

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*)
TRENCZEK 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

Informations C. S. I. / I.S.C. information	i
Statistiques 1997 / 1997 Statistics	iii
Revue / Review	
Correlation and heritability analysis in the silkworm <i>Bombyx mori</i>	1
Analyse de corrélation et d'héritabilité chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i>	15
T. SINGH, CHANDRASEKHARAI AH & M. V. SAMSON	
Revue brève / Brief review	
Review on induction of trimoulters and their role in quality silk production in the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	21
L'induction de trimoulters et leur utilisation dans la production de soie de qualité chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	29
R. SINGH, M. M. AH SAN & R. K. DATTA	
Articles scientifiques / Scientific articles	
Developmental expression of the gene coding for the ecdysone receptor BmEcR in <i>Bombyx mori</i> posterior silk gland	33
Expression du gène codant pour le récepteur d'ecdysone BmEcR dans la partie postérieure de la glande séricigène chez <i>Bombyx mori</i> au cours du développement	39
M. COULON-BUBLEX, J.-C. PRUDHOMME	
The loci of genes located on sex-chromosome of silkworm (<i>Bombyx mori</i>) responsible for the cocoon weight and cocoon shell weight and their effect analysis	43
Les locus des gènes responsables du poids du cocon et du poids de la coque localisés sur le chromosome sexuel du ver à soie (<i>Bombyx mori</i>) et l'analyse de leurs effets	51
K. -R. HE, J.-H. HUANG & X. -R. ZHU	
Antennal and mouthpart sensilla of the muga silkworm, <i>Antheraea assama</i> (Lepidoptera: Saturniidae)	55
Les sensilles antennaire et buccale du ver à soie muga, <i>Antheraea assama</i> (Lepidoptera: Saturniidae)	65
L. K. HAZARIKA & S. BARDOLOI	
Effects of fluoride on changes of calcium copper and iron level in the important organs of silkworm larvae (<i>Bombyx mori</i> L.)	69
Effets du fluorure sur les changements du niveau de calcium, de cuivre et de fer dans les organes essentiels des larves du ver à soie (<i>Bombyx mori</i> L.)	79
Y.-Y. CHEN & Y.-C. WU	
Rapports techniques / Technical reports	
A comparative study on the effects of DFB, BHC and DDT on the uzi fly, <i>Exorista sorbillans</i> (= <i>E. bombycis</i>) (Diptera: Tachinidae)	85
Etude comparative des effets du DFB, BHC et DDT sur la mouche uzi, <i>Exorista sorbillans</i> (= <i>E. bombycis</i>) (Diptera: tachinidae)	91
L. H. SHIVASHANKARAPPA & H. P. PUTTARAJU	

Evaluation of azadirachtin for the control of the uzifly <i>Blepharipa zebina</i> (Diptera: Tachinidae)	95
Evaluation de l'azadirachtine pour la lutte contre la mouche uzi <i>Blepharipa zebina</i> (Diptera : Tachinidae)	103
R. N. SINGH & K. THANGAVELU	
Microsporogénèse chez le mûrier, <i>Morus alba</i> L.	107
Microsporogenesis in the mulberry, <i>Morus alba</i> L.	113
T. C. FONSECA, G. BANDEL & S. M. CUCO	
Genetic divergence in the mulberry	115
Divergence génétique chez le mûrier	127
R. K. FOTADAR & S. B. DANDIN	
Rhizosphere microflora of mulberry genotypes grown in the coastal saline soil	131
Microflore de la rhizosphère de génotypes de mûriers cultivés en sol côtier salin	137
S. T. P. AGASTIAN & M. VIVEKANANDAN M.	
Studies on the vesicular arbuscular mycorrhizal association in different varieties of mulberry (<i>Morus alba</i> L.)	141
Etudes sur la mycorhize arbusculaire vésiculaire chez différentes variétés de mûrier (<i>Morus alba</i> L.)	149
M. CHARITHA DEVI, A. RAJASEKHAR & M. N. REDDY	
Notes brèves / Brief notes	
Resistance ability of some multibivoltine silkworm races against fluorine toxicant (F) 151	
Capacité de résistance de quelques races de vers à soie polyvoltins à un toxique fluoré . .	153
HA VAN PHUC & NGUYEN THI DAM	
Studies on hybrid vigour in different crosses of the silkworm <i>Bombyx mori</i>	155
Etudes sur la vigueur hybride dans différents croisements chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i> .	159
R. SINGH, P. SUDHAKARA RAO, G. V. KALPANA, H. K. BASAVARAJA, M. M. AHSAN & R. K. DATTA	
Reduction of mortality by some antibiotics in nuclear polyhedrosis of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	161
Réduction de la mortalité due à la polyédrose nucléaire chez le ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L. par quelques antibiotiques	165
J. BHATTACHARYA, N. KRISHNAN, A. K. CHANDRA, N. K. DAS & S. K. SEN	
Studies on the suitability of soybean (KHSB-2 variety) as an intercrop in mulberry (M-5 variety) under irrigated conditions	167
Etudes sur l'intérêt du soja (variété KHSB-2) comme culture intercalée au mûrier (variété M-5) en conditions d'irrigation	171
U. D. BONGALE, R. M. SHIVAPRAKASH & M. VEERESH	
Bibliographie / Bibliography	173

Le Dr **S. Krishnaswami** est décédé à l'âge de 76 ans. Son nom est indissolublement lié au développement de la sériciculture en Inde. La caractéristique de sa carrière, consacrée à la recherche séricicole est que cette recherche s'est toujours effectuée avec le souci de transférer les résultats sur le terrain. Ses efforts en matière de vulgarisation se sont traduits par de nombreux ouvrages techniques, de guides et de manuels largement diffusés en Inde et qui sont toujours référence. Sa notoriété dans ce domaine est internationale puisqu'il a participé à la mise au point de deux ouvrages techniques de la F.A.O.

Les travaux du Dr Krishnaswami liant recherche et applications sur le terrain ont été à l'origine d'une véritable révolution dans la sériciculture tropicale dont les effets ont été déterminants en Inde.

C'est pourquoi, le Comité Exécutif de la C.S.I. lui avait décerné le Prix Louis Pasteur 1993 qui lui a été remis au XVI^e Congrès à Bandung (Indonésie).

Au nom de tous les états membres et en mon nom j'adresse nos condoléances à sa famille, ses amis et collègues ainsi qu'aux autorités du Central Silk Board.

Dr Gérard Chavancy
Secrétaire Général

Dr **S. Krishnaswami** died at the age of 76. His name is indissolubly linked to the development of sericulture in India. His career, dedicated to sericultural research, is characterised by the fact that this research was always undertaken so that his results could be transferred at field level. His efforts in matters of popularisation led to numerous technical books, to guides and handbooks widely distributed in India which are still works of reference. His notoriety in this field is international since he participated in the making of two of the FAO technical bulletins.

Dr Krishnaswami's studies linking research and applications at field level were at the origin of a real revolution in tropical sericulture which had major effects in India.

This is why, the I.S.C.'s Executive Committee awarded him the 1993 Louis Pasteur Prize which was presented at the XVIth Congress in Bandung (Indonesia).

On behalf of all the member states and on my behalf, I am offering our sympathy to his family, friends and colleagues as well as to the Central Silk Board.

Dr Gérard Chavancy
Secretary General

XVIIIème Congrès

A l'invitation du gouvernement égyptien, le XVIIIème Congrès de la Commission Séricicole Internationale se tiendra au Caire du 12 au 16 octobre 1999.

Les travaux seront répartis en six sections : Section I, Mûrier ; Section II, *Bombyx mori* ; Section III, Vers à soie non mûrier ; Section IV, Bacologie ; Section V, Techniques post-cocons et produits dérivés ; Section VI, Economie.

Des dossiers d'inscription seront envoyés à la fin de l'année 1998. Pour tous renseignements, consulter le secrétariat de la C.S.I ou Dr (Mme) Souad Morsi Mahmoud, Plant Protection Research Institute, 7 Nadi El-Seid Street, Dokki, Giza, Egypte, numéro de téléphone: (20) 2 337 2193/ 348 6163 ; Numéro de fax: (20) 2 335 6175 / 335 6176.

XVIIIth Congress

At the invitation of the Egyptian government, the XVIIIth Congress of the International Sericultural Commission will be held in Cairo from the 12th to the 16th October 1999.

The works will be divided into six sections: Section I, Mulberry; Section II, *Bombyx mori*; Section III, Non-mulberry silkworms; Section IV, Bacology; Section V, Post-cocoons technology and by-products ; Section VI, Economy.

Registration forms will be sent at the end of 1998. For any information, please address to the Secretary of the I.S.C or to Dr (Mrs) Souad Morsi Mahmoud, Plant Protection Research Institute, 7 Nadi El-Seid Street, Dokki, Giza, Egypt, Telephone number: (20) 2 337 2193/ 348 6163 ; Fax number : (20) 2 335 6175 / 335 6176.

Statistiques 1997 - 1997 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 1997

Table I. 1997 cocoon and raw silk production

Pays Country	Cocons frais Fresh cocoons (tonnes)	Soie grège Raw silk (tonnes)
Brésil / <i>Brazil</i>	14 811 ⁽¹⁾	2 120
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	156	21
Chine / <i>China</i>	500 000 ⁽²⁾	60 300 ⁽³⁾
Colombie / <i>Colombia</i>	42.5	21.2
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	8.1	—
Egypte / <i>Egypt</i>	21.2	2.7
France	1	0.3
Grèce / <i>Greece</i>	32	—
Inde / <i>India</i> ⁽¹⁾	115 655	14 126 ⁽⁴⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	463.8	66.6
Iran	5 000	800
Italie / <i>Italy</i>	22	0
Japon / <i>Japan</i>	2 517	1 902
Népal / <i>Nepal</i>	13 ⁽⁵⁾	1.2 ⁽⁶⁾
Ouzbékistan / <i>Uzbekistan</i>	20412	125
Philippines	5.1	—
Roumanie / <i>Romania</i>	5	0.1
Thaïlande / <i>Thailand</i>	14047 ⁽⁷⁾	1280 ⁽⁸⁾
Turquie / <i>Turkey</i>	160.6	27
Vietnam	13 000	1 400

— Non disponible / *Not available.*

(1) 96/97.

(2) dont 40 000 tonnes non mûrier / *including 40 000 tonnes non mulberry.*

(3) dont 7 600 tonnes non mûrier / *including 7 600 tonnes non mulberry.*

(4) dont 1 172 tonnes non mûrier / *including 1 172 tons non mulberry.*

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

(6) dont 200 kilogrammes non mûrier / *including 200 kilogrammes non mulberry.*

(7) dont 11 400 tonnes polyvoltins / *including 11 400 tonnes polyvoltines.*

(8) dont 950 tonnes polyvoltins / *including 950 tonnes polyvoltines.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 1997

Table II. 1997 cocoon and raw silk imports and exports

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Brésil / Brazil	341	1 892	0	1
Bulgarie / Bulgaria	5	5	—	—
Chine / China	1 152	11 089 ⁽¹⁾	1 929	225 ⁽²⁾
Colombie / Colombia	—	50.2	0	0
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	5.6	—	—	—
Egypte / Egypt	0	0	0	24.9
France	5.5	7.7	29	423
Grèce / Greece	0	0	0	—
Inde / India ⁽³⁾	0	48	55	291 ⁽⁴⁾
Indonésie / Indonesia	1.5	0	0	0
Iran	—	—	—	—
Italie / Italy	8	—	—	—
Japon / Japan	0.63	0.73	1 707	2 242 ⁽⁵⁾
Népal / Nepal	0	—	0	500
Ouzbékistan / Uzbekistan	2683	745	—	—
Philippines	0	1.2	—	44.7
Roumanie / Romania	0	0	0	0
Thaïlande / Thailand	5.2	653.5	—	495.4
Turquie / Turkey	0	0	—	—
Vietnam	0	820 ⁽⁶⁾	26.6	57

— Non disponible / Not available.

XX : pas d'exportation / d'importation / No export / import.

(1) dont 969 tonnes non mûrier / including 969 tonnes non mulberry.

(2) dont 164 tonnes non mûrier / including 164 tonnes non mulberry.

(3) 96/97.

(4) dont 922 tonnes non mûrier / including 922 tonnes non mulberry.

(5) dont 134 tonnes non mûrier / including 134 tonnes non mulberry.

(6) dont 120 tonnes non mûrier / including 120 tonnes non mulberry.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 1997*Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 1997*

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
<i>Country</i>	<i>Price paid to producers (fresh cocoons)</i>	<i>Export price (dry cocoons)</i>	<i>Import price (dry cocoons)</i>
Brésil / <i>Brazil</i>	2.54	9.34	—
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	1.70	2.20	XX
Chine / <i>China</i>	1	10.17	1.89
Colombie / <i>Colombia</i>	2.5	XX	XX
Corée du Sud / <i>South Korea</i>	11.5	—	10.7
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	1.25	11.66	—
Egypte / <i>Egypt</i>	3.40	XX	XX
France	13	—	12
Grèce / <i>Greece</i>	2	XX	XX
Inde / <i>India</i>	3.11	—	—
Indonésie / <i>Indonesia</i>	1.2	4.5	—
Iran	4.5	—	—
Italie / <i>Italy</i>	9	4	—
Japon / <i>Japan</i>	12.88	7.87	10.78
Népal / <i>Nepal</i>	2	XX	XX
Ouzbékistan / <i>Uzbekistan</i>	1.5	4.5	—
Philippines	2.3	XX	XX
Roumanie / <i>Romania</i>	1.5	XX	XX
Thaïlande / <i>Thailand</i>	2.56	—	—
Turquie / <i>Turkey</i>	4.60	XX	—
Vietnam	2	—	3.8

— Non disponible / *Not available.*xx : Pas d'exportation / d'importation / *No export / import.*

CORRELATION AND HERITABILITY ANALYSIS IN THE SILKWORM *BOMBYX MORI*

TRIBHUWAN SINGH*, CHANDRASEKHARAI AH & M. V. SAMSON

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmalram Post, Kodathi, Bangalore - 560 035, India.

*Correlation and heritability studies of quantitative traits is a pre-requisite of judicious selection for genetic improvement of complex characters. The success of selection is governed by the degree to which the desired trait is transmitted to the next generation. Nature of correlation is to be given due consideration at appropriate developmental stage for persuing selection in desired direction while improving or evolving high productive breeds or hybrids of the silkworm, **Bombyx mori**. Characters showing high heritability and high genetic advance respond better to simple phenotypic selection while those having low heritability and low genetic advance may respond better to mass selection. Characters showing high heritability and low genetic advance may yield good response to hybridization and recurrent selection. An attempt has been made in this review article to emphasize the magnitude of correlation and heritability in selection strategies for the improvement of quantitative traits in desired direction in the silkworm **Bombyx mori**.*

Keywords: *Bombyx mori*, correlation, heritability.

INTRODUCTION

The knowledge of interrelationship between quantitative characters of economic importance determining silk productivity is of paramount importance to the breeders, cocoon and egg producers, reelers, weavers, twistors and buyers. While egg producers favour strong potential genotypes producing more number of eggs, cocoon growers are interested in the genotype having high cocoon yield and healthy larvae. The filature industry favours high reelability, high percentage of raw silk and superior quality of cocoons and weaving industry requires neatness, denier, high tenacity and elongation.

For these, we cannot wait for favours from nature, but we must rest them from her and it is possible only through man's intervention to force any form of individual to change more quickly and in the direction desirable to them. Various methods are advocated for improving the quantitative characters in desired direction, which include breeding (cross breeding, in-breeding), selection, mutation etc. But, whatever system is followed, genetic improvement of quantitative character is not possible without judicious selection. Considering the importance of selection, Wright (1921) pointed out that 'Selection is the measure of permanently changing the relative proportions of various genes present in the original stock.'

Estimation of correlation and heritability in the genetic studies of quantitative characters is of special significance for selection, as its magnitude indicates the accuracy with which a genotype can be recognised by its phenotypic expression. It also helps in deciding upon a suitable selection criteria for the genetic improvement of complex characters. Thus, the knowledge of correlation and heritability of basic economic quantitative parameter is a pre-requisite of selection while creating,

* Central Silk Board, 6th Floor, B. T. M. Layout Madiwala, Bangalore - 560 068, India.

evaluating, improving or evolving high productive breeds, hybrids or strains of silkworm (Jayaswal *et al.*, 1990).

SELECTION

There are two principal methods of selection:

1. Pedigree selection

Pedigree selection is useful only when adequate information is available about the genotype. Essentially, pedigree selection is only an extension of performance testing since each individual's performance is tested and performance records are used to evaluate the related genotypes.

2. Mass selection

2. 1. Tandem method of selection (Directional selection):

In this method, the selection is directed towards improvement of only one desired trait and is continued till the goal set for this character is achieved. Thereafter, selection is made for another trait till the goal set for that trait is also achieved. Thus, in such cases the traits are selected one after the other. This is highly in-efficient method of selection, as unless the traits are genetically related, whatever achievement is made in the first trait in the first period is lost when attention is diverted to another trait. The rate of net improvement therefore becomes very small or sometimes negligible.

2. 2. Independent culling method:

In this method of selection, few parameters are considered at a time. For each parameter, minimum standard is set. The genotype must meet the minimum standard set for each of the trait, otherwise, it is to be rejected from the breeding population. If any genotype is exceptionally good in one parameter, but is bad in another parameter, it is being totally rejected. The effectiveness of this method therefore, depends on the standard chosen for each of the traits. If very high standards are fixed, the number of genotypes selected to become the parents will be very few, resulting in gradual extinction of the genotypes. On the other hand, if very low standard is set, the selection of genotype based on merit will become difficult, as most of the genotypes fulfil the set standard. Besides, fixing an arbitrary standard for each trait, it is also necessary to determine as to how many traits are to be considered at a time. This is because selection for several traits at a time reduces the selection intensity of the trait. Therefore, selection for unimportant traits should be avoided as it reduces progress in important traits. Emphasis should be given on one or two traits which are economically more important and have the capacity to respond.

2. 3. Selection index (Simultaneous selection):

The most effective method of selection is by selection index. A selection index is used when the breeder simultaneously selects many desirable economic traits to improve it in a desired direction. The theory and practice of developing an index is what Kempthorne (1977) likes to call 'Applied Quantitative Genetics'. Procedure for calculation of selection index varies from breeder to breeder. Restricted selection index (Tallis, 1962), modified base index (Baker, 1986), weight-free index for ranking genotypes (Elston, 1963) are some of the method in practice.

Theoretical comparisons among these types of selection have been done by various authors under different sets of restrictions. Finney (1962) suggested generalized formula for comparing the methods. According to him, expected change in genotypic worth in response to selection for a single trait is proportional to the ratio of co-variance. If any of these ratios is far larger than any other, tandem selection for that trait or independent culling with high selection intensity for that trait, should give response to overall genotypic value which are close to that expected from index selection. Pesek & Baker (1969) found index selection to be better than tandem selection for improving genotypic value for negatively correlated characters.

But, selection quite often does not follow the regular pattern predicted by 'Quantitative Genetics Theory' (cf. Falconer, 1981). One of the most striking manifestations of the irregularities is the 'Reversed Response', when selecting individuals for the increased value of character, results in a decreased value among their offsprings and vice-versa (Gimelfarb, 1986). A reversed response in selection experiments is rarely being given serious consideration and its significance is usually dismissed with one of the two explanations - a sudden change in environmental conditions or random drift. Caution is needed, however, before either of the two explanations is accepted in a particular case because either of the explanation under the laboratory experiments is highly improbable where conditions are kept under control by the experimenter.

Therefore, in order to obtain desirable results, it is of paramount importance to find out the type of correlations existing between quantitative parameters and their heritability before initiating any form of selection.

