E)

Artificial diet formulation and rearing method for *Antheraea yamamai*.

Formulation de l'aliment artificiel et méthode d'élevage pour *Antheraea yamamai*.

WANG S., WEN E., WANG F., ZHANG X., QI L.

Sericultural Research Institute, Liaoning Province, Fengcheng 118101, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 221-225. (C,e)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Nucleotide sequence of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Séquence nucléotidique d'ADN RAPD sur le chromosome W chez le ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

ABE H. *et al.*

1996 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 31, 633-637. (E)

Studies on the construction of transduction vectors for the silkworm using insect virus genes.

Etudes sur la construction, par utilisation de gènes de virus d'insectes, des vecteurs de transduction pour le ver à soie.

BANDO H.

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute*, No 45, 81-88. (J,e)

Genetic studies on the sex-linked non-molting mutation, nm-s, of *Bombyx mori*.

Etudes génétiques sur la mutation "non-mue" liée au sexe (nm-s) de *Bombyx mori*.

BANNŌ Y., GOTO H., YASUOKA M., NAKAMURA T., KAWAGUCHI Y., KOGA K., DOIRA H.

Laboratory of Sericulture, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakazaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 351-354. (E,j)

Structure of the gene encoding vitellin-degrading protease of the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure du gène codant pour la protéase dégradant la vitelline du ver à soie *Bombyx mori*.

IKEDA M., YAMASHITA O.

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 346-350. (E,j)

Discovery of a dominant major gene for fluoride-resistance in silkworm, *Bombyx mori*.

Découverte d'un gène dominant majeur pour la résistance au fluorure chez le ver à soie *Bombyx mori*.

LIN C. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 237-239. (C)

RAPD analysis of eri silkworm and domesticated silkworm.

Analyse RAPD chez le ver à soie eri et le ver à soie domestiqué.

LIU C., ZHANG C., CHEN Y.

Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 215-220. (C,e)

Characterization of a domain of the genome of Bm-NPV containing a functional gene for a small capsid protein and harboring deletions eliminating these open reading frames that are present in AcNPV.

Caractérisation d'un domaine du génome de Bm-NPV contenant un gène fonctionnel pour une petite protéine de capsid et contenant des délétions éliminant ces phases de lecture ouvertes présentes chez AcNPV.

LU M., IATROU K.*

* Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Calgary, 3330 Hospital Drive N.W., Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada.

1997 *Gene*, Vol. 185, 69-75. (E)

Two alternative promoters drive the expression of the cytoplasmic actin A4 gene of *Bombyx mori*.

Deux promoteurs alternatifs guident l'expression du gène d'actine cytoplasmique A4 de *Bombyx mori*.

MANGÉ A., COUBLE P., PRUDHOMME J.C.

CGMC, UMR 5534 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1996 *Gene*, Vol. 183, 191-199. (E)

Occurrence of a 'mariner' element in the silkworm, *Bombyx mori*.

Présence d'un élément "mariner" chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MATHAVAN S., MAYILVAHANAN S., JEYAPRAKASH A.

1996 *Curr. Sci.*, Vol. 71(1), 577-579. (E)

Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et clonage de l'ADN des protéines de la cuticule larvaire conservées au cours de l'évolution chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NAKATO H., TAKEKOSHI M., TOGAWA T., IZUMI S., TOMINO S.

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Minamiosawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-03, Japan.

1997 *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27(8/9), 701-709. (E)

Linkage studies of a polyphagous gene, Sek, which was discovered in Sekai-ich strain of the silkworm.

Etudes de liaison d'un gène polyphage, Sek, qui fut découvert chez la souche Sekai-ich du ver à soie.

OHNUMA A.
Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1053 Ikura, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 300-03, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute*, No 45, 1-6. (J,e)

Discovery of Je translucence gene in silkworm and its linkage analysis.

Découverte du gène de translucidité Je chez le ver à soie et analyse de linkage.

ZHAO Q., YE X., XIA D., QIN J.

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

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 211-214. (C,e)

Character introduction of sex-controlled silkworm lines.

Introduction de caractères dans les lignées de vers à soie limitées au sexe.

ZHU X. *et al.*

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(3), 38-39. (C)

Analysis for the sex-controlled ability of the sex-linked and balanced lethal line S-8 and S-14 on the *Bombyx mori*.