CORRELATION

The degree of association or relationship between two variables is measured by correlation coefficient (r). The correlation coefficient may be positive or negative. Positive correlation indicates that the two variables are varying in the same direction. In other words, if one variable increases, the other variable also increases. In negative correlation, the two variables vary in opposite direction, i.e. if one variable increases, the other decreases. There is very intimate correlation between some of the characters and an excellent character may bring down the merit of another character, if not given due consideration at the appropriate developmental stage. Correlation between different pairs of quantitative characters studied (Table I) revealed high significant ($P < 0.01$) positive values between cocoon weight and pupal weight ($r = +0.994$), cocoon weight and shell weight ($r = +0.614$), pupal weight and shell weight ($r = +0.527$), while significant ($P < 0.01$) negative values between pupal weight and cocoon shell ratio ($r = -0.827$). This indicates that selection by cocoon weight would lead to increase of pupal weight and shell weight but selection by pupal weight would lead to decrease of cocoon shell ratio.

Table I. Correlation coefficient between some pairs of economic characters in *Bombyx mori* (Singh et al., 1994).

Tableau I. Coefficient de corrélation entre quelques paires de caractères économiques chez Bombyx mori (Singh et coll., 1994).

Correlation Between	Pupal weight	Shell weight	Cocoon-shell ratio
<i>Corrélation Entre</i>	<i>Poids de la pupe</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
Cocoon weight / <i>Poids du cocon</i>	+0.994**	+0.614**	-0.764**
Pupal weight / <i>Poids de la pupe</i>		+0.527**	-0.827**
Shell weight / <i>Poids de la coque</i>			+0.035

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

Correlation studies performed to establish the relationship between female pupal weight and fecundity (Table II) indicated highly significant ($P < 0.01$) positive correlation between the two, irrespective of their weight. Fecundity have been found increasing from lower pupal weight to higher pupal weight. Similar observation was also earlier made by Mizuta *et al.* (1969), Jayaswal *et al.* (1991) and Singh (1994). Hence, selection by female pupal weight will automatically lead to increased fecundity. Positive values of correlation coefficient in the regression analysis also clearly indicated that selection of individuals for higher fecundity depends on its pupal weight but extreme pupal weight should be avoided as it may sometimes lead to bottleneck phenomenon (Basavaraja & Chandrasekharaiah, 1988). Therefore, selection of moderate pupal weight should only be encouraged for egg production, as it also determines increased larval weight, survival rate, filament length etc in the successive generations (Gowda *et al.*, 1989).

Table II. Correlation and regression between female pupal weight and fecundity in the silkworm *Bombyx mori* (cf., Singh, 1994).

Tableau II. Corrélation et régression entre le poids de la pupe femelle et la fécondité chez le ver à soie Bombyx mori (cf., Singh, 1994)

Female pupal weight (X) (g)		Average fecundity	Correlation coefficient (r)	Regression of fecundity on pupal weight (Y)
Range	Average			
<i>Poids de la pupe femelle (X)(g)</i>		<i>Fécondité moyenne</i>	<i>Coefficient de corrélation (r)</i>	<i>Régression de la fécondité sur le poids pupal (Y)</i>
<i>Amplitude</i>	<i>Moyenne</i>			
1.000-1.200	1.12308	443.600	+0.8720**	$Y = -38.7688 + 429.5053 X$
1.201-1.300	1.24280	468.040	+0.9209**	$Y = -1873.5294 + 1884.1080 X$
1.301-1.500	1.41356	487.880	+0.8646**	$Y = -510.7906 + 706.4933 X$
1.501-1.700	1.54728	535.360	+0.8456**	$Y = -398.0606 + 603.2655 X$
1.701-1.800	1.74440	559.280	+0.8366**	$Y = -1794.1461 + 1349.1322 X$
Pooled data				
<i>Données groupées</i>				
1.000-1.800	1.41422	498.831	+0.7820**	$Y = -187.6987 + 220.0028 X$

** Significant at 1 % level of significance / ** Significatif à un seuil de 1 %.

Number of individuals examined for each weight group was 25 / Le nombre d'individus examinés pour chaque classe de poids est 25.

Fecundity which has been found showing positive correlation with female pupal weight has also shown highly significant ($P < 0.01$) positive correlation with cocoon weight and cocoon shell weight (Table III). Hence, selection for higher cocoon weight, pupal weight and shell weight together would yield higher fecundity.

Correlated quantitative traits of economic importance in the silkworm *Bombyx mori* is summarised in Table IV. As fecundity is positively correlated with pupal weight (Jayaswal *et al.*, 1991, Gowda *et al.*, 1988), but negatively with productivity, cocoon-shell ratio (Kasiviswanathan, 1976) and robustness (Gowda *et al.*, 1988), every effort should be made for the improvement of negatively correlated characters without reducing the fecundity.

Cocoon yield, a very important character linked directly with the earning of sericulturists is positively correlated with survival rate (Kasiviswanathan, 1976). Cocoon weight which is being given always much emphasis in selection strategies have shown positive correlation with shell weight (Petkov, 1981 a; Singh *et al.*, 1992 a), filament length (Petkov, 1981 c) and pupal weight (Rajanna & Reddy, 1990). A high positive correlation is also established between shell weight and filament length / silkiness (Petkov, 1981 b. Long & Petkov, 1987). Filament length have also been found positively correlated with shell ratio (Petkov, 1981 b) and neatness (Kasiviswanathan, 1976). Positive correlation is also being reported between lousiness and ratio of degumming loss (Miyahara, 1978). So, when selection is enforced in the directions of high lousiness, the ratio of degumming loss increases. Generally, lousiness is more in Japanese strains and less in Chinese ones. It is more in cocoons with high shell weight. As degumming trait is closely correlated with cocoon shell weight, it is not quite easy to have a genotype showing low value for degumming trait without reducing the cocoon shell weight.

Table III. Correlation between fecundity, cocoon weight and shell weight in *Bombyx mori* (Singh *et al.*, 1994).

Table III. Corrélation entre la fécondité, le poids du cocon et le poids de la coque chez *Bombyx mori* (Singh *et coll.*, 1994).

Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Fecundity (no.)	Correlation between fecundity and Cocoon wt. Shell wt.	
<i>Poids du cocon</i> (g)	<i>Poids de la coque</i> (cg)	<i>Fécondité</i> (no.)	<i>Corrélation entre fécondité et</i> <i>poids du cocon poids de la coque</i>	
1.38±0.162	24.1±5.38	437±143	+0.765**	+0.643**
1.52±0.246	27.9±5.15	453±124	+0.867**	+0.769**
1.58±0.149	28.9±3.22	558±66	+0.785**	+0.695**
1.76±0.193	36.0±4.64	566±72	+0.866**	+0.716**
1.83±0.197	35.0±4.84	622±64	+0.759**	+0.633**
1.88±0.157	39.5±4.84	632±83	+0.584**	+0.625**

Number of female individuals examined in each case was 20. / Le nombre d'individus femelles examinés dans chaque cas est de 20.

** Significant at 1 % level of significance / ** Significatif à un seuil de 1 %.

Table IV. Significantly correlated characters in the silkworm *Bombyx mori*.**Tableau IV. Caractères significativement corrélés chez le ver à soie *Bombyx mori*.**

Correlation between	Correlation	References
<i>Corrélation entre</i>	<i>Corrélation</i>	<i>Références</i>
Fecundity and productivity	Negative	Kasiviswanathan (1976)
<i>Fécondité et productivité</i>	<i>Négatif</i>	
Fecundity and robustness	Negative	Gowda <i>et al</i> (1988)
<i>Fécondité et robustesse</i>	<i>Négatif</i>	
Fecundity and female pupal wt.	Positive	Jayaswal <i>et al</i> (1991)
<i>Fécondité et poids pupal femelle</i>	<i>Positif</i>	
Fecundity and moth weight	Positive	Gupta <i>et al</i> (1991)
<i>Fécondité et poids du papillon</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon yield and cocoon wt.	Positive	Kasiviswanathan (1976)
<i>Rendement en cocons et poids du cocon</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon yield and pupation rate	Positive	Kasiviswanathan (1976)
<i>Rendement en cocons et taux de pupaison</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon yield, filament weight and pupation rate	Positive	Ohoi <i>et al</i> (1970)
<i>Rendement en cocons, poids du filament et taux de pupaison</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon yield and survival rate	Positive	Kasiviswanathan (1976)
<i>Rendement en cocons et taux de survie</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon weight & larval rate	Positive	Satenahalli <i>et al</i> (1990)
<i>Poids du cocon & taux larvaire</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon weight & egg weight	Positive	Shamachary <i>et al</i> (1980)
<i>Poids du cocon & poids de l'oeuf</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon weight & shell weight	Positive	Petkov (1981 a)
<i>Poids du cocon & poids de la coque</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon wt. and filament length	Positive	Petkov (1981 c)
<i>Poids du cocon et longueur du filament</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon weight and pupal weight	Positive	Rajanna & Reddy (1990)
<i>Poids du cocon et poids pupal</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon weight and denier	Positive	Satenahalli <i>et al</i> (1990)
<i>Poids du cocon et titre</i>	<i>Positif</i>	
Female pupal wt. and egg wt.	Positive	Shamachary <i>et al</i> (1980)
<i>Poids pupal femelle et poids de l'oeuf</i>	<i>Positif</i>	
Female pupal wt. and larval wt.	Positive	Gowda <i>et al</i> (1989)
<i>Poids pupal femelle et poids larvaire</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon wt., shell wt., filament length of pure breeds and their hybrids	Positive	Grekov & Petkov (1990)
<i>Poids du cocon, poids de la coque, longueur du filament des races pures et de leurs hybrides</i>	<i>Positif</i>	
Cocoon wt. & cocoon silkiness	Positive	Grekov (1989)
<i>Poids du cocon & richesse soyeuse du cocon</i>	<i>Positif</i>	
Shell weight and cocoon weight	Positive	Ozdzenska & Kremky (1987)
<i>Poids de la coque et poids du cocon</i>	<i>Positif</i>	

Table IV. (Continued)

Tableau IV. (Suite)

Correlation between	Correlation	References
<i>Corrélation entre</i>	<i>Corrélation</i>	<i>Références</i>
Shell weight and pupal weight	Positive	Singh <i>et al.</i> , (1992a)
<i>Poids de la coque et poids pupal</i>	<i>Positif</i>	
Shell wt. and cocoon silkiness	Positive	Long & Petkov (1987)
<i>Poids de la coque et richesse soyeuse du cocon</i>	<i>positif</i>	
Shell wt. and filament length	Positive	Petkov (1981b)
<i>Poids de la coque et longueur du filament</i>	<i>Positif</i>	
Length and weight of filament	Positive	Ohoi <i>et al.</i> , (1970)
<i>Longueur et poids du filament</i>	<i>Positif</i>	
Larval duration (F1), reelability and neatness	Negative	Ohoi <i>et al.</i> , (1970)
<i>Durée larvaire (F1), dévidabilité et netteté</i>	<i>Négatif</i>	
Shell weight and egg weight	Positive	Shamachary <i>et al.</i> , (1980)
<i>Poids de la coque et poids de l'oeuf</i>	<i>Positif</i>	
Shell ratio and raw silk yield	Positive	Sonawalkar (1982)
<i>Richesse soyeuse et rendement en soie grège</i>	<i>Positif</i>	
Shell ratio and cocoon quality	Positive	Singh <i>et al.</i> , (1992b)
<i>Richesse soyeuse et qualité du cocon</i>	<i>Positif</i>	
Shell ratio and pupal weight	Negative	Singh <i>et al.</i> , (1992a)
<i>Richesse soyeuse et poids pupal</i>	<i>Négatif</i>	
Shell ratio and filament length	Positive	Petkov (1981b)
<i>Richesse soyeuse et longueur du filament</i>	<i>Positif</i>	
Filament length and neatness	Positive	Kasiviswanathan (1976)
<i>Longueur du filament et netteté</i>	<i>Positif</i>	
Reelability and floretta length	Negative	Liu & He (1991)
<i>Dévidabilité et longueur du floretta</i>	<i>Négatif</i>	
Filament length and reelability	Negative	Jayaswal <i>et al.</i> , (1990)
<i>Longueur du filament et dévidabilité</i>	<i>Négatif</i>	
Yield of cocoons of parent and their hybrids	Positive	Jonka (1986)
<i>Rendement en cocons des parents et de leurs hybrides</i>	<i>Positif</i>	
Reelability and tenacity	Positive	Liu & He (1991)
<i>Dévidabilité et tenacité</i>	<i>Positif</i>	
Length and size of filament	Negative	Miyahara (1978)
<i>Longueur et taille du filament</i>	<i>Négatif</i>	

Reelability of cocoons is one of the most important parameter which needs attention in the improvement programme, but, it is very complicated character to be improved upon, because it is negatively correlated with filament length (Jayaswal *et al.*, 1990) and positively with neatness (Kasiviswanathan, 1976) and the expression of which differs with environmental conditions viz., temperature, humidity, light and air current during spinning period (Jonaka, 1986).

The qualities of cocoons and fixation of price are usually assessed on the basis of cocoon and shell weights but shell ratio is a better parameter for assessing the cocoon quality for reeling because higher shell percentage leads higher raw silk yield due to their positive correlation (Sonawalkar, 1982). A positive correlation is being established between shell ratio and cocoon quality (Sonawalkar, 1982, Singh *et al.*, 1992 b), whereas, cocoon weight and shell weight does not necessarily show positive correlation with reeling performance.

It has been reported that there is a significant positive correlation between larval weight and cocoon weight, and larval weight and pupal weight (Gowda, *et al.*, 1989). Therefore, selection should be done for robust larvae (disease free) with higher larval weight. Usually, high productive worms show less viability (Murakami, 1989), which is evident from the fact that poor productivity and higher resistance for diseases are associated together in indigenous genotypes, while high productivity and poor resistance for diseases in bivoltine races. Thus, the adoptive fitness, low silk content and polyvoltinism appear to be positively correlated in silkworms (Tazima, 1988).

Genetic analysis of different quantitative traits (Gamo & Hirabayashi, 1983) indicated incomplete dominance for growth rate, raw silk percentage, filament length, filament size and reelability percentage; over dominance for pupation rate and cocoon weight and epistatic effect for pupation rate, cocoon weight, filament size and reelability percentage. Further, cytoplasmic effects were also observed in pupation rate and size of cocoon filament. As a result cocoon weight, pupation rate and cocoon yieldingness could be considered to improve by heterosis in F1 hybrids, while other characters are improved by selection. Especially, reelability of cocoons is expected to improve by the accumulation of dominant genes under the control of environmental conditions.

HERITABILITY

Every character of an organism is both hereditary and environmental as it is manifested because of long chain interactions of genes either with each other or with the environment. In fact, characters cannot be developed until and unless the genes governing them have proper environment.

Heritability of quantitative traits plays very vital role in the selection strategies. One of the most important function of the heritability in genetic studies of metric character is, its predictive role, expressing the reliability of the phenotypic value as a guide to the breeding value. With the genetic or environmental variations, the heritability estimates also change. The heritability of characters cannot be estimated from one population or one set of environmental conditions to another (Singh & Saratchandra, 1994).

Determination of heritability: Heritability is determined in two ways:

1. Broad sense heritability:

In broad sense, heritability is the ratio of the total genotypic variance to that of total phenotypic variance. It is useful in predicting the outcome of artificial selection among clones, inbred lines, varieties etc.

2. Narrow sense heritability:

In narrow sense, heritability is the ratio of additive genetic variance to the total phenotypic variance.

$$h^2 = \frac{VA}{VP}$$

(h^2 stands for heritability itself and not for its square).

It is used when artificial selection is practised in a randomly mating population. In narrow sense, generally, heritability of a character is smaller than the broad sense heritability.

Heritability is expressed either 0 - 100 or 0 - 1. Heritability estimates of different characters can be determined by the following three factors :

i). Correlation regression analysis of close relatives (for example parent - offspring, full - sibs, half - sibs etc.);

ii). Correlation response in which both desired and undesired characters are selected;

iii). Analysis of variance components.

It is important to realise that the heritability is a property not only for a character but also of the population and of the environmental circumstances to which the individuals are subjected. Heritability studies (Table V) conducted for some important quantitative traits reveals higher values for shell weight (80.20 %), growth rate (79.30 %), raw silk percentage (79.00 %), pupal weight (78.50 %), cocoon-shell ratio (72.40 %) and cocoon weight (73.60 %), while extremely low for reelability (28.00 %) and pupation rate (19.00 %).

Table V. Heritability of some economic traits in *Bombyx mori* (modified after Singh *et al.*, 1994).

*Tableau V. Héritabilité de quelques caractéristiques économiques chez *Bombyx mori* (modifiées d'après Singh *et coll.*, 1994).*

Characters	Heritability (%)
<i>Caractères</i>	<i>Héritabilité (%)</i>
Cocoon weight / Poids du cocon	73.60
Pupal weight / Poids de la pupe	78.50
Cocoon-shell ratio / Richesse soyeuse du cocon	72.40
Pupation rate / Taux de pupaison	19.00
Shell weight / Poids de la coque	80.20
Growth rate / Taux de croissance	79.30
Raw silk % / Soie grège %	79.00
Reelability / Dévidabilité	28.00

Heritability estimates for various quantitative traits in *Bombyx mori* (Table VI) reveals higher values for fecundity and filament length (Chatterjee *et al.*, 1990), cocoon weight and pupal weight (Yan, 1983), cocoon-shell weight (Tsuchiya & Kurushima, 1956), growth rate (Rajanna & Reddy, 1990 b), raw silk percentage (Gamo & Hirabayashi, 1983) and cocoon-shell ratio (Singh & Singh, 1993), while low or extremely low for pupation rate and reelability percentage (Gamo & Hirabayashi, 1983). These characters with low values of heritability are of little importance in selection strategies because here most variations are non-transmissible. Characters with high heritability as well as high genetic advance indicating possible operation of additive gene action and hence respond better to simple phenotypic selection than those having low heritability and low genetic advance (Lerner, 1958). Therefore, individual selection for those having high heritability and high genetic advance has to be resorted for obtaining results in desirable direction.

Table VI. Heritability of some economic characters in *Bombyx mori*.**Tableau VI. Héritabilité de certains caractères économiques chez *Bombyx mori*.**

Economic traits	Heritability	References
<i>Caractéristiques économiques</i>	<i>Héritabilité</i>	<i>Références</i>
Fecundity	High	Chatterjee <i>et al.</i> (1990)
<i>Fécondité</i>	<i>élevée</i>	
Larval weight	High	Satenahalli <i>et al.</i> (1990)
<i>Poids larvaire</i>	<i>élevée</i>	
Larval duration	High	Kasiviswanathan (1976)
<i>Durée larvaire</i>	<i>élevée</i>	
Growth rate	High	Rajanna & Reddy (1990 b)
<i>Taux de croissance</i>	<i>élevée</i>	
Cocoon weight	High	Yan (1983)
<i>Poids du cocon</i>	<i>élevée</i>	
Pupal weight	High	Yan (1983)
<i>Poids pupal</i>	<i>élevée</i>	
Shell weight	High	Tsuchiya & Kurashima (1956)
<i>Poids de la coque</i>	<i>élevée</i>	
Shell ratio	High	Singh & Singh (1993)
<i>Richesse soyeuse</i>	<i>élevée</i>	
Pupation rate	Low	Gamo & Hirabayashi (1983)
<i>Taux de pupaison</i>	<i>basse</i>	
Pupal duration	Medium	Ashoka & Govindan (1990)
<i>Durée pupale</i>	<i>Moyenne</i>	
Filament weight	High	Ohoi <i>et al.</i> (1970)
<i>Poids du filament</i>	<i>élevée</i>	
Filament length	High	Chatterjee <i>et al.</i> (1990)
<i>Longueur du filament</i>	<i>élevée</i>	
Filament size	High	Singh & Saratchandra (1994)
<i>Taille du filament</i>	<i>élevée</i>	
Reelability (%)	Low	Gamo & Hirabayashi (1983)
<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>basse</i>	
Raw silk (%)	High	Gamo & Hirabayashi (1983)
<i>Soie grège (%)</i>	<i>élevée</i>	
Denier (%)	High	Narasimharaju <i>et al.</i> (1990)
<i>Titre (%)</i>	<i>élevée</i>	
Neatness	High	Kasiviswanathan (1976)
<i>Netteté</i>	<i>élevée</i>	
E. R. R. (%)	High	Narasimharaju <i>et al.</i> (1990)
<i>Taux effectif d'élevage (%)</i>	<i>élevée</i>	
Cocoon yield by number and weight	High	Ashoka & Govindan (1990)
<i>Rendement en cocons par nombre et poids</i>	<i>élevée</i>	

On the contrary, moth emergence, effective rate of rearing (Narasimharaju *et al.*, 1990), larval (Kasiviswanathan, 1976) and pupal duration (Ashoka & Govindan, 1990) showing moderate to high heritability, but low genetic advance reveals operation of predominant non-additive gene action and hence respond better to hybridization and recurrent selection. Mostly, selection does not act on a single character but act on whole set of characters (Lande & Arnold, 1983) and when phenotypic correlation exists among characters, selection on a character may result in selection differentials on correlated characters (Arnold & Wade, 1984). Since expression of economic characters depends upon a number of related attributes, genetics progress will be accelerated only if selection is performed simultaneously on more than one attribute, contributing to the theme (Sen *et al.*, 1976; Singh & Subba Rao, 1994). Seasons also have some influence on heritability of various characters. The traits like silk filament, size of the filament silk content and cocoon - shell ratio have high heritability in favourable seasons compared to unfavourable ones. Thus heritability is an important tool in predicting the magnitude and speed of population improvement. With the help of heritability estimates a breeder can know how much more closely related organisms with similar genotypes resemble each other than less closely related organisms. It is also useful in predicting the outcome of artificial selection among the clones, inbred lines, varieties besides production of superior genotypes (Singh & Saratchandra, 1994).

Therefore, relations between different pairs of characters and the degree of its manifestation should be taken into consideration while performing selection keeping in view the magnitude of the objectives.

REFERENCES

- ARNOLD S. J., WADE M. J. (1984) On the measurement of natural and sexual selection: Theory - Evolution, 38: 709-719
- ASHOKA J., GOVINDAN R. (1990) Genetic estimates for quantitative traits in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. - Mysore J. Agric. Sci., 24 (3): 371-374.
- BAKER, R. J. (1986) Selection indices in plant breeding. CRC Press Inc. New York.
- BASAVARAJA H. K., CHANDRASEKHARAI AH (1988) Maintenance and utilization of silkworm gene bank in the tropics. Indian Silk, 27(1): 36-41.
- CHATTERJEE S. N., NAGARAJ C. S., GIRIDHAR K. (1990) An approach to silkworm breeding. Workshop on Biometrical Genetics - C. S. R. & T. I., Mysore, 7 - 8 September, pp: 11-16.
- ELSTON, R. C. (1963) A weight-free index for the purpose of ranking or selection with respect to several traits at a time. Biometrics, 19: 85.
- FALCONER D. S. (1981) Introduction to Quantitative Genetics- 2nd Edition, Longman Inc., New York, pp340.
- FINNEY, D. J. (1962) Genetics gains under three methods of selection. *Genet. Res.* 3: 417.
- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in the silkworm, *Bombyx mori* L. - Jap. J. Breed., 33 (2): 178 - 190.
- GIMELFARB A. (1986) Multiplicative genotype - environmental interaction as a cause of reversed response to directional selection - Genetics, 114: 333 - 343.
- GOWDA B. L. V., SANNAVEERAPPANAYAR V. T., SHIVAYOGESHWAR B. (1988) Fecundity and hatchability in mulberry silkworm, *Bombyx mori* (L) as influenced by pupal weight - Intl. Cong. Trop. Seric. Pract. Bangalore, Feb. 18-23, Part VI: 21-24.
- GOWDA B. L. V., NARAYANASWAMY T. K., MUNIRAJAPPA R. (1989) Impact of pupal weight on growth and development of the following generation in the silkworm Indian race NB7 (*Bombyx mori*) - Sericologia, 29 (3): 481-489.
- GREKOV, D. (1989) Selection - genetic evaluation of some white cocoon races of the silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Variability and correlations of quantitative traits. Zhivotnov'd Nauki, 26 (3): 70-73.

- GREKOV D., PETKOV N. (1990) Correlations between some traits and possibilities for prognostication heterosis of F1 crosses on hybridization of *Bombyx mori* L. - Zhivotnov'd Nauki, 27 (2): 80-85.
- GUPTA B. K., SINHA A. K., DAS B. C. (1991) Studies on egg yielding capacity of different races of silkworm (*Bombyx mori* L.) - Geobios, 18: 173-176.
- JAYASWAL K. P., SINGH T., SEN S. K. (1990) Correlations between economic parameters and their application in silkworm breeding - Indian Silk, 29 (2): 25-27.
- JAYASWAL K. P., SINGH T., SUBBA RAO G. (1991) Effect of female pupal weight on fecundity in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. - Indian J. Seric., 30 (2): 141-143.
- JONAKA N. (1986) Some parameters of basic quantitative breeding characters in silkworm *Bombyx mori*: II. Correlations between the basic breeding characters - Genet. Sel., 19 (2): 144-150.
- KASIVISWANATHAN K. (1976) Sericulture industry in Japan - Part VI, Silkworm Breeding and Genetics - Indian Silk, 14 (11): 13-21.
- KEMPTHORNE, O. (1977) Status of Quantitative Genetic Theory. In Proc. Intl. Conf. on Quantitative Genetics (August 16-21, 1976), Iowa State Univ., Press, p-719.
- LANDER, R., ARNOLD S. J. (1983) The measurement of selection on correlated characters - Evolution, 37: 1210-1226.
- LERNER I. M. (1958) The Genetic Basis of Selection. John Wiley & Sons., Inc., New York.
- LIU Q-X, HE S-m. (1991) Studies on the efficiency of selection for improving technological characters of cocoon filament of *Bombyx mori* L. - Canye Kaxue, 17 (2): 75-79.
- LONG N. V., PETKOV N. (1987) Breeding - Genetic studies in some silkworm (*Bombyx mori*) breeds. I. Variability and correlations of quantitative characters - Genet. Sel., 20 (1): 58-62.
- MIYAHARA T. (1978) Selection of long filament length basic variety. I. Effect of selection in the later generations - Acta Sericologia, 106: 73-78.
- MIZUTA, Y., HONOUSE, T.; WADA, T. (1969) Relationship between weight of pupae and number of eggs by moth of silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Sericult. Exp. Stn., 23 (6): 515-532.
- MURAKAMI A. (1989) Genetic studies on tropical races of silkworm (*Bombyx mori*) with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. II. Multivoltine silkworm strains in Japan and their origin - J. A. R. Q., 23(2): 123-127.
- NARASIMHARAJU R., GOVINDAN R., ASHOKA J., RAYAR S. G. (1990) Genetic variability for quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L. - Entomon, 15 (3 & 4): 197-201.
- OHOI H., MIYAHARA J., YAMASHITA A. (1970) Analysis of practically important characteristics in the silkworm in early breeding generations of hybrids. Variation among strains, correlation between parents and offspring as well as relation between each character. Tech. Bull. Sericult. Exp. Stn. Japan, MAFF, 93: 39-49.
- OZDZENSKA B., KREMKY J. (1987) Estimation of heritability and genotypic, phenotypic and environmental correlations in out-bred populations of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. - Sericologia, 27 (4): 633-638.
- PESEK, J., BAKER, R. J. (1969) Desired improvement in relation to selection indices. Can. J. Plant Sci., 49: 803.
- PETKOV N. (1981 a) The possibility of forecasting the effectiveness of selecting lines of the silkworm, *Bombyx mori* based on weight and silk content of cocoons - Selskostopanska Nauka, 19: 92-96.
- PETKOV N. (1981 b) Variability and correlations between some characteristic features of silkworm (*Bombyx mori*) - Zhivotnov'd Nauki, 18: 83-86.
- PETKOV N. (1981 c) Phenotypic correlations and regressions between some silkworm (*Bombyx mori*) breeding characters - Genet. Sel., 14: 386-390.
- RAJANNA G. S., REDDY G. S. (1990 a) Studies on the variability and interrelationship between some quantitative characters in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. - Sericologia, 30 (1): 67-74.
- RAJANNA G. S., REDDY G. S. (1990 b) New dimensions in tropical silkworm race breeding. Indian Silk, 28 (11): 8-12.

- SAMACHARY, SAMSON M. V., KRISHNASWAMI S. (1980) Some useful correlation studies of silkworm and its products such as cocoon, pupa, shell and egg weight - Indian J. Seric., 19 (1): 4-8.
- SATENAHALLI, S. B., GOVINDAN, R., GOUD, J. V., MAGADUM, S. B. (1990) Genetic parameters and correlation coefficient analysis in silkworm, *Bombyx mori* L. Mysore J. Agric. Sci., 24(4): 491-495.
- SEN S. K., SENGUPTA A. K., DAS M. G., JOLLY M. S. (1976) Studies on genetic variability, correlations, path-coefficient analysis and discriminant function in *Antheraea mylitta* D - Indian J. Seric., 15: 9-14.
- SINGH R., SARATCHANDRA B. (1994) Importance of heritability in silkworm breeding - Indian Silk - 33 (3): 21-23.
- SINGH T., CHANDRASEKHARAIHAH, SAMSON M. V. (1994) Selection strategies in relation to correlation and heritability in the silkworm, *Bombyx mori* (L) - Bull. Seric. Res., 5: 37-41.
- SINGH T., JAYASWAL K. P., SUBBA RAO G. (1992 a) Correlation studies between some economic characters in silkworm, *Bombyx mori* (L) - J. Zool. Res., 5 (1 & 2): 47 - 50.
- SINGH T., SINGH K., DAS M. (1992 b) Astounding effect of correlated parameters in silk industry - Indian Text. J., 102 (12): 26-30.
- SINGH T., SINGH K. (1993) Heritability and correlation studies between some economic characters in *Bombyx mori* L. - Sci. & Cult., 59 (3-6): 51-52.
- SINGH T. (1994) - Correlation between pupal weight and fecundity in *Bombyx mori* (L) - Ann. Entomol. 12 (1): 5-7.
- SINGH T., SUBBA RAO G. (1994) A multiple traits evaluation index to screen useful silkworm (*Bombyx mori*) (L) hybrid genotypes - Giornale Italiano Di Entomologia, 6: 379-382.
- SONAWALKAR T. N. (1982) Relationship between shell percentage and renditta / raw silk percentage - Indian Silk, 21 (6 & 7): 14-16.
- TALLIS, G. M. (1962) A selection index for optimum genotype. Biometrics, 18: 120.
- TAZIMA Y. (1988) A viewpoint on the improvement of Mysore breeds. Paper presented at Intl. Cong. Trop. Seric. Prac. held at Bangalore, Feb. 18 - 23, India.
- TSUCHIYA S., KURASHIMA H. (1956) Study on the heritability of the measurable characters in *Bombyx mori*. I. Heritability in the weight of the cocoon shell - J. Seric. Sci. Jpn., 26: 84-88.
- WRIGHT S. (1921) Systems of mating. V. General considerations - Genetics, 6: 167-168.
- YAN L. L. (1983) The estimates of heritability of pupal weight, cocoon weight and number of eggs laid in silkworm (*Bombyx mori*) and the genetic correlation between these characters and path coefficient analysis - J. Seric. Sci. China, 9 (3): 149-155.

ANALYSE DE CORRELATION ET D'HERITABILITE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI*

TRIBHUWAN SINGH*, CHANDRASEKHARAIH & M. V. SAMSON

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmalran Post, Kodathi, Bangalore - 560 035, Inde.

*Les études de corrélation et d'héritabilité des caractères quantitatifs constituent une condition de sélection judicieuse pour l'amélioration génétique des caractères complexes. Le succès de la sélection est influencé par le degré auquel la caractéristique souhaitée est transmise à la génération suivante. Une attention toute particulière doit être portée à la nature de la corrélation au stade de développement approprié pour poursuivre la sélection dans la direction désirée pendant l'amélioration ou l'évolution de races très productives ou d'hybrides du ver à soie, *Bombyx mori*. Les caractères qui montrent une grande héritabilité et une forte avance génétique répondent mieux à la simple sélection phénotypique alors que ceux qui présentent une faible héritabilité et une faible avance génétique peuvent mieux réagir à la sélection en masse. Les caractères présentant une grande héritabilité et une faible avance génétique peuvent donner une meilleure réaction à l'hybridation et à la sélection récurrente. Une tentative a été faite dans cet article de revue pour insister sur l'amplitude de la corrélation et de l'héritabilité dans les stratégies de sélection pour l'amélioration des caractères quantitatifs dans la direction désirée chez le ver à soie *Bombyx mori*.*

INTRODUCTION

La connaissance des relations entre les caractères quantitatifs d'importance économique déterminant la productivité de soie est de première importance pour les éleveurs, les producteurs de cocons et d'oeufs, les filateurs, les tisseurs, les mouliniers et les acheteurs. Alors que les producteurs d'oeufs préfèrent de forts génotypes potentiels produisant un plus grand nombre d'oeufs, les producteurs de cocons sont intéressés par le génotype ayant un rendement en cocons élevé et des larves saines. L'industrie de la filature accorde une préférence à une dévidabilité élevée, un pourcentage de soie grège élevé et une qualité supérieure de cocons, et l'industrie du tissage exige la propreté, le titre, une ténacité et un allongement élevés.

Pour cela, nous ne pouvons attendre de faveurs de la nature, mais nous devons lui extirper et cela n'est possible que grâce à l'intervention de l'homme pour obliger n'importe quel individu à changer plus rapidement et dans la voie qui convient. Diverses méthodes sont préconisées pour améliorer les caractères quantitatifs dans la direction souhaitée, ce qui inclut le lignage (le croisement et l'inbreeding), la sélection, la mutation etc. Mais, quel que soit le système adopté, l'amélioration génétique du caractère quantitatif n'est pas possible sans une sélection judicieuse. Etant donné l'importance de la sélection, Wright (1921) signale que cette "sélection est la mesure d'un changement permanent des proportions relatives des divers gènes présents dans le stock original".

L'évaluation de la corrélation et de l'héritabilité dans les études génétiques des caractères quantitatifs est d'une signification particulière pour la sélection, car son importance indique l'exactitude avec laquelle un génotype peut être reconnu par son expression phénotypique. Elle aide aussi à choisir un critère de sélection approprié pour l'amélioration génétique de caractères complexes.

* Central Silk Board, 6th Floor, BTM Layout Madiwala, Bangalore - 560 068, Inde.

Ainsi, la connaissance de corrélation et d'héritabilité du paramètre économique quantitatif fondamental est une condition de sélection pendant la création, l'évaluation, l'amélioration ou l'évolution de races, d'hybrides ou de lignées très productifs de vers à soie (Jayaswal et coll., 1990).

SELECTION

Il y a deux principales méthodes de sélection :

1. La sélection par pédigré :

La sélection par pédigré est utile uniquement lorsque l'information adéquate concernant le génotype est disponible. Essentiellement, la sélection par pédigré n'est qu'une extension du test de performance puisque chaque performance de l'individu est testée et les performances sont utilisées pour évaluer les génotypes apparentés.

2. La sélection de masse :

2.1. La méthode de sélection tandem (la sélection directionnelle) :

Dans cette méthode, la sélection est dirigée vers l'amélioration d'une seule caractéristique désirée et elle est poursuivie jusqu'à ce que le but choisi pour cette caractéristique soit atteint. Par la suite, la sélection est faite pour une autre caractéristique jusqu'à ce que le but fixé pour cette caractéristique soit également atteint. Ainsi, dans de tels cas, les caractéristiques sont sélectionnées l'une après l'autre. C'est une méthode de sélection très inefficace, à moins que les caractéristiques soient génétiquement apparentées, quelle que soit la réalisation obtenue pour la première caractéristique dans la première période, elle est perdue lorsque l'attention est détournée vers une autre caractéristique. Le taux d'amélioration nette devient donc très faible ou parfois négligeable.

2.2. La méthode de sélection indépendante :

Dans cette méthode de sélection, peu de paramètres sont pris en considération à un moment donné. Pour chaque paramètre, une norme minimale est fixée. Le génotype doit répondre à la norme minimum fixée pour chacune des caractéristiques, autrement, il doit être rejeté de la population sélectionnée. Si un quelconque génotype est exceptionnellement bon dans un paramètre, mais s'il est mauvais dans un autre paramètre, il sera totalement rejeté. Par conséquent, l'efficacité de cette méthode dépend de la norme choisie pour chaque caractéristique. Si des normes très élevées sont fixées, le nombre de génotypes sélectionnés qui deviendront des parents sera très faible, aboutissant à une extinction progressive des génotypes. Par ailleurs, si une norme très basse est fixée, la sélection du génotype basée sur le mérite deviendra difficile, vu que la plupart des génotypes répondent à la norme fixée. De plus, le fait de fixer une norme arbitraire pour chaque caractéristique est aussi nécessaire pour déterminer le nombre de caractéristiques à prendre en considération à un moment donné. Cela est dû au fait que la sélection de plusieurs caractéristiques à un moment donné réduit l'intensité de la sélection du caractère. Par conséquent, la sélection de caractéristiques insignifiantes devrait être évitée vu qu'elle réduit le progrès pour les caractéristiques importantes. L'accent devrait être mis sur une ou deux caractéristiques qui sont économiquement plus importantes et ont une capacité à réagir.

2.3. L'index de sélection (la sélection simultanée) :

La méthode de sélection la plus efficace est celle de l'index de sélection. Un index de sélection est utilisé lorsque le sélectionneur choisit simultanément d'améliorer dans une direction voulue de nombreuses caractéristiques intéressantes. La théorie et la pratique consistant à développer un index représentent ce que Kempthorne (1977) appelle volontiers "Génétique quantitative appliquée". La procédure pour le calcul de l'index de sélection varie d'un sélectionneur à l'autre. L'index de sélection restreint (Tallis, 1962), l'index de base modifié (Baker, 1986), l'index de classement des génotypes (Elston, 1963) sont quelques méthodes en pratique.

Des comparaisons théoriques parmi ces types de sélection ont été faites par divers auteurs sous différentes séries de restrictions. Finney (1962) a suggéré une formule généralisée pour comparer les méthodes. Selon lui, le changement attendu dans la valeur génotypique en réponse à la sélection pour une caractéristique unique est proportionnel au rapport de covariance. Si un de ces rapports est beaucoup plus grand que les autres, le tandem de sélection pour cette caractéristique ou la sélection indépendante avec une intensité de sélection élevée pour cette caractéristique, devraient réagir sur la valeur génotypique générale qui est proche de celle attendue à partir de la sélection d'index. Pesek and Baker (1969) ont découvert que la sélection d'index est meilleure que la sélection tandem pour améliorer la valeur génotypique pour des caractères négativement corrélés.

Mais la sélection ne suit pas assez souvent le schéma régulier prévu par "La Théorie de la génétique quantitative" (cf. Falconer, 1981). Une des plus frappantes manifestations des irrégularités est la "Réponse inverse", lorsque la sélection d'individus pour la valeur croissante du caractère aboutit à une valeur décroissante parmi leur progéniture et vice-versa (Gimelfarb, 1986). Une réaction contraire dans les expériences de sélection est rarement prise en compte de façon sérieuse et sa signification est habituellement rejetée avec une des deux explications - un changement soudain dans les conditions environnementales ou la dérive fortuite. Cependant, une certaine prudence est nécessaire avant que l'une des deux explications soit acceptée dans un cas particulier, car l'une ou l'autre des explications soumises aux expériences de laboratoire est très peu probable là où les conditions sont gardées sous contrôle par l'expérimentateur.

Par conséquent, afin d'obtenir les résultats souhaités, il est extrêmement important de découvrir le type de corrélations qui existent entre les paramètres quantitatifs et leur héritabilité avant d'entreprendre une quelconque forme de sélection.