Analyse du contrôle par le sexe des lignées léthales balancées et liées au sexe S-8 et S-14 chez *Bombyx mori*.

ZHU X., HE K., XIA J., HUANG J.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 15-17. (C,e)

Vers à soie: physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Identification of ecdysis-triggering hormone in the silkworm, *Bombyx mori*.

Identification de l'hormone déclenchant l'ecdysis chez le ver à soie *Bombyx mori*.

ADAMS M.E., ZITNAN D.

Department of Entomology, University of California, Riverside, California 92521, USA.

1997 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 230, 188-191. (E)

Preliminary study on a new model to detect environmental mutagens with silkworm-baculovirus system.

Etude préliminaire sur un nouveau modèle pour détecter les mutagènes dans l'environnement avec le système de baculovirus du ver à soie.

CAO Y., XU X., HUANG Z., ZHONG Y., TAN P.

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 202-206. (C,e)

Changes in amount of some essential elements and non-enzymic oxidation resistant substances in moth stage of silkworm, *Bombyx mori*.

Variations du titre de quelques éléments essentiels et des substances résistantes à l'oxydation non enzymatiques au stade papillon chez le ver à soie *Bombyx mori*.

CHEN X. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 242-243. (C)

Dynamic distribution of fluoride in silkworm.

Distribution dynamique du fluorure chez le ver à soie.

CHEN Z. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 244-245. (C)

Hydroxy juvenile hormones: new putative juvenile hormones biosynthesized by locust *corpora allata in vitro*.

Hydroxy-hormones juvéniles : nouvelles hormones juvéniles potentielles synthétisées *in vitro* par les *corpora allata* du locust.

DARROUZET E., MAUCHAMP B., PRESTWICH G.D., KERHOAS L., UJVARY I., COUILLAUD F.

Université de Bordeaux, Laboratoire de Neuroendocrinologie, ER CNRS 629, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

1997 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 240, 752-758. (E)

A juvenile hormone mimic modulated enhancement of silk productivity in silkworm, *Bombyx mori* L.

Augmentation de la productivité en soie chez le ver à soie *Bombyx mori* L. modulée par un mimétique d'hormone juvénile.

KANIKA TRIVERDY, SASHINDRA NAIR K., AHSAN M.M., DATTA R.K.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 35-38. (E)

Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases.

Purification et caractérisation des chitinases chez *Bombyx mori*.

KOGA D., SASAKI Y., UCHIUMI Y., HIRAI N., ARAKANA Y., NAGAMATSU Y.

Laboratory of Biochemistry, Department of Biological Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753, Japan.

1997 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27(8/9), 757-767. (E)

Contribution of esterase isozymes during mating in silkworm, *Bombyx mori* L.

Contribution des isozymes des estérases au cours de l'accouplement chez le ver à soie *Bombyx mori*.

KRISHNAMURTHY N.B., UMAKANTH R.S.

Department of Sericulture Science, University of Mysore, Manasa Gangotri, Mysore 570 006, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 11-16. (E)

Purification and characterization of a protease degrading 30 kDa yolk proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation d'une protéase dégradant les protéines de 30 kD du vitellus chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MAKI N., YAMASHITA O.

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 46401, Japan.

1997 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27(8/9), 721-728. (E)

Effects of ultralow doses of fenoxycarb on juvenile hormone-regulated physiological parameters in the silkworm, *Bombyx mori* L.

Effets de très faibles doses de fénoxycarbe sur les paramètres physiologiques régulés par l'hormone juvénile chez le ver à soie *Bombyx mori* L..

MONCONDUIT H., MAUCHAMP B.

INRA - Unité nationale séricicole, 25 quai Jean-Jacques Rousseau, 69350 La Mulatière, France.

1998 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 37, 178-189. (E)

Effects of organophosphorus insecticides on protein and nucleic acid contents of fat body and silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des insecticides organophosphorés sur les contenus en protéines et en acides nucléiques du corps adipeux et de la glande séricigène chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NATH B.S., RAJU C.S., KRISHNA P.G., KUMAR R.P.S.

1996 *J. Environ. Biol.*, Vol. 17(4), 269-272. (E)

Dynamics of haemolymph sorbitol-6-phosphatase and its control by ecdysteroid in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dynamique de la sorbitol-6-phosphatase de l'hémolymphe et son contrôle par l'ecdystéroïde chez la larve du ver à soie *Bombyx mori*.