CORRELATION

Le degré d'association ou de relation entre deux variables est mesuré par le coefficient de corrélation (r). Le coefficient de corrélation peut être positif ou négatif. La corrélation positive indique que les deux variables varient dans la même direction. En d'autres termes, si une variable augmente, l'autre variable augmente aussi. Dans une corrélation négative, les deux variables varient dans la direction opposée, c'est-à-dire si une variable augmente, l'autre diminue. Il existe une corrélation très intime entre certains caractères et un excellent caractère peut effacer le mérite d'un autre caractère, s'il n'est pas pris en compte le stade de développement approprié. La corrélation entre les différentes paires de caractères quantitatifs étudiés (Tableau I) révèle des valeurs positives hautement significatives ($P < 0,01$) entre le poids du cocon et le poids pupal ($r = +0,994$), le poids du cocon et le poids de la coque ($r = +0,614$), le poids pupal et le poids de la coque ($r = +0,527$), alors que l'on obtient des valeurs négatives significatives ($P < 0,01$) entre le poids pupal et la richesse soyeuse du cocon ($r = -0,827$). Cela signifie que la sélection par le poids du cocon mènerait à un accroissement du poids pupal et du poids de la coque mais la sélection par le poids pupal mènerait à une baisse de la richesse soyeuse du cocon.

Les études de corrélation réalisées pour établir la relation entre le poids pupal femelle et la fécondité (Tableau II) indiquent une corrélation positive hautement significative ($P < 0,01$) entre les deux, indépendamment de leur poids. On sait que la fécondité augmente du poids pupal plus faible au poids pupal plus élevé. Une observation similaire a également été faite précédemment par Mizuta et coll. (1969), Jayaswal et coll. (1991) et Singh (1994). La sélection par le poids pupal femelle aboutira ainsi automatiquement à une fécondité accrue. Les valeurs positives du coefficient de corrélation dans l'analyse de régression indique aussi clairement que la sélection des individus pour une fécondité plus élevée dépend de son poids pupal mais le poids pupal extrême devrait être évité comme il peut parfois mener à un phénomène d'étranglement (Basavaraja et Chandrasekharaiah, 1988). Par conséquent, la sélection du poids pupal modéré devrait seulement être encouragée pour la production d'oeufs, comme elle détermine aussi le poids larvaire accru, le taux de survie, la longueur du filament etc chez les générations successives (Gowda et coll., 1989).

On sait que la fécondité présentant une corrélation positive avec le poids pupal femelle manifeste aussi une corrélation positive très significative ($P < 0,01$) avec le poids du cocon et le poids de la coque du cocon (Tableau III). En conséquence, la sélection simultanée par le poids du cocon, le poids pupal et le poids de la coque plus élevés donnerait une fécondité plus élevée.

Les caractéristiques quantitatives corrélées d'importance économique chez le ver à soie *Bombyx mori* sont résumées dans le tableau IV. Etant donné que la fécondité est positivement corrélée avec le poids pupal (Jayaswal et coll., 1991, Gowda et coll., 1988), mais négativement avec la productivité, la richesse soyeuse (Kasiviswanathan, 1976) et la robustesse (Gowda et coll., 1988), chaque effort devrait être fait pour l'amélioration des caractères négativement corrélés sans diminuer la fécondité.

Le rendement en cocons, un caractère très important lié directement au revenu des sériciculteurs est positivement corrélé avec le taux de survie (Kasiviswanathan, 1976). Le poids du cocon auquel on donne toujours plus d'importance dans les stratégies de sélection présente une corrélation positive avec le poids de la coque (Petkov, 1981 a ; Singh et coll., 1992 a), la longueur du filament (Petkov, 1981 c) et le poids pupal (Rajanna et Reddy, 1990). Une corrélation très positive est aussi établie entre le poids de la coque et la longueur du filament (Petkov, 1981 b, Long et Petkov, 1987). On sait également que la longueur du filament est positivement corrélée avec la richesse soyeuse (Petkov, 1981 b) et la netteté (Kasiviswanathan, 1976). On trouve aussi une corrélation positive entre le lousiness et le rapport de la perte au décreusage (Miyahara, 1978). Par conséquent, lorsque la sélection est imposée vers un fort lousiness, le rapport de la perte au décreusage augmente. Généralement, le lousiness est supérieur chez les lignées japonaises et moindre chez les lignées chinoises. Il est supérieur chez les cocons avec un poids de coque plus élevé. Comme la caractéristique de décreusage est intimement corrélée avec le poids de la coque du cocon, il n'est pas simple d'avoir un génotype présentant une valeur faible pour la caractéristique de décreusage sans réduire le poids de la coque du cocon.

La dévidabilité des cocons est un des plus importants paramètres qui nécessite de l'attention dans le programme d'amélioration, mais, il s'agit d'un caractère très compliqué à améliorer, parce qu'il est négativement corrélé avec la longueur du filament (Jayaswal et coll., 1990) et positivement avec la netteté (Kasiviswanathan, 1976) et son expression diffère avec les conditions environnementales à savoir, la température, l'humidité, la lumière et l'aération pendant la période de filage (Jonaka, 1986).

Les qualités des cocons et la fixation du prix sont habituellement évaluées sur la base des poids du cocon et de la coque mais la richesse soyeuse est un meilleur paramètre pour estimer la qualité du cocon pour le dévidage parce que le pourcentage plus élevé de la coque mène à un rendement de soie grège plus élevé en raison de leur corrélation positive (Sonawalkar, 1982). Une corrélation positive s'établit entre la richesse soyeuse et la qualité du cocon (Sonawalkar, 1982, Singh et coll., 1992 b), alors que le poids du cocon et le poids de la coque ne présentent pas nécessairement une corrélation positive avec le rendement au dévidage.

Il a été rapporté qu'il existe une corrélation positive significative entre le poids larvaire et le poids du cocon, et le poids larvaire et le poids pupal (Gowda, et coll., 1989). Par conséquent, la sélection devrait être réalisée pour des larves robustes (épargnées de toute maladie) avec un poids larvaire plus élevé. D'habitude, des vers très productifs présentent une viabilité moindre (Murakami, 1989), ce qui est évident du fait que la faible productivité et la plus forte résistance aux maladies sont associées chez les génotypes indigènes, alors que la forte productivité et la faible résistance aux maladies sont associées chez les races bivoltines. Ainsi, la santé, le faible contenu en soie et le polyvoltinisme apparaissent être positivement corrélés chez les vers à soie (Tazima, 1988).

L'analyse génétique des différentes caractéristiques quantitatives (Gamo et Hirabayashi, 1983) indique une dominance incomplète pour le taux de croissance, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament, la taille du filament et le pourcentage de dévidabilité; une sur-dominance pour le taux de pupaison, le poids du cocon et un effet épistatique pour le taux de pupaison, le poids du cocon, la taille du filament et le pourcentage de dévidabilité. De plus, des effets cytoplasmiques sont aussi observés dans le taux de pupaison et la taille du filament du cocon. Par conséquent, le poids du

cocon, le taux de pupaison et le rendement en cocons pourraient être améliorés par l'hétérosis chez les hybrides F1, alors que d'autres caractères sont améliorés par la sélection. La dévidabilité des cocons doit s'améliorer par l'accumulation de gènes dominants sous le contrôle de conditions environnementales.

HERITABILITE

Chaque caractère d'un organisme est à la fois héréditaire et environnemental puisqu'il se manifeste après une longue chaîne d'interactions de gènes soit entre eux soit avec l'environnement. En fait, les caractères ne peuvent pas être développés jusqu'à ce que et à moins que les gènes les régissant soit dans un environnement approprié.

L'héritabilité de caractéristiques quantitatives joue un rôle extrêmement vital dans les stratégies de sélection. Une des fonctions les plus importantes de l'héritabilité dans les études génétiques de caractères quantitatifs est son rôle prédictif, exprimant la fiabilité de la valeur phénotypique comme un guide pour la valeur de sélection. Les évaluations d'héritabilité changent avec les variations génétiques ou environnementales. L'héritabilité des caractères ne peut pas être évaluée à partir d'une population ou d'un ensemble de conditions environnementales à un autre (Singh et Saratchandra, 1994).

La détermination de l'héritabilité : l'héritabilité est déterminée dans deux directions.

1. L'héritabilité au sens large :

Au sens large, l'héritabilité est le rapport de la variance génotypique totale sur la variance phénotypique totale. Elle est utile pour prédire le résultat de la sélection artificielle parmi les clones, les lignées consanguines, les variétés etc.

2. L'héritabilité au sens étroit :

Au sens strict, l'héritabilité est le rapport de la variance génétique additive sur la variance phénotypique totale.

$$h^2 = \frac{VA}{VP}$$

(h^2 représente l'héritabilité et non pas son carré).

Elle est utilisée lorsque la sélection artificielle est pratiquée dans une population s'accouplant au hasard. En général, au sens strict, l'héritabilité d'un caractère est plus petite que l'héritabilité au sens large.

L'héritabilité est exprimée soit de 0 à 100 soit de 0 à 1. Les évaluations de l'héritabilité des différents caractères peuvent être déterminées par les trois facteurs suivants :

- i) L'analyse de régression de corrélation des parents proches (par exemple, parent - progéniture, fratrie intégrale, demi - fratrie etc.) ;
- ii) La réaction de corrélation dans laquelle les caractères désirés et non désirés sont sélectionnés.
- iii) L'analyse des composants de la variance.

Il est important de se rendre compte que l'héritabilité n'est pas une propriété seulement pour un caractère mais aussi une propriété de la population et des circonstances environnementales auxquelles les individus sont soumis. Des études d'héritabilité (Tableau V) conduites pour quelques caractéristiques quantitatives importantes révèlent des valeurs plus élevées pour le poids de la coque (80,20 %), le taux de croissance (79,30 %), le pourcentage de soie grège (79,00 %), le poids pupal (78,50 %), la richesse soyeuse (72,40 %) et le poids du cocon (73,60 %), alors que d'autres sont extrêmement faibles pour la dévidabilité (28,00 %) et le taux de pupaison (19,00 %).

Les évaluations d'héritabilité pour diverses caractéristiques quantitatives chez *Bombyx mori* (Tableau VI) révèlent des valeurs plus élevées pour la fécondité et la longueur du filament (Chatterjee et coll., 1990), le poids du cocon et le poids pupal (Yan, 1983), le poids de la coque (Tsuchiya et Kurushima, 1956), le taux de croissance (Rajanna et Reddy, 1990 b), le pourcentage de soie grège (Gamo et Hirabayashi, 1983) et la richesse soyeuse (Singh et Singh, 1993), alors que d'autres sont faibles ou très faibles pour le taux de pupaison et le pourcentage de dévidabilité (Gamo et Hirabayashi, 1983). Ces caractères avec de faibles valeurs d'héritabilité sont d'une faible importance dans les stratégies de sélection car ici la plupart des variations ne sont pas transmissibles. Les caractères avec une héritabilité élevée et une grande avance génétique indiquant une éventuelle opération d'action de gènes additifs réagissent donc mieux à la simple sélection phénotypique que ceux ayant une faible héritabilité et une avance génétique faible (Lerner, 1958). Par conséquent, la sélection individuelle pour ceux qui ont une forte héritabilité et une grande avance génétique doit être utilisée pour obtenir des résultats dans la direction souhaitable.

Au contraire, l'émergence du papillon, le taux effectif d'élevage (Narasimharaju et coll., 1990), la durée larvaire (Kasiviswanathan, 1976) et la durée pupale (Ashoka et Govindan, 1990) donnent une héritabilité modérée à élevée, mais une avance génétique faible révèle l'action prédominante de gènes non additifs qui, par conséquent, réagit mieux à l'hybridation et à la sélection récurrente. Le plus souvent, la sélection n'agit pas sur un seul caractère mais elle agit sur un ensemble de caractères (Lande et Arnold, 1983) et lorsque la corrélation phénotypique existe parmi les caractères, la sélection sur un caractère peut entraîner des différences de sélection sur les caractères corrélés (Arnold et Wade, 1984). Etant donné que l'expression des caractères économiques dépend d'un nombre d'attributs apparentés, le progrès génétique sera accéléré seulement si la sélection est réalisée simultanément sur plus d'un attribut, contribuant au thème (Sen et coll., 1976 ; Singh et Subba Rao, 1994). Les saisons ont aussi une certaine influence sur l'héritabilité de divers caractères. Les caractéristiques comme le filament de soie, la taille du filament, le contenu de soie et la richesse soyeuse ont une héritabilité élevée lors de saisons propices par rapport aux saisons non propices. Ainsi l'héritabilité est un outil important pour prédire l'ampleur et la vitesse de l'amélioration de la population. A l'aide des évaluations d'héritabilité, un sélectionneur peut mieux savoir combien des organismes très intimement apparentés avec des génotypes similaires se ressemblent par comparaison avec des organismes moins intimement apparentés. Il est aussi utile de prédire le résultat de la sélection artificielle parmi les clones, les lignées consanguines, les variétés hormis la production de génotypes supérieurs (Singh et Saratchandra, 1994).

Par conséquent, les relations entre les différentes paires de caractères et le degré de leurs manifestations devraient être considérées pendant la réalisation de la sélection en gardant en tête l'amplitude des objectifs.

REVIEW ON INDUCTION OF TRIMOULTERS AND THEIR ROLE IN QUALITY SILK PRODUCTION IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

RAVINDRA SINGH, M. M. AHSAN & R. K. DATTA

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore - 570008, India.

Keywords: *Bombyx mori*, breeding, sex-linked trimoulters.

INTRODUCTION

In the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, moultinism undergoes striking changes under the influence of environmental factors (Morohoshi, 1957 ; Tazima, 1964). Inheritance of trimoulters is extensively studied in silkworm induced by environmental factors (Takamiya, 1975b ; Komori and Yoshitake, 1979a), various chemicals (Kanda *et al.*, 1985 ; Kiuchi *et al.*, 1986 ; Ye *et al.*, 1987) artificial diets (Takamiya, 1975a ; Nishimura, 1984) and leaves of some mulberry varieties (Sasaki, 1951 ; Anonymous, 1975). Trimoulters have been utilised for the production of high quality fine silk (Lu *et al.*, 1987 ; Liu and Lu, 1988 ; Luc *et al.*, 1992). Some anti-juvenile hormones have been found effective in the control of filament size, quality and uniformity of silk filament as well as increase of silk yield (Akai *et al.*, 1984 ; Kataoka *et al.*, 1985 ; Schnal and Akai, 1990). Besides, trimoulters inducers have been used in silkworm egg production (Kubota *et al.*, 1986 ; 1990 ; Lu and Wu, 1996). Rearing techniques of trimoulters have been studied by several workers (Suda *et al.*, 1988 ; Kousaka *et al.*, 1988a ; 1988b ; Takamiya, 1990). It has been observed that there is a possibility of appearance of trimoulters in those tetramoulting silkworm strains which possess more quantitative characters (Mano, 1994).

Sex-linked inheritance of quantitative characters in trimoulters has been reported in silkworm (Toyama, 1912 ; Itikawa, 1941 ; Sidhu, 1967 ; Komori, 1979 ; Komori and Yoshitake, 1979a, 1979b, Singh *et al.*, 1989). Attempts have been made to utilise trimoulters in production of high quality silk through hybridisation (Hirobe, 1956 ; Sidhu and Singhal, 1977 ; Yamamoto *et al.*, 1986 ; Singh *et al.*, 1990a) and through chemicals (Lu *et al.*, 1989 ; 1990 ; Zhuang *et al.*, 1992). Efforts have also been made to utilise trimoulters in silkworm breeding (Shen, 1991 ; He and He, 1994 ; 1997 ; Singh *et al.*, 1994).

INHERITANCE OF TRIMOULTING CHARACTER

Attempts have been made on inheritance of quantitative characters in trimoulters (Nagatomo, 1926 ; 1941) and in hybrids between trimoulter and tetramoulter and trimoulter and pentamoulter (Morohoshi, 1957). In 1926, Nagatomo and Shen independently reported sex-linked inheritance of some quantitative characters like body size and cocoon shell weight. This phenomenon was interpreted in different ways. Nagatomo proposed a hypothesis that major genes controlling early and late maturity, are linked to Z chromosome whereas Shen assumed a sex-linked quantitative major gene. Later, Morohoshi (1957) identified three maturity genes i.e. early, intermediate and late on Z chromosome.

It was Toyama (1912) who first isolated moulting genes in silkworm and reported that trimoulting is a simple dominant over tetramoulting. Ogura (1931) found that the moulting gene is linked to a cocoon colour gene, F, and by using the linkage relation he was able to demonstrate the multiple allelic genes for three moulting characters i.e., M^3 , ^{M} and M^5 controlling trimoulting, tetramoulting and pentamoulting characters respectively. Now it is clear that inheritance of moulting is not only controlled by multiple allelic genes but also by interaction of two genetic systems (sex-linked maturity genes and autosomal moulting genes) which are under the control of hormonal system. Moulting characters are constant in each race or line, however there is change of characters in some strains or hybrids. This may be either due to environmental effects or due to prosperous metabolism (Morohoshi, 1957). In general, occasionally segregated trimoulters are males (Tazima, 1964).

Studied have been made on the sex-linked manifestation of quantitative character in 5th instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Oshiki, 1978 ; 1979). Only female trimoulters in F1 hybrid of European 16 × Cambodge were observed (Itikawa, 1941). Similarly, Sidhu (1967) observed female trimoulters in a specific cross of Mysore A White female and Nan Nun 6D males. Appearance of only females in crosses of bivoltine female and trimoulter males has been reported (Singh *et al.*, 1989 ; 1990a ; 1994 ; Nagaraju *et al.*, 1996).

TRIMOUTLER RACES AND BREEDING

Trimoulter races have long been reared in China and Korea. For example Si, Chuang, San, Mian and Shan, Dong, San and Mian races. In Japan, trimoulters were utilised since 1940 and a hybrid Samin-Haku × C108 was evolved. Later, in 1944, another hybrid, C21 × Sanko which was evolved by Silk Science Research Institute, was authorised by Japanese Government and it was utilised until 1958. In 1951, another trimoulter hybrid Kyokko × Sekka was evolved by Gunze Company Ltd. which was utilised until 1970. Hirobe (1952 ; 1956) pointed out the importance of cytoplasm in the manifestation of heterosis in silkworm.

Studies on hybrid vigour in hybrids of trimoulter and tetramoulters strains of the silkworm, *Bombyx mori* have been carried out (Singh *et al.*, 1990a). Comparative study of several quantitative and qualitative characters between trimoulters and tetramoulters segregated from F1 hybrids between dominant trimoulter was conducted and found less size deviation of filament, high pupation rate and neatness as compared to tetramoulters (Yamamoto *et al.*, 1986). Singh *et al.* (1994) have observed higher consumption index and growth rate in trimoulters and better reelability in trimoulter and their hybrids. Trimoulters may be utilised in the evolution of healthy silkworm strains with shorter larval span as well as to save labour and to produce high grade quality silk. Recently, a dominant trimoulter silkworm strain 'SG' with stable moulting and good economic characters has been bred (He and He, 1997).

FACTORS AFFECTING EXPRESSION OF TRIMOULTING CHARACTERS

Several environmental factors are known to induce trimoulters in silkworm such as low temperature incubation, high temperature and humidity during younger instars (Morohoshi, 1957), mulberry leaves (Sasaki ; 1951 ; Anonymous, 1975), length of light and dark periods per day (Kogure, 1933). Among these factors, high temperature is the most effective to induce trimoulters. Morohoshi (1957) obtained 27.09% trimoulters from tetramoulters following incubation at low temperature whereas high temperature (38 °C) and high humidity (90%) were more effective in 3rd and 4th instars. Light exerts more effect in 1st and 2nd instars and also the effect of light for any two successive instars was more than any single instar (Kogure, 1933).

Good nutrition during early larval instars coupled with high temperature resulted in appearance of trimoulters from normal tetramoulters (Morohoshi, 1957). Gu *et al.*, (1991) have induced trimoulters by high temperature and moisture during early stage of 4th instar. Takamiya (1975b) studied combined effect of temperature and photoperiod on moulting in the silkworm. Takamiya

(1975b) has induced 100% trimoulters following feeding with high meal diet containing defatted soybean. Appearance of trimoulters has been found while rearing of silkworms on artificial diet throughout the larval stage (Nishimura *et al.*, 1984). According to Murakami (1994), growth rate in larval stage is under the control of certain genetic factors regardless of moultnism. Effect of season on the manifestation of quantitative traits in a trimoulter strain of the mulberry silkworm has been studied (Singh *et al.*, 1990b).

CHEMICAL INDUCTION OF TRIMOULTERS

Chemicals with anti-juvenile hormone activity have been demonstrated to be useful for sericulture in the production of fine cocoon filament and to increase healthiness and silk content (Akai *et al.*, 1984 ; Kanda *et al.*, 1985 ; Miao *et al.*, 1996). Trimoulters have been induced from F1 hybrids of tetramoulters by oral administration of a 2-hydroxy-methyl-5-hydroxy-4-pyridone (Murakoshi and Ichimoto ; 1972) and Kojic acid (Takeya, 1979 ; Murakoshi, 1972). Precocious trimoulters have been induced in silkworm following treatment with SSP-11, an imidazole derivative (Kiuchi *et al.*, 1986 ; Takayama ; 1990). Endocrinological changes in trimoulters in silkworm induced by an imidazole compound were observed (Gu *et al.*, 1988).

Anti-juvenile hormones have been utilised extensively to induce trimoulters in the silkworm, *Bombyx mori*. Kubota *et al.*, (1988) have studied the effect of anti-JH on dietary efficiency and filament size in precocious trimoulters. An increase in silk production as well as trimoulter induction by anti-JH treatment have been studied (Kubota *et al.*, 1986). Kozakai and Mizusawa (1988) compared growth of silkworm larvae between trimoulter races and trimoulters induced by an anti-juvenoid. A comparative study on corpora allata in normal and induced trimoulters by anti-juvenoid has been made (Ye *et al.*, 1987).

Ichida (1988) has studied susceptibility of trimoulter larvae induced by anti-juvenoid to infection with *Bauvaria bassiana*. It has been reported that quality of the raw silk of trimoulters induced by anti-JH changed like strong tenacity, low percentage of sericin, high flexibility, fine silk filament (Yoshida *et al.*, 1989). Shimizu and Akai (1992) have studied oviposition and food efficiency of trimoulters induced by anti-JH. Zhuang *et al.*, (1992) have found improved quality of filament following treatment with YA 20, an anti-JH and found better reelability, little size deviation, strong raw silk elongation and cohesion producing 4A-6A grade high quality silk. Effect of 1-citromethyl-5-phenyl imidazole (KK-42), an anti-JH, on the induction of precocious pupation and increase of body weight has been reported (Asano *et al.*, 1984, 1987). Kiuchi *et al.*, (1985) induced 100% trimoulters from tetramoulters following administration of an anti-JH during first 48 hrs of 1st, 2nd, 3rd or 4th larval stages. Cocoon produced in trimoulters induced by Kiuchi *et al.*, (1985), had a filament size ranging from 3.0 to 0.8 denier (Kataoka *et al.*, 1985). Tan *et al.*, (1988) observed precocious metamorphosis in wild silkworm, *Antheraea yamamai* following treatment with an imidazole compound. Appearance of trimoulters following treatment with abietic acid and its derivatives to F1 larvae of tetramoulters just after 3rd moult, has been observed (Murakoshi *et al.*, 1975). Oshiki and Tamura (1985) induced precocious trimoulters following treatment with 'Manta', a juvenoid substance during 1st to 3rd instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Tan *et al.* (1992) have found up to 95% trimoulters following treatment with SD-II.

In China, some chemicals have been developed for complete induction of trimoulters from tetramoulters. Lu *et al.*, (1992) induced 100% trimoulters following treatment with SM1, an imidazole compound, during 3rd and 4th instar larvae. High survival, higher reelability, low cost of egg production, 3-4 days shorter larval duration, less filament size deviation and better quality silk with good neatness have been found following treatment with SM1 (Liu *et al.*, 1987 ; Lu and Li, 1987 ; Liu and Lu, 1988 ; Lu *et al.*, 1989). Dai *et al.* (1987) found improvement in silk gland growth after treatment with SM1. Accelerated rate of 3H-thymidine incorporation into DNA in posterior silk gland following treatment with SM1 has been reported (Shen *et al.*, 1990) and the peaks of DNA and RNA contents of trimoulters was 4-6 days earlier than the control.

Induction of trimoulters and relation between mulberry feeding amount and cocoon weight, cocoon yield, filament quality, feeding habit of silkworm strain have been studied (Lu *et al.*, 1990 ; Lu *et al.*, 1992). Recently, Lu and Wu (1996) by treatment with Golden Dear (GD), an imidazole compound during 3rd and 4th instar silkworm induced trimoulter, increased healthiness, the amount of eggs produced per kg of cocoon and suggested a new technology of trimoulter egg production.

CONCLUSION

Development of silkworm strains with high egg laying efficiency, more viability of larvae, less incidence of diseases, shorter larval duration, less consumption of mulberry leaves, fine silk with less size deviation, longer filament, higher neatness points, evenness, tenacity and reelability would be beneficial to the silk industry. Attempts have been made to induce trimoulter from tetramoulter silkworms through environmental factors, chemicals like SM1 and Golden Dear which are water soluble and do not exert an adverse effect on silkworm whereas chemicals like KK-42 and SSP-11 are fat soluble and may exert an adverse effect on silkworms. Some anti-juvenile hormones are found useful in controlling quality and uniformity of silk filament and increase of silk yield. It is easy to induce trimoulters from Chinese tetramoulter silkworm strains. Induced trimoulters have been produced on commercial scale and utilised for production of superfine silk fabrics as well as isolation of trimoulter silkworm strains with sex-limited character. In the present review, an attempt has been made to collect all the literature on trimoulters in one place and make it available to the scientists engaged in sericultural research.

REFERENCES

- AKAI, H. KIMURA, K. KIUCHI, M. SHIBUKAWA A. (1984) Effect of anti-juvenoid treatment on the cocoon and cocoon filaments in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 53, 545-546.
- ANONYMOUS (1975) Text book of tropical sericulture. Japan overseas co-operation volunteers, Tokyo, Japan. 417-420.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M (1984) Induction of precocious metamorphosis by dietary administration of 1-citromethyl-5-phenylimidazole in the 4th instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Pesticide Sci. 9, 503-509.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M. (1987) Threshold size for precocious metamorphosis by an anti-juvenile hormone in silkworm larvae, *Bombyx mori*. Appl. Ent. Zool., 22(4), 424-433.
- DAI, Z., HUANG J., LU X., LI R. (1987) Effect of trimoulting silkworm inducer SM-1 on the regulation mechanisms of the silk fibroin synthesis of silkworm. 1) Effect of SM-1 on the incorporation rate of 3H-glycine into the silk fibroin and the submicroscopic structure changes of the posterior silk gland. Acta Sericologica Sinica 13(3), 138-142.
- GU S. H. ; IWASHITA, Y. , KAWASAKI H. (1988) Endocrinological changes of trimoulter silkworms induced by an imidazole compound. J. Seric. Sci. Japan 57(3), 210-215.
- GU S. H., IWASHITA Y., KAWASAKI H., LINE F. J. (1991) Changes of haemolymph ecdysteroid titers in various trimoultings of *Bombyx mori* during the 3rd and 4th instar. J. Seric. Sci. Japan 60(2), 112-116.
- HE Y., HE S. (1994) Application of inducing trimoulter in breeding, *Bombyx mori*, Sci. Seric. 20(1), 30-34.
- HE Y., HE S. (1997) Breeding of a dominant silkworm trimoulter SG. Acta Sericologica Sinica 23(1), 24-27.
- HIROBE T. (1952) On the heterosis of 'Sanminsho' (a kind of three-moulter) J. Seric. Sci. Japan 21-61.
- HIROBE T. (1956) An analysis of heterosis made with silkworm. Proc. Internat. Genet. Symp., 357-361.
- ICHIDA M. (1988) Susceptibility of the trimoulter larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by an anti-juvenoid to the infection with *Bauveria bassiana*. J. Seric. Sci. Japan 57(3), 233-234.

- ITIKAWA N. (1941) On facultatively occurred trimoulters in the silkworm. J. Seric. Sci. Japan 12, 17-23.
- KANDA T., KIUCHI J., MURAYAMA A., AOKI T., TAKAHASHI T., KANDA W., CHENG Y., KUWANO, E., ETO M. (1985) Induction of precocious trimoulting silkworms by anti-juvenile hormone and the physical properties of the cocoon filament and fabrics. Bull. Seric. Expt. Sta. 30, 123-149.
- KATAOKA K., IMAI T., KIUCHI M., AKAI H. (1985) Physical properties of filament of trimoulters induced by an anti-juvenoid in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan 54(5), 377-381.
- KIUCHI M., KIMURA K., AKAI H. (1985) Induction of trimoulters from a tetramoulters strain of *Bombyx mori* by anti-juvenoid treatment. J. Seric. Sci. Japan 54(1), 77-81.
- KIUCHI M., ABES S., AKAI H. (1986) Growth and food efficiency in precocious trimoulters silkworms induced by the administration of anti-JH compound. J. Seric. Sci. Japan 55(3), 246-251.
- KIUCHI M., KIMURA K., AKAI H. (1988) Induction of trimoulters from a tetramoulters strain of *Bombyx mori* by anti-juvenoid treatment. J. Seric. Sci. Japan 54(1), 77-81.
- KOGURE M. (1933) the influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Dept. Agri. Kyushu Imp. Univ. 4, 1-93.
- KOMORI S. (1979) Interactions of a recessive trimoulting gene and a sex-linked late maturing gene on the manifestation of moultnism in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan 48(5), 371.
- KOMORI S., YOSHITAKE N. (1979a) Interaction of recessive trimoulting gene and a sex-linked late maturing gene I. On the manifestation of moultnism in the recessive trimoulting strain with a sex-linked late maturing gene Lm. J. Seric. Sci. Japan 48(4), 268-272.
- KOMORI S., YOSHITAKE N. (1979b) Interaction of recessive trimoulting gene and a sex-linked late maturing gene II. On the manifestation of moultnism in the recessive trimoulting strain with a sex-linked late maturing gene, Lm^c in the silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan 48(4), 277-281.
- KOUSAHA T., SUDA Y., TAKABAYASHI K., KURIBAYASHI S. (1988a) Amount of mulberry leaves ingestion and digestion by the first and the second instar larval of trimoulters silkworm. Acta Sericologica 140 9-13.
- KOUSAHA T., SUDA Y., TAKABAYASHI K., KURIBAYASHI S. (1988b) Efficient amount of supplied mulberry leaves for the cocoon production during the fourth larval instar to trimoulters silkworm. Acta Sericologica 140, 15-19.
- KOZAKAI Y., MIZUSAWA H. (1988) A comparison of trimoulters races induced by an anti-juvenoid for the growth of the silkworm, *Bombyx mori*. Tech. Bull. Seric. Expt. Sta. 134, 205-221.
- KUBOTA T., KIUCHI M., AKAI H. (1986) Induction of trimoulters from tetramoulters and increase of silk production by repeated treatments with anti-juvenile hormone. J. Seric. Sci. Japan 55(6), 527-528.
- KUBOTA T., KIUCHI M., AKAI H. (1988) Effects of repeated treatments of the anti-JH on dietary efficiency and size of the cocoon filament in precocious trimoulters silkworms. J. Seric. Sci. Japan, 57(5), 409-414.
- LIU G., CHEN W. X., LU D. F., LI R. (1987) Studies on the reelability of trimoulting cocoons induced by SM-I and the physical properties of its filament in *Bombyx mori*. Sci. Seric. 13(3), 144-149.
- LIU G., LU X. (1988) Studies on mechanical properties and function as clothing of superfine silk of trimoulting silkworm and its core spun yarn. Sci. Seric. 14(4), 219-223.
- LU X., LI R. (1987) Studies on the superfine silk production of induced trimoulting silkworm by SM-I. Sci. Seric. 13(2), 71-76.
- LU X., GU J., WU Y. (1989) Application of trimoulting inducer on silkworm egg production. I. Comparison between inductive trimoulters and normal tetramoulters. Sci. Seric. 15(2), 74-78.
- LU X., LI R., SHEN Z. (1992) Studies on the production of superfine cocoon silk by inducing trimoulting silkworm with chemicals Internat. Entomol. Cong. Beijing 1-11.
- LU X., WU Y., WU E. (1990) Application of trimoulters inducer on silkworm egg production. II. Induction of trimoulting silkworms for hybrid parents and propagation of their offsprings. Sci. Seric. 16(2) 65-70.

- LU X. WU Y. (1996) Physiological regulation of Golden Dear (GD) trimoulter inducer in silkworm and new technology of inductive trimoulter egg production J. Zhejiang Agric. Univ. Hangzhou 22(4), 363-368.
- MANO Y. (1994) Comprehensive report on bivoltine sericulture technology development in India, CSR&TI, Mysore 1-126.
- MIAO Y., YU S., REN X., PAN W. (1996) Studies on the mechanism of anti-juvenile hormone and moulting hormone in silkworm (*Bombyx mori* L.) J. Zhejiang Agric. Sci. 22(4), 345-348.
- MOROHOSHI S. (1957) Physiogenetical studies on the moultnism and voltinism in *Bombyx mori* Japan Soc. for the Pro of Sci. Tokyo, Japan 69-87.
- MURAKAMI A. (1994) Growth phenomena in *Bombyx mori* L. with a special reference to genetic factors responsible for growth acceleration and moultnism. Indian J. Seric. 33(1), 12-14.
- MURAKOSHI S. (1972) On the appearance of three-moulters from the F1 hybrid of four-moulters in the silkworm, *Bombyx mori* L. orally administered with Kojic acid. Jap. J. Appl. Ent. Zool. 16, 111-113.
- MURAKOSHI S., ICHIMOTO I. (1972) On the appearance of three-moulters from the F1 hybrid of four-moulters in the silkworm, *Bombyx mori* due to oral administration of a 2-hydroxy-methyl-5-hydroxy-4 pyridone. Jpn. J. Appl. Ent. Zool. 16(3), 159-161.
- MURAKOSHI S., NAKATA T., OHTSUKA Y., AKITA H., TAIHARA A., TAMURA S. (1975) Appearance of three-moulters from larvae of the silkworm, *Bombyx mori* by oral administration of abietic acid derivatives. Jap. J. Appl. Ent. Zool. 19(4), 267-272.
- NAGARAJU J., URS, R. DATTA, R. K. (1996) Cross-breeding and heterosis in the silkworm, *Bombyx mori*. A review. Sericologia 36(1), 1-20.
- NAGATOMO T. (1926) On the sex-linked inheritance of quantitative characters in the silkworm, *Bombyx mori* J. Sci. Agr. Soc. Tokyo, 281, 155-180.
- NAGATOMO T. (1941) Sex-linked inheritance of trimoulting in *Bombyx mori* J. Seric Sci. Japan. 12, 171-183.
- NISHIMURA M., YAMAMOTO T., NAGAYASU, K. MURAKAMI A. (1984) On the appearance of three moult in the silkworm strain selected by rearing on artificial diet throughout the larval stage. Acta Sericologia, 130, 52-60.
- OGURA S. (1931) Erbliehkeitsstudien am Seidenseinner *Bombyx mori* L. I. Genetische Untersuchung der Kokonfarbe Z.IA.V.58, 122-156.
- OSHIKI T. (1979) Studies on sex-linked manifestation of the quantitative characters in *Bombyx mori*. I. Segregation of trimoulters from the tetramoulter groups in reciprocal hybrid. J. Seric. Sci. Japan 47(4), 351-356.
- OSHIKI T. (1979) Study on the sex-linked manifestation of the quantitative characters in *Bombyx mori* III. Relation between growth and development of 5th instar larvae and quantitative character of the cocoon. J. Seric. Sci. Japan 48(2), 159-163.
- OSHIKI T., TAMURA H. (1985) Changes in the pattern of moulting associated with the administration of a juvenoid to the early instar larvae of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan 54(2), 138-142.
- SASAKI S. (1951) Relation between the mulberry leaf and occurrence of the three moult of silkworm. J. Seric. Sci. Japan 20, 346.
- SHEN X. (1991) Isolation and application for mutation line of limited trimoulter silkworm, *Bombyx mori*. Sci. Seric. 17(3), 185-186.
- SHEN Z. Y., LI R., LU X. (1990) Effect of trimoulting silkworm inducer SM-1 on the regulation mechanism of the silk fibroin synthesis of silkworm. II. effect of SM-I on the synthesis rate of DNA and nucleic acid and content in the posterior silk gland Sci Seric 16(2), 85-89.
- SHIMIZU O., AKAI H. (1992) Food efficiency for oviposition of precocious trimoulter silkworm by anti-juvenoid hormone activity Gumma J. Agric. Res. Series B. Seric 9: 77-80.
- SIDHU N. S. (1967) Sex linked trimoulters in *Bombyx mori* L Indian J. Seric 1(2), 83-84.
- SIDHU N. S., SINGHAL R. A. (1977) A study on the use of trimoulters (M-3) strain for silk production in South India. J. Hered. 9(1), 13-18.

- SINGH, R., NAGARAJU J., VIJAYARAGHAVAN K. (1989) Studies on the inheritance of trimoulters in the silkworm, *Bombyx mori*. Curr. Sci. 58(6), 324-326.
- SINGH R., NAGARAJU J., RAO P.R.M., PREMALATHA V., VIJAYARAGHAVAN K., GUPTA S. K. (1990a) Heterosis analysis in the silkworm *Bombyx mori* L. Sericologia 30(3), 293-300.
- SINGH R., RAO P. R. M., PREMALATHA V. (1990b) Studies on trimoulting breed of polyvoltine silkworm, *Bombyx mori*. Geobios new Reports 9, 61-62.
- SINGH R., NAGARAJU J., DATTA R. K. (1994) Comparative study of various characters between trimoulters segregated from F1 hybrids of trimoulter and tetramoulter strains of the silkworm, *Bombyx mori*. L. Indian J. Seric. 33(2), 155-159.
- SUDA Y., KAUSAKA T., TAKABAYASHI K., KURIBAYASHI S. (1988) Studies on the rearing techniques for trimoulter silkworm. Tech. Bull. Seric. Expt. Sta. 134, 223-242.
- TAKAMIYA K. (1975a) Studies on the temperature and photoperiod condition on the larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* L. fed on an artificial diet. V. Effect of temperature and illumination on moulting and voltinism when composition of artificial diet varied. J. Seric. Sci. Japan 44(1), 21-25.
- TAKAMIYA K. (1975b) Studies on the larval growth of the silkworm *Bombyx mori* L. reared on an artificial diet under different temperature and photoperiod condition. VI. Effect of illumination on the moulting and voltinism of different silkworm races. J. Seric. Sci. Japan 44(5), 395-399.
- TAKAYAMA H. (1990) On a simple method of precocious trimoulter silkworm *Bombyx mori* inducement and their rearing techniques. Bull. Fukushima Seric. Expt. Sta. 24, 43-50.
- TAKEYA A. (1979) Appearance of trimoulters in *Bombyx mori* due to the administration of Kojic acid during young larval stages. Zool. Mag. (Tokyo) 88(1), 1-7.
- TAN E., SUZUKI K., KURIHARA M., KUWANO E. (1988) Effect of an imidazole compound on precocious metamorphosis in the wild silkworm, *Antheraea yamamai* J. Seric. Sci. Japan 57(3), 235-236.
- TAN Z., KONG L., FAN H., GONG X., HAN Y., YAN R. (1992) Induction of 3 moult silkworm by using of SD-II and its effect on silk quality. Sci. Seric. 18 (4), 237-242.
- TAZIMA Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logos Pres. London. 121-127.
- TOYAMA K. (1912) On the varying dominance of certain white breeds of the silkworm, *Bombyx mori* L. Z. I. A. V. 7, 253-288.
- YAMAMOTO T., ENOKIJIMA M., KAMIYOU I., FUKASAWA M., MARUYAMA, M. NAKAYAMA, K. MIMURA, Y. (1986) Comparison of several quantitative characters between trimoulters and tetramoulters segregated from F1 hybrids between the dominant trimoulters and the tetramoulters strain in the silkworm. J. Seric. Sci. Japan 55(6), 467-471.
- YE X., AKAI H., KIUCHI M. (1987) Comparative studies on the *corpora allata* in normal and trimoulter larvae of *Bombyx mori* induced by the treatment with anti-juvenoid J. Seric. Sci. Japan 56(3), 226-230.
- YOSHIDA M., NAKANISHI K., SUEMITSU K. (1989) Physicochemical properties of three moult raw silk from changed by anti-JH. Res. Rep. Raw Silk Testing 42, 11-19.
- ZHUANG D., XIANG M., GUI Z., CHEN G. (1992) The effect of trimoulter by treatment with anti-juvenile hormone (AJH) analogue (YA20) and its quality of cocoon filament in silkworm, *Bombyx mori*. Sci. Seric. 18(2), 93-99.