ODA Y., IWAMI M., OSANAI M., SAKURAI S.*

* Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa 920-11, Japan.

1997 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27(5), 461-468. (E)

Properties of the aminopeptidase N from the silkworm midgut (*Bombyx mori*).

Propriétés de l'aminopeptidase N provenant de l'intestin moyen du ver à soie (*Bombyx mori*).

PARENTI P., MORANDI P., MCGIVAN J.D., CONSONNIC P., LEONARDI G., GIORDANA B.
Department of General Physiology and Biochemistry, University of Milan, Via Celora 26,
20133 Milan, Italy.

1997 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 27(5), 397-403. (E)

Recent progresses of research on neuroendocrinology of the *Bombyx mori* L.

Récents progrès de la recherche sur la neuroendocrinologie chez *Bombyx mori* L.

XU J., HUANG J., HUA Y.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 1-3. (C,e)

Lipid composition of silkworm pupae (*Bombyx mori* L.) produced at silk reeling process.

Composition en lipides des chrysalides de ver à soie (*Bombyx mori* L.) produits au cours du processus de filage de la soie.

YAMAZAKI M., NAKAMURAM N., KURIOKA A.

Silk Science Research Institute, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

1997 Reports of the Silk Science Research Institute, No 45, 35-43. (J,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Refrigerating the hibernated silkworm eggs for summer rearing through three stages.

Réfrigération des oeufs de ver à soie hibernants pour l'élevage de printemps pendant trois stades.

CHENG L., SHENG J., HUANG Z., ZHANG S., XU J., PAN M.

C.S.S.E., Industrial Crops Bureau of Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(2), 31-33. (C,e)

Research on enhancing the rate of good silkworm eggs obtained by acid treatment after refrigeration.

Recherche sur l'augmentation du taux de bons oeufs de ver à soie obtenus par traitement à l'acide après réfrigération.

COLLECTIF

C.S.S.E., Industrial Crops Bureau of Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 22-23. (C,e)

Progresses of research on parthenogenesis of the silkworm (*Bombyx mori*).

Progrès de la recherche sur la parthénogenèse chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

HUANG J., HE K., XIA J.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 4-6. (C,e)

Artificial hatching of silkworm eggs (*Bombyx mori* L.) after different chilling periods.

Ecllosion artificielle des oeufs de ver à soie (*Bombyx mori* L.) après différentes périodes au froid.

HURKADLI H.K.

K.S.S.R.D.I., Thalaghattapura, Kanakapura Road, Bangalore 560 062, India.

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(1), 47-50. (E)

Effect of different lights on silkworm egg laying during mating and laying.

Effet de différentes lumières au cours de l'accouplement et de la ponte sur la ponte des oeufs de ver à soie.

LIN B., FENG J., LI D.

Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 24-26. (C,e)

Eggs incubation and its impact on larval development.

L'incubation des oeufs et son impact sur le développement larvaire.

MUNIRAJU E., SEKHARAPPA B.M., RAGHURAMAN R.

K.S.S.R.D.I., Thalaghattapura, Kanakapura Road, Bangalore 560 068, India.

1997 Indian Silk, Vol. 36(6), 10-14. (E)

Egg size of knobbed silkworm.

Taille des oeufs du ver à soie bosselé.

SAHARA K. *et al.*

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 364-366. (J)

Survival rate and egg features of first filial (F1) tetraploid silkworms from tetraploid parents.

Taux de survie et caractères des oeufs des vers à soie tétraploïdes F1 issus de parents tétraploïdes.

SAHARA K. *et al.*

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, N9, W9, Kita-ku, Sapporo 060, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 341-345. (J,e)

Discussion on the effect of improved two-step refrigeration of silkworm egg.

Discussion sur l'effet de la réfrigération en deux étapes des oeufs de ver à soie.

SHEN B., ZHU B.

Cold Storehouse of Eggs of Tongxiang City, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 34-37. (C,e)

Analysis and selection of genetic parameters on rate of unfertilized eggs in silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse et sélection des paramètres génétiques sur le taux d'oeufs non fertilisés chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

SIMA Y. *et al.*

1997 *Canye Kexue*, Vol. 23(4), 240-241. (C)

Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in nondiapause and diapause eggs.