L'INDUCTION DE TRIMUANTS ET LEUR UTILISATION DANS LA PRODUCTION DE SOIE DE QUALITE CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

RAVINDRA SINGH, M. M. AHSAN & R. K. DATTA

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore - 570008, Inde.

INTRODUCTION

Chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, le nombre de mues subit des changements importants sous l'influence des facteurs environnementaux (Morohoshi, 1957 ; Tazima, 1964). L'hérédité du caractère trimuant induit par des facteurs de l'environnement (Takamiya, 1975b ; Komori et Yoshitake, 1979a), diverses substances chimiques (Kanda et coll., 1985 ; Kiuchi et coll., 1986 ; Ye et coll., 1987) des milieux artificiels (Takamiya, 1975a ; Nishimura, 1984) et les feuilles de certaines variétés de mûrier (Sasaki, 1951 ; Anonyme, 1975) a été largement étudiée chez le ver à soie. Les trimuants sont utilisés pour la production de soie fine de qualité (Lu et coll., 1987 ; Liu and Lu, 1988 ; Lue et coll., 1992). Certaines anti-hormones juvéniles s'avèrent efficaces pour contrôler la taille, la qualité et l'uniformité du filament de soie tout comme pour augmenter la production de soie (Akai et coll., 1984 ; Kataoka et coll., 1985 ; Schnal et Akai, 1990). De plus, les inducteurs de trimuants ont été utilisés pour la production d'oeufs de vers à soie (Kubota et coll., 1986 ; 1990 ; Lu and Wu, 1996). Les techniques d'élevage des trimuants ont été étudiées par plusieurs chercheurs (Suda et coll., 1988 ; Kousaka et coll., 1988a ; 1988b ; Takamiya, 1990). On peut obtenir des trimuants à partir de souches de vers à soie tétramuantes (Mano, 1994).

On a observé que la transmission héréditaire des caractères quantitatifs des trimuants chez le ver à soie était liée qu sexe (Toyama, 1912 ; Itikawa, 1941 ; Sidhu, 1967 ; Komori 1979 ; Komori et Yoshitake, 1979a, 1979b, Singh et coll., 1989). Des essais ont été entrepris pour utiliser les trimuants dans la production de soie de haute qualité par l'hybridation (Hirobe, 1956 ; Sidhu et Singhal, 1977 ; Yamamoto et coll., 1986 ; Singh et coll., 1990a) et par le recours à des substances chimiques (Lu et coll., 1989 ; 1990 ; Zhuang et coll., 1992). Des efforts ont aussi été entrepris pour utiliser les trimuants dans la production de lignées de vers à soie (Shen, 1991 ; He et He, 1994 ; 1997 Singh et coll., 1994).

HEREDITE DU CARACTERE TRIMUANT

Des essais ont été réalisés pour étudier l'hérédité des caractères quantitatifs chez les trimuants (Nagatomo, 1926 ; 1941) et chez les hybrides entre un trimuant et un tétramuant et un trimuant et un pentamuant (Morohoshi, 1957). En 1926, Nagatomo et Shen ont indépendamment décrit une hérédité liée au sexe de certains caractères quantitatifs comme la taille et le poids de la coque soyeuse. Ce phénomène a été interprété de plusieurs manières. Nagatomo a suggéré l'hypothèse que des gènes principaux contrôlant la maturité précoce et tardive sont liés au chromosome Z tandis que Shen suggère un gène principal quantitatif lié au sexe. Plus tard, Morohoshi (1957) a identifié trois gènes de maturité l'un précoce, l'autre intermédiaire et l'autre tardif sur le chromosome Z.

C'est Toyama (1912) qui a le premier isolé les gènes de la mue chez le ver à soie et qui a observé que le caractère muant est un dominant simple par rapport au tétramuant. Ogura (1931) a trouvé que

le gène de la mue est lié au gène de la couleur du cocon, F, et en utilisant la relation de liaison génétique il a pu démontrer l'existence d'allèles multiples pour trois caractères de la mue, M^3 , $+^M$ et M^5 qui contrôlent respectivement les caractères trimuant, tétramuant et pentamuant. Maintenant, il est clair que l'hérédité du nombre de mues est non seulement contrôlée par des allèles multiples mais aussi par l'interaction de deux systèmes génétiques (les gènes de maturité liés au sexe et les gènes de mue autosomiques) qui sont sous le contrôle du système hormonal. Les caractères de nombre de mues sont constants pour chaque race ou lignée, cependant il y a des changements de caractères pour certaines souches ou certains hybrides. Cela peut être dû soit à des effets de l'environnement ou au métabolisme (Moroshoshi, 1957). En général, les trimuants isolés de temps en temps sont des mâles (Tazima, 1964).

Des études ont été faites sur la manifestation liée au sexe du caractère quantitatif chez les larves du 5ème âge du ver à soie, *Bombyx mori* (Oshiki, 1978 ; 1979). On observe seulement des femelles trimuantes chez des hybrides F1 Européen 16 × Cambodge (Itikawa, 1941). De même, Sidhu (1967) a observé des trimuants femelles entre un croisement spécifique de femelles Mysore A White et de mâles Nan Nun 6D. L'obtention seulement de femelles pour les croisements entre femelle et des mâles trimuants a été signalée (Singh et coll., 1989 ; 1990a ; 1994 ; Nagaraju et coll., 1996).

RACES TRIMUANTES ET ELEVAGE

Les races trimuantes sont élevées depuis longtemps en Chine et en Corée, par exemple, les races Si, Chuang, San, Mian et Shan, Dong, San et Mian. Au Japon, les trimuants sont utilisés depuis 1940 et un hybride Samin-Haku × C108 a été mis au point. Plus tard, en 1944, un autre hybride, C21 × Sanko a été mis au point au *Silk Science Research Institute*, autorisé par le Gouvernement Japonais et utilisé jusqu'en 1958. En 1951, un autre hybride trimuant Kyokko × Sekka a été conçu par *Gunze Company Ltd* et utilisé jusqu'en 1970. Hirobe (1952 ; 1956) a souligné l'importance du cytoplasme dans la manifestation de l'hétérosis chez le ver à soie.

Des études sur la vigueur hybride pour les hybrides de souche trimuante et tétramuante du ver à soie, *Bombyx mori*, ont été réalisées (Singh et coll., 1990a). Une étude comparative a été entreprise sur plusieurs caractères quantitatifs et qualitatifs entre des trimuants et des tétramuants ségrégués à partir d'hybrides F1 de trimuant dominant a permis d'observer une déviation inférieure du titre du filament, un taux de nymphose élevé et une netteté supérieure par rapport aux tétramuants (Yamamoto et coll., 1986). Singh et coll., (1994) ont observé un indice de consommation et un taux de croissance plus élevés chez les trimuants et une meilleure dévidabilité chez le trimuant et ses hybrides. Les trimuants peuvent être utilisés pour la mise au point de souches de vers à soie sains d'une durée larvaire plus courte tout comme pour économiser de la main d'oeuvre et pour produire une soie de haute qualité. Récemment, une souche de ver à soie trimuante dominante « SG » au caractère stable et avec de bons caractères économiques a été mise au point (He et He, 1997).

FACTEURS AYANT UNE INCIDENCE SUR L'EXPRESSION DU CARACTERE TRIMUANT

On sait que plusieurs facteurs environnementaux induisent des trimuants chez le ver à soie : une température d'incubation basse, une température et une humidité élevées pendant les premiers âges (Morohoshi, 1957) les feuilles de mûrier (Sasaki ; 1951 ; Anonyme, 1975), et la durée des périodes d'obscurité et de lumière dans une journée (Kogure, 1933). Parmi ces facteurs, le plus efficace pour induire des trimuants est la température élevée. Moroshi (1957) a obtenu 27,09 % de trimuants à partir de tétramuants suite à leur incubation à faible température tandis qu'une température élevée (38 °C) et une humidité élevée (90 %) s'avèrent plus efficaces pour les 3ème et 4ème âges. La lumière exerce plus d'effet sur les 1er et 2ème âges et l'effet de la lumière sur deux âges successifs est plus élevé que pour un âge unique quel qu'il soit (Kogure, 1933).

Une bonne nutrition pendant les premiers âges larvaires associée à une température élevée provoque l'apparition de trimuants à partir de tétramuants normaux (Morohoshi, 1957). Gu et coll.,

(1991) ont induit des trimuants grâce à une température et une humidité élevées au début du 4ème âge. Takamiya (1975a) a étudié l'effet combiné de la température et de la photopériode sur la mue chez le ver à soie. Takamiya (1975b) a induit 100 % de trimuants avec un régime alimentaire de soja dégraissé. On a observé l'apparition de trimuants pendant l'élevage de vers à soie sur milieu artificiel tout au long du stade larvaire (Nishimura et coll., 1984). Selon Murakami (1994), le taux de croissance pendant le stade larvaire est contrôlé par certains facteurs génétiques indépendants du caractère de la mue. L'effet de la saison sur la manifestation de traits quantitatifs chez une souche trimuante du ver à soie du mûrier a été étudié (Singh et coll., 1990b).

INDUCTION CHIMIQUE DE TRIMUANTS

Il a été prouvé que des substances chimiques avec une activité hormonale anti-juvénile sont utiles à la sériciculture pour la production d'un filament de cocon fin et pour améliorer la salubrité et la teneur en soie (Akai et coll., 1984 ; Kanda et coll., 1985 ; Miao et coll., 1996). Des trimuants ont été induits à partir d'hybrides tétramuants F1 par l'administration orale de 2-hydroxy-méthyl-5-hydroxy-4-pyridone (Murakoshi et Ichimoto ; 1972) et d'acide Kojic (Takeya, 1979 ; Murakoshi, 1972). Les trimuants précoces sont induits chez le ver à soie à la suite d'un traitement au SSP-II, un dérivé d'imidazole (Kiuchi et coll., 1986 ; Takayama ; 1990). Les changements endocrines chez les vers à soie trimuants induits avec un composé d'imidazole ont été étudiés (Gu et coll., 1988).

Les anti-hormones juvéniles sont largement utilisées pour induire des trimuants chez le ver à soie, *Bombyx mori*. Kubota et coll., (1988) ont étudié l'effet des anti-JH sur l'efficacité alimentaire et sur le titre du filament chez les trimuants précoces. L'augmentation de la production de soie tout comme l'induction de trimuants par traitement anti-JH ont été étudiées (Kubota et coll., 1986). Kozakai et Mizusawa (1988) ont comparé la croissance des larves de vers à soie entre les races trimuantes et les trimuants induits par un anti-juvénoïde. Une étude comparative des *corpora allata* chez des trimuants normaux et des trimuants induits par des anti-juvénoïdes a été réalisée (Ye et coll., 1987).

Ichida (1988) a étudié la sensibilité de larves trimuantes induites avec un anti-juvénoïde à l'infestation par *Bauvaria bassiana*. Il a été observé que la qualité de la soie grège de trimuants induits par un anti-JH change: forte résistance, faible pourcentage de sérécine, élasticité élevée, filament de soie fin (Yoshida et coll., 1989). Shimizu et Akai (1992) ont étudié l'oviposition et l'efficacité alimentaire de trimuants induits par anti-JH. Zhuang et coll., (1992) ont observé une amélioration de la qualité du filament suite au traitement avec YA 20, un anti-JH, et observé une meilleure dévidabilité, une faible déviation de titre, une forte elongation et cohésion de la soie grège donnant un grade 4A-6A de soie de haute qualité. L'effet de l'imidazole phényl-5-cytrométhyl-1 (KK-42), un anti-JH, sur l'induction d'une nymphose précoce et sur l'augmentation du poids a été signalé (Asano et coll., 1984, 1987). Kiuchi et coll., (1985) ont induit 100 % de trimuants à partir de tétramuants suite à l'administration d'un anti-JH pendant les 48 premières heures du 1er, du 2ème, du 3ème ou du 4ème âge larvaire. Les cocons produits par les trimuants induits par Kiuchi et coll., (1985) avaient un filament de titre compris entre 3,0 et 0,8 deniers (Kataoka et coll., 1985). Tan et coll., (1988) ont observé une métamorphose précoce chez le ver à soie sauvage, *Antheraea yamamai*, à la suite d'un traitement avec un composé d'imidazole. L'apparition de trimuants à la suite d'un traitement à l'acide abiétique et de ses dérivés sur des larves F1 de tétramuants juste après la 3ème mue, a été observée (Murakoshi et coll., 1975). Oshiki et Tamura (1985) ont induit des trimuants précoces à la suite d'un traitement avec « Manta », une substance juvénoïde, chez les larves de vers à soie *Bombyx mori* du 1er au 3ème âge. Tan et coll., (1992) ont trouvé jusqu'à 95% de trimuants suite à un traitement au SD-II. En Chine, des produits chimiques ont été mis au point pour une induction complète de trimuants à partir de tétramuants. Lu et coll., (1992) ont induit 100 % de trimuants suite à un traitement au SM1, un composé d'imidazole, chez les larves pendant le 3ème et le 4ème âges. On observe une survie élevée, une plus grande dévidabilité, un faible coût de production des oeufs, une durée larvaire de 3 à 4 jours plus courte, une déviation inférieure du titre du filament et une soie de meilleure qualité et

d'une bonne netteté suite au traitement au SM1 (Liu et coll., 1987 ; Lu et Li, 1987 ; Liu et Lu, 1988, Lu et coll., 1989). Dai et coll., (1987) ont observé une amélioration de la croissance de la glande soyeuse suite au traitement au SM1. On a rapporté un taux d'incorporation de thymidine-3H accéléré dans l'ADN de la glande séricigène postérieure suite au traitement au SM1 (Shen et coll., 1990) et les pics des teneurs en ADN et en ARN des trimuants surviennent 4 à 6 jour plus tôt que chez le témoin. L'induction de trimuants et la relation entre la quantité de mûrier donnée en alimentation et le poids du cocon, la qualité du filament, les habitudes alimentaires des souches de vers à soie ont été étudiées (Lu et coll., 1990 ; Lu et coll., 1992). Récemment, Lu et Wu (1996) ont induit des trimuants, augmenté la salubrité, la quantité d'oeufs produits par kg de cocons grâce au traitement au Golden Dear (GD) et suggéré une nouvelle technologie de production d'oeufs trimuants.

CONCLUSION

Le développement de souches de vers à soie ayant une fécondité élevée, une viabilité des larves plus élevée, une moindre incidence des maladies, une durée larvaire plus courte, une moindre consommation de feuilles de mûrier, une soie fine avec une moindre déviation du titre, un filament plus long, une plus forte netteté et régularité, une résistance et une dévidabilité supérieures serait bénéfique pour l'industrie de la soie. Des essais ont été faits pour induire des trimuants à partir de vers à soie tétramuants grâce aux facteurs agro-climatiques, aux produits chimiques tels que SM1 et Golden Dear qui sont solubles dans l'eau et n'ont pas d'effet adverse sur les vers à soie tandis que des produits comme KK-42 et SSP-11 sont solubles dans les graisses et ont peut-être un effet adverse sur les vers à soie. Certaines anti-hormones juvéniles sont utiles pour le contrôle de la qualité et de l'uniformité du filament de soie et pour augmenter la production de soie. Il est facile d'induire des trimuants à partir de souches de vers à soie tétramuants chinois. Les trimuants induits ont été produits à l'échelle commerciale et utilisés pour la production de tissus de soie extrêmement fine tout comme pour isoler des souches de vers à soie trimuantes avec un caractère de liaison au sexe. Dans l'étude actuelle, on s'est efforcé de regrouper la bibliographie sur les trimuants et de la diffuser auprès des chercheurs en sériciculture.

DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF THE GENE CODING FOR THE ECDYSONE RECEPTOR BmEcR IN *BOMBYX MORI* POSTERIOR SILK GLAND

M COULON-BUBLEX*, J-C. PRUDHOMME

*A DNA fragment containing a sequence encoding the ecdysone receptor of **Bombyx mori** (BmEcR) was isolated by screening a genomic library with the cDNA of the **Drosophila melanogaster** ecdysone receptor. This cloned fragment was used as a probe to study the accumulation of the corresponding mRNA in the posterior silk gland of **Bombyx mori** during development. The BmEcR transcript was found abundant at the onset of the fourth moult. It also exhibited three fluctuations of concentration during the second half of the fifth instar that can be correlated to the onset of spinning, the cessation of silk gland growth and the onset of silk gland apoptosis respectively.*

Keywords: *Bombyx mori*, ecdysone receptor, silk gland.

INTRODUCTION

Insect moults and metamorphosis are controlled by steroid hormones, primarily 20-hydroxyecdysone (20E). The effect of the hormone necessitates the binding of the hormone to a specific receptor leading to a heterodimer which interacts with specific DNA sequences (Ecdysone Response Element, ERE) of the target genes (Riddihough *et al.*, 1987). The gene encoding the 20E receptor (EcR) was cloned in the dipterans *Drosophila melanogaster* (Koelle *et al.*, 1991), *Chironomus tentans* (Imhof *et al.*, 1983) and *Aedes aegypti* (Cho *et al.*, 1995), and in the lepidopterans *Manduca sexta* (Fujiwara *et al.*, 1995) and *Bombyx mori* (Swevers *et al.*, 1995, Kamimura *et al.*, 1996).

In *Drosophila melanogaster* EcR binds to the ERE as a hetero dimer with USP (Yao *et al.*, 1992, Yao *et al.*, 1993, Antoniewski *et al.*, 1994, Swevers *et al.*, 1996). USP is detected in the early embryo and remains present in all tissues during the post-embryonic development (Oro *et al.*, 1992). On the contrary, the transcription of EcR mRNA and the accumulation of the different receptor isoforms vary along the development depending on the differentiation states of tissues (Talbot *et al.*, 1993, Huet *et al.*, 1993, 1995). It is thus highly probable that the regulation of the activity of the EcR-USP complex mainly depends on the EcR partner. The *Bombyx mori* gene homologous to *usp* (*BmUSP=BmCf1*) was cloned and was also found equally expressed during development, in particular in ovaries (Tzertzinis *et al.*, 1994). A functional heterodimer BmEcR/BmCf1 was observed (Swevers *et al.*, 1996).

In *Drosophila melanogaster*, it was demonstrated that 20E induces the expression of genes (Natzle *et al.*, 1986, Hurban *et al.*, 1993) and that EcR directly contributes to the regulation of genes expressed in different organs (Antoniewski *et al.*, 1994, Lehman *et al.*, 1995). In the salivary gland, EcR is present on the third larval instar (Talbot *et al.*, 1993, Huet *et al.*, 1993, 1995) and it has been recently demonstrated that it binds to the promoter region of the gene encoding the specific protein Sgs-4 (Lehman *et al.*, 1995).

* Author for correspondence: Centre de génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534, CNRS-Université Lyon 1, Bat. 741.43 Bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex. France

In the silk gland of *Bombyx mori*, the organ homologous to the salivary gland, the activity of the genes encoding silk proteins and cytoplasmic actins is regulated according to the moulting cycle, these genes being expressed during each larval intermoult and repressed during each moult (Couble *et al.*, 1983, Couble *et al.*, 1987, Mounier *et al.*, 1991). We hypothesized that the 20E and the EcR participate to the cascade of regulation of these genes, but no direct proof has been yet produced. In cultured anterior silk gland it was shown that transcription of the EcR gene was induced by addition of 20E (Kamimura *et al.*, 1997) suggesting that a low concentration of hormone regulates its own receptor.

In this paper, we report our results on the kinetics of accumulation of the transcripts of BmEcR in the posterior silk gland along the fourth larval moult and the last larval instar. For this purpose, we isolated a coding sequence of the *BmEcR* gene and quantified the corresponding mRNA by molecular hybridization.

MATERIALS AND METHODS

1. Experimental animals:

Silkworms were hybrids of the European strains 200 and 300. They were reared at the Unité Nationale Séricicole (La Mulatière, France) at 22°C. Developmental stages along the fourth moult were dated according to the steps of spiracle apolysis (Kiguchi *et al.*, 1981). The secretion of the first silk thread of the cocoon defines the beginning of the prepupal stage.

2. Screening of the gene library:

The 600bp EcoRI-KpnI fragment of the *Drosophila* EcR cDNA (Koelle *et al.*, 1991) (region C-D) was used as a probe to screen a *Bombyx* gene library (Eickbush *et al.*, 1982). By in situ plaque hybridization (Sambrook *et al.*, 1989), we isolated two clones from 2.10^5 phages (four haploid genome equivalents). A sub-fragment HindII-HindIII of the clones, which hybridized to the same probe, was then cloned in the vector Bluescript (Stratagene) and sequenced by the dideoxynucleotide method (Sanger *et al.*, 1977).

3. RNA extraction and hybridization:

RNA was extracted from the posterior silk gland of six silkworms at the fourth larval instar and at the fourth moult and from a single insect at the fifth larval instar and the prepupal stage.

Total RNA was extracted by the lithium chlorid-urea method (Clemens 1984). 15 to 20 micrograms of RNA were separated by electrophoresis on a formaldehyde-agarose (1 %) gel and transferred to a nitrocellulose C extra membrane (Amersham). The blots were hybridized to the 750 bp HindII-HindIII fragment at 42°C, 50 % formamide in 5 SCC, and washed in 1×SSC at 65°C. Then, the same set of membranes was used again, in the same conditions, to hybridize the 600 bp PstI-SacI fragment of the *Bombyx mori* actin A₃ gene (Mounier *et al.*, 1986). Quantitative analysis was done by densitometric scanning using Bioprofil. For each Northern blot the quantity of ribosomal RNA was measured by densitometry of ethidium bromide detection and after hybridization each blot was scanned again. The quantity of each mRNA (EcR or A₃) detected was normalized in comparison with rRNA, and was exprimed in percent of its observed maximum.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Isolation of the *Bombyx* ecdysone receptor probe:

Screening of the *Bombyx mori* genomic library with a *Drosophila* ecdysone receptor cDNA probe (DmEcR, Koelle *et al.*, 1991), led us to isolate a genomic clone containing a 291 bp long open reading frame, 100 % identical to the exon 3 of the previously described *Bombyx mori* EcR (Swevers *et al.*, 1995), and flanked by typical intron-exon borders. The amino acid sequence between positions 1 to 50 was also found identical to that of the EcR of *Manduca sexta* (Fugiwara *et al.*, 1995). Comparing

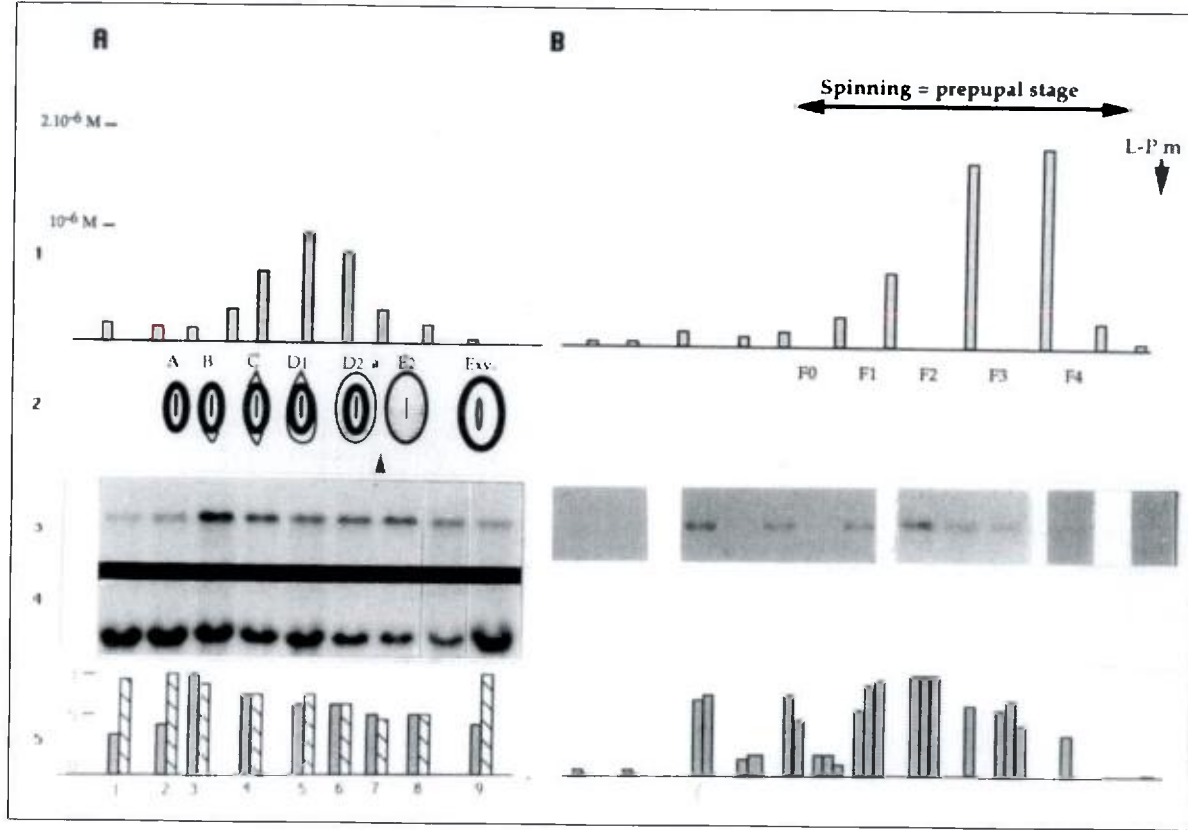


Figure 1. Developmental accumulation of the EcR mRNA in the PSG during the fourth moult (A) and during the fifth larval instar and the prepupal stage (B).

20 μ g of each total RNA were loaded. 1: 20E haémolympatique concentration (Calvez et al.). 2: morphological stages of spiracle apolysis. 3: Hybridization of Northern blots to the BmEcR probe. 4: Hybridization of the same Northern blots to the actin A3 probe. 5: Densitometric determination of RNA accumulation, the data are expressed in % of the maximum of RNA observed on each blot, with reference to the amount of rRNA measured by densitometry. In panel B, the data are obtained from independent extracts; the actin A3 mRNA is not detectable in the PSG at the end of fifth instar (Mounier et al., 1991). $\square$ EcR $\square$ A3. L-Pm: larvo pupal moult, F0-F1-F2-F3-F4 days of spinning

Figure 1. L'accumulation de l'ARNm de EcR mRNA dans le PSG pendant la quatrième mue (A), et pendant le cinquième stade larvaire et le stade pré-pupal (B).

20 μ g de chaque ARN total sont chargés. 1: Concentration hémolympatique de 20E (Calvez et coll.). 2: Stades morphologiques de l'apolyse du spiracle. 3: Hybridation Northern avec la sonde BmEcR. 4: Hybridation des mêmes Northern avec la sonde actine A3. 5: Détermination densitométrique de l'accumulation d'ARN, les données sont exprimées en pourcentage du maximum d'ARN observé sur chaque tache, en référence à la quantité d'ARNr mesurée par densitométrie. Dans le schéma B, les données sont obtenues à partir d'extraits indépendants; l'ARNm d'actine A3 n'est pas détectable dans la PSG à la fin du cinquième âge (Mounier et coll., 1991). $\square$ EcR $\square$ A3. L-Pm: mue larvo-nymphe, F0-F1-F2-F3-F4 jours de filage.

our sequence with that of Diptera EcR unambiguously showed that we had cloned the region encoding a part of the DNA binding domain and the N terminal part of the D domain of the ecdysone receptor.

These results, in complete agreement with the previous observations (Swevers *et al.*, 1995) supported that our clone corresponded to BmEcR sequences and that it contained sequences present in all isoforms. It can thus be confidently used to follow the EcR gene expression during silkworm development.

2. Temporal profil of *Bombyx* EcR mRNA in the posterior silk gland (PSG):

The accumulation of the BmEcR transcript was measured in the PSG from the fourth larval instar up to the larvo-pupal moult. At all stages, total or poly A⁺ RNA extracted from silk gland and hybridized to the BmEcR probe, revealed a single band corresponding to an RNA about 6500 nt long, known to encode both A and B1 isoforms of EcR (Kamimura *et al.*, 1997).

During the fourth larval moult, the maximal level of the BmEcR mRNA was observed at the spiracle stage B (Fig. 1A lane 3) when the concentration of the haemolymph 20E is still low (Calvez *et al.*, 1976; Coulon 1977). The content in mRNA started to decrease at the time the hormone level peaks at the stage D₁ and became very low at ecdysis (Fig. 1A lane 9). A similar timing of total EcR concentration was also observed in the anterior silk gland (Kirimura *et al.*, 1997). Taking into account the delay for the protein accumulation, it may well be that the EcR peaks one day later (stage D₁) at the maximal hormone concentration. Hybridization of the same RNA blot to the cytoplasmic actin gene probe showed a high level of the corresponding mRNA during the fourth larval instar up to apolysis (Fig. 1A, lanes 1-2-3), a minimum at the D_{2a} head slippage stage (lanes 7-8) and a further increase at ecdysis (lane 9) in accordance with previous observations (Mounier *et al.*, 1991). In the silk gland, the amount of silk proteins encoding mRNA drops abruptly at the spiracle stage D_{2a} head slippage as a consequence of both gene repression and mRNA destabilization (Couble *et al.*, 1983). Correlatively, the transcription factor BMFA, which binds the promoter region of the silk protein P25, is temporarily modified at the stage D_{2a} (Durand *et al.*, 1992), which suggests that the 20E and EcR could be involved in the repression of silk encoding genes via some transcription factors such as BMFA.

The BmEcR mRNA was no more detectable at the beginning of the fifth instar, when the silk encoding genes are activated. During the 5th instar, BmEcR mRNA reappeared in the posterior silk gland during the hours before cocoon spinning at day 6.5 (Fig. 1B), when the haemolymph 20E titer increases but remains very low (Calvez *et al.*, 1976). This rise, which corresponds to that observed at the onset of pupation in *Drosophila melanogaster* (Talbot *et al.*, 1993; Huet *et al.*, 1993 and 1995), can induce the activation of the EcR gene itself preparing the cells to respond to the main hormonal peak. During the prepupal stage, we found two successive peaks of the BmEcR transcript (Fig. 1B, lanes F₀ and F₂). The first prepupal peak (stage F₀) would induce the moulting processes as during fourth moult (stage B) and could result in stopping the transcription of the silk genes. The second increase (stages F₁-F₂), the quantitatively most important, would be responsible for the silk gland degeneration. This hypothesis is in good agreement with observations in *Drosophila melanogaster* (Huet *et al.*, 1995; Robinow *et al.*, 1993; Truman *et al.*, 1994) and suggests that the hormonal signal could induce the destruction of the silk gland by inducing apoptosis genes. At the larval-pupal moult BmEcR mRNA was no more detectable whereas total RNA has not completely disappeared. Similar fluctuations of EcR mRNA during the fifth instar are also visible among the data of Kamimura *et al.* (1997) on the anterior silk gland suggesting that all the silk gland parts are regulated by the hormone in the same way.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Michael Koelle for a gift of the *Drosophila* EcR cDNA. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (France).

REFERENCES

- ANTONIEWSKI C., LAVAL M., DAHAN A., LEPESANT J. A. (1994) The ecdysone response enhancer of the Fbp1 gene of *Drosophila melanogaster* is a direct target for EcR/USP nuclear receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14 4465-74.
- CAVEZ B., HIRN M., DE REGGI M. (1976) Ecdysone changes in haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Phylosamia cyathia*) during larval and pupal development. *FEBS Lett.* 71: 57-61.
- CHO W.-L., KAPITSKAYA M. Z., RAIKHEL A. S. (1995) Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 19-27.
- CLEMENS M. J. (1984) Purification of Eucaryotic mRNA. In HAMES B. D., HIGHINS S. J. ed., *Transcription and translation, a practical approach*. IRL Press Oxford. 211-229.
- COUBLE P., MOINE A., GAREL A., PRUDHOMME J. C. (1983) Developmental variations of a non-fibroin mRNA of *Bombyx mori* silk gland encoding for a low-molecular-weight silk protein. *Dev. Biol.* 97: 398-407.
- COUBLE P., MICHAILLE J. J., GAREL A., COUBLE M. L., PRUDHOMME J. C. (1987) Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silk gland. *Dev. Biol.* 124: 431-440.
- COULON M. (1977) Relations between the feeding and radio-sensitivity cycles and the ecdysone cycle in *Bombyx mori*, at the end of embryonic development and during the first four larval instars. *Develop. Growth and Differ.* 19: 181-5.
- DURAND B., DREVET J., COUBLE P. (1992) P25 gene regulation in *Bombyx mori* silk gland: two promoter-binding factors have distinct tissue and developmental specificities. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5768-77.
- EICKBUSH T. E., KAFATOS F. C. (1982) A walk in the chorion locus of *Bombyx mori*. *Cell* 29: 633-643.
- FUJIWARA H., JINDRA M., NEWITT R., PALLI S. R., HIRUMA K., RIDDIFORD L. M. (1995) Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 845-56.
- HUET F., RUIZ C., RICHARDS G. (1993) Puffs and PCR: The in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development* 118: 613-27.
- HUET F., RUIZ C., RICHARDS G. (1995) Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early late genes. *Development* 121: 1195-1204.
- HURBAN P., THUMMEL C. (1993) Isolation and characterization of fifteen ecdysone-inducible *Drosophila* genes reveal unexpected complexities in ecdysone regulation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7101-7111.
- IMHOF M. O., RUSCONI S., LEZZI M. (1993) Cloning of a Chironomus tentans cDNA encoding a protein (cEcRH) homologous to the *Drosophila melanogaster* ecdysteroid receptor (dEcR). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23: 115-24.
- KAMIMURA M., TOMITA S., FUJIWARA H. (1996) Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 341-347.
- KAMIMURA M., TOMITA S., KIUCHI M., FUJIWARA H. (1997) Tissue-specific and stage specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms. ecdysteroid-dependent transcription in culture anterior silk glands. *Eur. J. Biochem.* 248 786-93.
- KOELLE M. R., TALBOT W. S., SEGRAVES W. A., BENDER M. T., CHERBAS P., HOGNESS D. S. (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell.* 67: 59-77.
- LEHMAN M., KERGE G. (1995) Ecdysone regulation of the *Drosophila* Sgs-4 gene is mediated by the synergistic action of ecdysone receptor and SEBP3. *EMBO J.* 14: 716-26.
- MOUNIER N., PRUDHOMME J. C. (1986) Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. *Biochimie* 68: 1053-61.

- MOUNIER N., COULON M., PRUDHOMME J. C. (1991) Expression of a cytoplasmic actin gene in relation to the silk production cycle in the silk glands of *Bombyx mori*. Insect Biochem. 21: 293-301.
- NATZLE J. E., HAMMONDS A. S., FRISTROM J. W. (1986) Isolation of genes active during hormone-induced morphogenesis in *Drosophila* imaginal discs. J. Biol. Chem. 261: 5575-5583.
- ORO A. E., Mc KEOWN M., EVANS R. M. (1992) The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. Development 115: 449-462.
- RIDDIHOUGH G., PELHAM H. R. B. (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila* hsp27 promoter. EMBO J. 6: 3729-34.
- ROBINOW S., TALBOT W. S., HOGNESS D. S., TRUMAN J. W. (1993) Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific receptor isoform. Development 119: 1251-9.
- SAMBROOK J., FRITSCH E., MANIATIS T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
- SWEVERS L., DREVET J. R., LUNKE M. D., IATROU K. (1995) The silkmoth homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. Insect Biochem. Molec. Biol. 25: 857-66.
- SWEVERS L., CHERBAS L., CHERBAS P., IATROU K. (1996) *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. Insect Biochem. Molec. Biol. 26: 217-221.
- TALBOT W. S., SWYRYD E. A., HOGNESS D. (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. Cell. 73: 1323-37.
- TRUMAN J. W., TALBOT W. S., FAHRBACH S. E., HOGNESS D. S. (1994) Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. Development 120: 219-34.
- TZERTZINIS G., MALECKI A., KAFATOS F. C. (1994) BmCF1, a *Bombyx mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila* ultraspiracle. J. Mol. Biol. 238: 479-486.
- YAO T.-P., SEGRAVES W. A., ORO A. E., McKEOWN M., EVANS R. M. (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heteromer formation. Cell. 71: 63-72.
- YAO T.-P., FORMAN B. M., JIANG Z., CHERBAS L., CHEN J.-D., McKEOWN M., CHERBAS P., EVANS R. M. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. Nature 366: 476-79.

EXPRESSION DU GENE CODANT LE RECEPTEUR D'ECDYSONE BmEcR DANS LA PARTIE POSTERIEURE DE LA GLANDE SERICIGENE CHEZ *BOMBYX MORI* AU COURS DU DEVELOPPEMENT

M. COULON-BUBLEX*, J. - C. PRUDHOMME

Un fragment d'ADN contenant une séquence codant le récepteur d'ecdysone de *Bombyx mori* (BmEcR) a été isolé à partir d'une bibliothèque génomique avec l'ADNc du récepteur d'ecdysone de *Drosophila melanogaster*. Ce fragment cloné a été utilisé comme sonde pour étudier l'accumulation de l'ARNm correspondant dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* pendant le développement. Le transcrit de BmEcR est abondant à l'abord de la quatrième mue. Il présente aussi trois fluctuations de concentration durant la deuxième moitié du cinquième âge qui peuvent être corrélées respectivement avec le début du filage, l'arrêt de la croissance de la glande séricigène et le début de l'apoptose de la glande séricigène.

INTRODUCTION

Les mues et les métamorphoses d'insectes sont contrôlées par les hormones stéroïdes, principalement la 20-hydroxyecdysone (20E). L'effet de l'hormone nécessite la fixation de l'hormone à un récepteur spécifique formant un hétérodimère qui interagit avec des séquences d'ADN spécifiques (Elément de Réponse à l'Ecdysone, ERE) de gènes cibles (Riddihough et coll., 1978). Le gène codant pour le récepteur de 20E (EcR) a été cloné chez les diptères *Drosophila melanogaster* (Koelle et coll., 1991), *Chironomus tentans* (Imhof et coll., 1993) et *Aedes aegypti* (Cho et coll., 1995), et chez les lépidoptères *Manduca sexta* (Fujiwara et coll., 1995) et *Bombyx mori* (Swevers et coll., 1995, Kamimura et coll., 1996).

Chez *Drosophila melanogaster*, l'EcR se fixe à l'ERE sous forme d'un hétérodimère avec USP (Yao et coll., 1992, Yao et coll. 1993, Antoniewski et coll., 1994, Swevers et coll., 1996). L'USP est détecté chez le jeune embryon et reste présent dans tous les tissus pendant le développement post-embryonnaire (Oro et coll., 1992). Au contraire, la transcription de l'ARNm de EcR et l'accumulation de diverses isoformes du récepteur varient au cours du développement en fonction de l'état de différenciation des tissus (Talbot et coll., 1993, Huet et coll., 1993, 1995). Il est donc très probable que la régulation de l'activité du complexe EcR-USP dépend essentiellement de l'EcR. Le gène de *Bombyx mori* homologue à *usp* (BmUSP=BmCF1) a été cloné et il a été montré qu'il s'exprime également pendant le développement, en particulier dans les ovaires (Tzertzinis et coll., 1994). Un hétérodimère fonctionnel BmEcR/BmCF1 a été observé (Swevers et coll., 1996).