Clonage d'un homologue de la cycline de type B provenant de *Bombyx mori* et mesure du niveau de son ARNm chez des oeufs diapausants et non diapausants. TAKAHASHI M., NIIMI T., ICHIMURA H., SASAKI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

1996 *Dev. Genes Evol.*, Vol. 206(4), 288-291. (E)

Study on hatching silkworm eggs by activation of corona.

Etude sur l'éclosion des oeufs de ver à soie par activation électrique.

WU C. *et al.*

Sericultural Station of Agricultural Bureau of Jiaxing City, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 26-28. (C,e)

The investigation on the time of activation of hibernation egg among the main spreading varieties in Zhejiang Province.

Investigation sur le moment d'activation des oeufs en hibernation parmi les principales variétés réparties dans la province du Zhejiang.

XU M., JIANG Y., HUANG Z., SENG J., CEN L., PAN M.

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

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(1), 18-21. (C,e)

Study of rare-earth complex compound on egg production.

Etude d'un complexe de terres rares sur la production des oeufs.

XU M., WU N., GUO W.

Department of Chemistry of Hangzhou University, Hangzhou, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(2), 22-25. (C,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericins 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA.

Structure et organisation du gène de la sérécine 1 et des sérécines 1 déduites de la séquence de l'ADNc de Ser 1B chez *Bombyx mori*.

GAREL A., DELEAGE G., PRUDHOMME J.C.

CGMC, UMR 5534, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1997 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 27(5), 469-477. ((E))

¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland.

NMR au carbone ¹³ de la glande séricigène ampoulaire majeure de *Nephila clavipes*.

HIJIRIDA D.H., DO K.G., MICHAL C., WONG S., ZAX D., JELINSKI L.W.

1996 *Biophys. J.*, Vol. 44(14), 118-123. (E)

Purification and N-terminal amino acid sequence analysis of a 6kDa protein from cocoon shell, *Bombyx mori*.

Purification et analyse d'une séquence N-terminale d'acides aminés d'une protéine de 6kDa provenant de la coque soyeuse de *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M., HIRANO H.

Silk Science Research Institute, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

1997 *Reports of the Silk Science Research Institute*, No 45, 45-49. (J,e)

Detection of phenol, phenoloxidase and phenoloxidase inhibitor in silk gland of silkworm, *Bombyx mori*.

Détection de phénol, de phénoloxydase et d'inhibiteur de phénoloxydase dans la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori*.

VALIVATTAN K., NELLAIAPPAN K.

Department of Zoology, Presidency College, Chennai 600 005, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(1), 67-69. (E)

Soie

Silk

Effect of natural dyes on the physical properties of silk.

Effet des teintures naturelles sur les propriétés physiques de la soie.

AHMED S.S., GOGOI A., PHUKON R., GOGOI N.

1997 *Indian Silk*, Vol. 36(7-8), 17-19. (E)

Degumming of silk fabrics with different proteases enzymes.

Décreusage des tissus de soie avec différentes protéases.

GULRAJANI M.L., GUPTA S.V., GUPTA A., SURI M.

1996 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 21(4), 270-275. (E)

Color tone and fastness of chitosan adhered tussah silk fabric dyed with various dyes.

Tenue et ton des couleurs des tissus de soie tussah traités au chitosan et teints avec différents colorants.

KAKO T., KATAYAMA A.

Himeji Junior College of Hyogo, Himeji 670, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 330-335. (J,e)

Structural changes by heating and steaming in raw mulberry silk fibers reeled from the cocoons subjected to different drying conditions.

Changements structuraux par la chaleur et la vapeur dans les fibres de soie grège issues de cocons soumis à différentes conditions de séchage.

KAWAHARA Y.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 355-356. (J)

Twist level of triplet spun silk yarn.

Niveau de torsion du fil de soie à triple brins.

MATSUMOTO Y., SAITO H., 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(5), 323-329. (J,e)

Extraction of the wave-forms corresponding to cleanness and neatness status on the surface forms of raw silk threads with defects.

Extraction des formes d'ondes correspondant à la propreté et à la netteté sur les formes de surface des fils de soie grège présentant des défauts.

TAJIMA F., ZHANG J., ISHIGURO Y.

Faculty of Education, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(5), 336-340. (J,e)

Effect of cocoon drying temperature on cocoon filament quality.

Effet de la température de séchage des cocons sur la qualité du filament du cocon.

ZHU L., HUANG G., YAO J., MIN S., LI Y.

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

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(1), 29-31. (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 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.

- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn holdly 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.

* * *