Chez *Drosophila melanogaster*, il a été démontré que la 20E induit l'expression de gènes (Natzle et coll., 1986, Hurban et coll., 1993) et que EcR contribue directement à la régulation des gènes exprimés dans différents organes (Antoniewski et coll., 1994, Lehman et coll., 1995). Dans la glande salivaire, EcR est présent au troisième stade larvaire (Talbot et coll., 1993, Huet et coll., 1993, 1995) et il a été récemment démontré qu'il se fixe dans la région du promoteur du gène codant la protéine spécifique Sgs-4 (Lehman et coll., 1995).

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance : Centre de génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534, CNRS-Université Lyon I, Bat. 741. 43 Bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex. France.

Dans la glande séricigène de *Bombyx mori*, organe homologue de la glande salivaire, l'activité des gènes codant les protéines de la soie et les actines cytoplasmiques est régulée selon le cycle de mue, ces gènes étant exprimés pendant chaque intermue larvaire et réprimés pendant chaque mue (Couble et coll., 1983, Couble et coll., 1987, Mounier et coll., 1991). Nous émettons l'hypothèse que la 20E et EcR participent à la cascade de régulation de ces gènes, mais aucune preuve directe n'a encore été fournie. Dans la glande séricigène antérieure en culture, il a été montré que la transcription du gène EcR est induite par l'ajout de 20E (Kamimura et coll., 1997) suggérant qu'une faible concentration d'hormones régule son propre récepteur.

Dans cet article, nous présentons nos résultats sur la cinétique de l'accumulation des transcrits de BmEcR dans la glande séricigène postérieure pendant la quatrième mue larvaire et le dernier stade larvaire. A cet effet, nous avons isolé une séquence codante du gène *BmEcR* et nous avons quantifié l'ARNm correspondant par hybridation moléculaire.

MATERIELS ET METHODES

1. Les animaux expérimentaux :

Les vers à soie sont des hybrides des lignées européennes 200 et 300. Ils ont été élevés à l'Unité Nationale Séricicole de l'INRA (La Mulatière, France) à 22°C. Les stades développementaux pendant la quatrième mue ont été datés par les étapes de l'apolyse des stigmates (Kiguchi et coll., 1981). La sécrétion du premier fil de soie du cocon définit le début du stade prépupal.

2. Criblage de la bibliothèque de gènes :

Le fragment de 600pb EcoRI-KpnI de l'ADNc de l'EcR de *Drosophila* (Koelle et coll., 1991) (region C-D) a été utilisé comme sonde pour cribler la bibliothèque de gènes de *Bombyx* (Eickbush et coll., 1982). Par hybridation de plagues in situ (Sambrook et coll., 1989), nous avons isolé deux clones à partir de 2.10^5 phages (équivalents à quatre génomes haploïdes). Un sous-fragment HindII-HindIII des clones, qui s'hybride à la même sonde, a ensuite été cloné dans le vecteur Bluescript (Stratagene) puis séquencé par la méthode aux didésoxynucleotides (Sanger et coll., 1977).

3. Extraction et hybridation de l'ARN :

L'ARN a été extrait à partir de la glande séricigène postérieure de six vers à soie au quatrième stade larvaire et à la quatrième mue, et à partir d'un seul insecte au cinquième stade larvaire et au stade prépupal.

La totalité de l'ARN a été extraite par la méthode au chlorure de lithium-urée (Clemens 1984). 15 à 20 microgrammes de l'ARN ont été séparés par électrophorèse sur un gel de formaldéhyde-agarose (1 %) et transférés sur une membrane de nitrocellulose C (Amersham). Les buvardages ont été hybridés avec un fragment de 750 pb HindII-HindIII à 42°C, 50 % de formamide dans 5 SCC, et lavés dans $1 \times \text{SSC}$ à 65°C. Ensuite, les mêmes membranes sont utilisées une nouvelle fois, dans les mêmes conditions, pour hybrider le fragment de 600 pb PstI-SacI du gène A3 de l'actine de *Bombyx mori* (Mounier et coll., 1986). L'analyse quantitative a été faite par un balayage densitométrique utilisant Bioprofil. Pour chaque tache du Northern, la quantité d'ARN ribosomique mesurée par densitométrie de détection au bromure d'éthidium et après l'hybridation chaque tache a été scannée à nouveau. La quantité de chaque ARNm (EcR ou A3) détecté a été normalisée par rapport à l'ARNr, et a été exprimée en pourcentage du maximum observé.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement de la sonde du récepteur d'ecdysone de *Bombyx* :

Le criblage de la bibliothèque génomique de *Bombyx mori* avec une sonde d'ADNc du récepteur à l'ecdysone de *Drosophila* (DmEcR, Koelle et coll., 1991), nous a permis d'isoler un clone génomique contenant un cadre de lecture ouverte de 291 pb de long, identique à 100 % à l'exon 3 de l'EcR de *Bombyx mori* précédemment décrit (Swevers et coll., 1995), flanqué par des limites intro-exons typiques. La séquence d'acides aminés entre les positions 1 et 50 est identique à celle du EcR de *Manduca sexta* (Fujisawa et coll., 1995). La comparaison de notre séquence avec celle de l'EcR du diptère a clairement montré que nous avons cloné la région codant une partie du domaine de liaison de l'ADN et la partie N terminal du domaine D du récepteur d'ecdysone.

Ces résultats, en accord parfait avec les observations précédentes (Swevers et coll., 1995) confirment que notre clone correspond aux séquences BmEcR et qu'il contient des séquences présentes dans toutes les isoformes. Il peut ainsi être utilisé avec confiance pour suivre l'expression du gène EcR pendant le développement du ver à soie.

2. Variations temporelles de l'accumulation de l'ARNm d'EcR de *Bombyx* dans la glande séricigène postérieure (PSG) :

L'accumulation du transcrit de BmEcR a été mesurée dans le PSG du quatrième stade larvaire à la mue larvo-pupale. A tous les stades, l'ARN total ou l'ARN poly A⁺ extrait de la glande séricigène et hybridé à la sonde de BmEcR, a révélé une bande unique correspondant à un ARN d'environ 6500 nt de long, connu pour coder les isoformes A et B1 d'EcR (Kamimura et coll., 1997).

Pendant la quatrième mue larvaire, le niveau maximal de l'ARNm de BmEcR a été observé au stade stigmatique B (Fig. 1A, ligne 3) lorsque la concentration de 20E dans l'hémolymphe est encore faible (Calvez et coll., 1976 ; Coulon 1977). Le contenu en ARNm commence à décroître au moment où l'hormone atteint un pic au stade D₁ et devient très faible à l'ecdysis (Fig. 1A, ligne 9). Une chronologie similaire de la concentration totale en EcR a aussi été observée dans la glande séricigène antérieure (Kirimura et coll., 1997). En prenant en compte le délai correspondant à l'accumulation de la protéine, il est probable que le récepteur EcR atteint son pic un jour plus tard (stade D₁) lorsque la concentration de l'hormone est maximale. L'hybridation du même ARN à la sonde du gène de l'actine cytoplasmique montre un niveau élevé de l'ARNm correspondant pendant le quatrième stade larvaire jusqu'à l'apolyse (Fig. 1A, lignes 1-2-3), un minimum au stade d'apolyse céphalique D_{2a} (lignes 7-8) et un nouvel accroissement à l'ecdysis (ligne 9) en accord avec les observations précédentes (Mounier et coll., 1991). Dans la glande séricigène, la quantité d'ARNm codant pour les protéines de la soie diminue de façon abrupte au stade d'apolyse céphalique D_{2a} du fait de la répression du gène et de la déstabilisation de l'ARNm (Couble et coll., 1983). Corrélativement, le facteur de transcription BMFA, qui lie la région promotrice de la protéine de la soie P25, est modifié de façon temporelle au stade D_{2a} (Durand et coll., 1992), ce qui suggère que la 20E et l'EcR pourraient être impliqués dans la répression des gènes codant pour la soie via certains facteurs de transcription tel que le BMFA.

L'ARNm de BmEcR n'est plus détectable au début du cinquième stade, quand les gènes codant pour la soie sont activés. Pendant le cinquième âge, l'ARNm de BmEcR réapparaît dans la glande séricigène postérieure pendant les heures précédant le filage du cocon au jour 6.5 (Fig. 1B), quand le titre en 20E de l'hémolymphe augmente mais reste très bas (Calvez et coll., 1976). Cet accroissement, qui correspond à celui observé au commencement de la pupaison chez *Drosophila melanogaster* (Talbot et coll., 1993 ; Huet et coll., 1993 et 1995), peut entraîner l'activation du gène EcR lui-même préparant les cellules à réagir au pic hormonal principal. Pendant le stade pré-pupal, nous avons trouvé deux pics successifs du transcrit de BmEcR (Fig. 1B, lignes F₀ et F₂). Le premier pic pré-pupal (stade F₀) induirait les processus de mue comme pendant la quatrième mue (stade B) et pourrait conduire à l'arrêt de la transcription des gènes de la soie. La deuxième augmentation (stades F₁-F₂), quantitativement la plus importante, serait responsable de la dégénérescence de la glande séricigène. Cette hypothèse est en accord avec les observations faites chez *Drosophila melanogaster* (Huet et

coll., 1995 ; Robinow et coll., 1993 ; Truman et coll., 1994) et suggère que le signal hormonal pourrait entraîner la dégénérescence de la glande séricigène en induisant des gènes de l'apoptose. Lors de la mue larvo-nymphale, l'ARNm de BmEcR n'est plus détectable bien que l'ARN total n'a pas complètement disparu. Pendant le cinquième âge dans la glande séricigène antérieure des fluctuations similaires de l'ARNm de l'EcR sont aussi visibles dans les données de Kamimura et coll. (1997) suggérant que tous les territoires de la glande séricigène sont régulés par l'hormone de mue de la même façon.

THE LOCI OF GENES LOCATED ON SEX-CHROMOSOME OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) RESPONSIBLE FOR THE COCOON WEIGHT AND COCOON SHELL WEIGHT AND THEIR EFFECT ANALYSIS

K. -R. HE*, J.-H. HUANG & X.-R. ZHU

Sericultural Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

Silkworm variety Schod with marker genes sch and od on the first linkage group (Z chromosome) was crossed with Qincui with a high cocoon weight. On the basis of the segregation generations (BC_1 and F_2) populations from the crossing two varieties mentioned above, the loci of quantitative characters were located according to Mather and Jinks (1982). The results demonstrated that there are two genes affecting the cocoon weight and cocoon shell weight on the first linkage group, which lay at 28.8 and 30.4 map distances respectively. There was partial dominance and no obvious epistatic effect at the two loci.

Keywords: Cocoon weight, cocoon shell weight, gene locus, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

Cocoon weight and cocoon shell weight are two important economic characters of silkworm. For half a century, scholars of each country have made a thorough investigation and study on these characters and obtained a lot of useful results. Shen (1928), Suzuki *et al.* (1960) and Shun *et al.* (1965) pointed out that there are at least 4 genes affecting the cocoon shell weight of silkworm, of which 3 genes located on autosomes, the other located on the sex chromosome. Lu *et al.* (1981) pointed out that cocoon weight of silkworm was also controlled by at least 4 pairs of genes, and one of them located on sex chromosome. But, up to now, no study on the actual location of genes for cocoon weight and cocoon shell weight has ever been reported.

In this paper, the actual location of genes affecting the cocoon weight and the cocoon shell weight on sex chromosome of silkworm were successfully estimated by using 2 marker genes located on sex chromosome, and their genetic effects were analysed.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials (tested):

The silkworm variety Schod, provided by the Sericultural Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, with 2 marker genes, i.e. *sch* (locus 1-21.5) responsible for the chocolate colour of newly hatched larva and *od* (locus 1-49.6) responsible for the oily silkworm on its sex chromosome, was a pure race with lower cocoon weight. The structure of male sex chromosome of Schod was Z^{schod} . Pure variety Qincui is a high cocoon weight race of Chinese system, provided by Sericultural Institute of Shandong Province. Its structure of female sex chromosome was WZ^{sch+od} .

* To whom correspondence should be addressed. Project supported by the Natural Scientific Foundation of Zhejiang Province of China.

2. Methods:

Following the procedure in figure 1, BC₁ and F₂ of Qiucui × Schod were obtained respectively. In spring 1996, the two generations of larvae were separated into 2 sections according to the body colour of their newly hatched larva (chocolate or dark). When they reached maturity, normal larvae and oily larvae in each section were separated and mounted on different labelled mountages. At the 7th day after mounting, cocoons were picked and cut. The pupae were distinguished between male and female. Thus, all of the cocoons fell into 4 classes (according to the marked genotypes), i.e. normal dark, chocolate and oily, normal chocolate, and oily and dark. The cocoon and cocoon shell weight of each individual were weighed.

3. Statistical analysis:

1) Test of the difference of variances between each marker genotype class by *F*-test.

Formula

$$F = \frac{s_m^2}{s_n^2} \quad (s_m^2 \geq s_n^2) \dots \dots \dots (1)$$

Where s_m^2 and s_n^2 were variances of 2 marker genotype classes; m and n were the numbers of individuals in 2 marker genotype classes respectively.

2) Test of the differences of means between each marker genotype class by *t*-test.

$$\text{Formula: } t = \frac{|\bar{x}_n - \bar{x}_m|}{\sqrt{s_n^2 + s_m^2}} \sqrt{\frac{nm(n+m-2)}{n+m}} \dots \dots \dots (2)$$

Where $\bar{x}_n$ and $\bar{x}_m$ were the means of 2 marker genotype classes respectively.

3) Estimation of the actual locus and genic effect of quantitative character genes located on Z chromosome by the gene location method with marker gene, proposed by Mather and Jinks (1982).

RESULTS AND CONCLUSION

The cross type of experiment and the segregation types of marker genotypes in F₂ and BC₁ were illustrated in Fig. 1. As shown in Fig. 1, we took 3 kinds of individuals for analysis, i.e. female of F₂, male and female of BC₁. These 3 types were called 3 experiments by us in the following text. It was also found that the gene structures of the 3 experiments were similar with regard to Z chromosome, which could be analysed by the same method.

If the locations of *sch* and *od* on the first linkage group were represented as in Fig. 2, it would be well proved that if the quantitative trait locus (QTLs) *Q* lay left to *sch*, the means of class ++ and class +*od* were the same, and the means of class *sch*++ and class *schod* were the same too. Similarly, if *Q* lay right to *od*, the means of class ++ and class *sch*++ were the same, and the means of class +*od* and class *schod* were the same too. When *Q* lay between *sch* and *od*, the means of marker genotype classes were different (Mather and Jinks, 1982). For this purpose, the means between 4 marker genotype classes in the 3 experiments were tested by *t*-test.

Table I. The mean and standard error of cocoon weight and cocoon shell weight of each marker group, the number of individuals in the 3 experiments.

Tableau I. Moyenne et écart type du poids du cocon et du poids de la coque soyeuse de chaque groupe marqueur et nombre d'individus pour les 3 expériences.

Generations	Sex	Genotype	Number of individuals	Cocoon weight		Cocoon shell weight	
				Mean	Standard error	Mean	Standard error
				(cg)	(cg)	(cg)	(cg)
			<i>Nombre d'individus</i>	<i>Poids du cocon Moyenne (cg)</i>	<i>Ecart (cg)</i>	<i>Poids de la coque soyeuse Moyenne (cg)</i>	<i>Ecart (cg)</i>
		+sch ⁺ od	90	132.49	16.32	22.41	3.85
Schod × (Schod · Qiucui)	Male <i>Mâle</i>	schod	88	117.10	15.30	18.47	3.68
		+sch ⁺ od	27	124.14	16.79	19.88	3.96
		sch ⁺ od	25	117.24	14.44	18.77	3.29
		+sch ⁺ od	105	175.44	22.40	25.29	4.89
Schod × (Schod · Qiucui)	Female <i>Femelle</i>	schod	98	146.56	19.74	19.19	4.02
		+sch ⁺ od	32	164.96	24.83	22.77	4.77
		sch ⁺ od	28	152.08	18.30	20.16	3.51
		+sch ⁺ od	99	193.69	24.65	29.43	2.29
Schod × Qiucui F ₂	Female <i>Femelle</i>	schod	132	164.97	21.79	23.25	4.35
		+sch ⁺ od	45	176.11	19.24	24.98	3.74
		sch ⁺ od	45	160.47	25.16	22.57	4.10

The means, standard deviation and the number of individual tested for cocoon weight and cocoon shell weight of 4 marker genotype classes in 3 experiments were set out in Table I. *T* values of the means of cocoon weight and cocoon shell weight between marker genotype classes were set out in the upper half part right to the diagonal line of Table II and III respectively. The 3 experimental results of two characters were extremely identical from the Table II and III. Except that the differences of means of *schod* and *sch⁺* were not significant, the rest were almost all significant or highly significant.

Table II. *T*-test on the means of the cocoon weight from each marker gene group in 3 experiments and *F*-test on their variances.

Tableau II. Test-*T* sur les moyennes du poids du cocon de chaque groupe de gène marqueur pour 3 expériences et test-*F* sur leur variances.

Generation s	Sex	Marker genotypes	+ ^{sch} + ^{od}	<i>schod</i>	+ ^{sch} <i>od</i>	<i>sch</i> + ^{od}
	Sexe	Marqueur				
Schod × (Schod · Qiucui)	Male / Mâle	+ ^{sch} + ^{od}		6.487**	2.308*	4.232**
Schod × (Schod · Qiucui)	Female / Femelle			9.718**	2.258*	5.080**
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle			9.369**	4.231**	7.448**
Schod × (Schod · Qiucui)	Male / Mâle	<i>schod</i>	1.14		2.053*	0.041
Schod × (Schod · Qiucui)	Female / Femelle		1.29		4.286**	1.325
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		1.28		3.047**	1.149
Schod × (Schod · Qiucui)	Male / Mâle	+ ^{sch} <i>od</i>	1.06	1.20		1.59
Schod × (Schod · Qiucui)	Female / Femelle		1.23	1.58		2.259*
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		1.64	1.28		3.12**
Schod × (Schod · Qiucui)	Male / Mâle	<i>sch</i> + ^{od}	1.28	1.12	1.35	
Schod × (Schod · Qiucui)	Female / Femelle		1.50	1.16	1.84*	
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		1.04	1.33	1.71	

The data in the upper half part right to the diagonal line were *t*-values; those in the lower half part left to the diagonal line were *F*-values. / Les données dans la demi partie supérieure droite par rapport à la diagonale sont des valeurs *t*; celles dans la demi partie gauche inférieure par rapport à la diagonale sont des valeurs *F*.

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

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

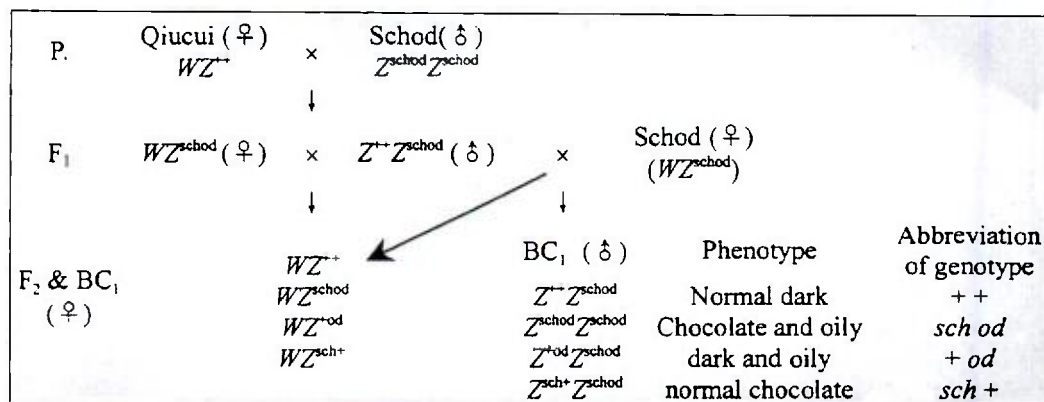


Fig 1. Segregation of marker genotypes in BC₁ and F₂.
Fig1. Ségrégation des génotypes marqueurs en BC₁ et F₂.

Consequently, it can well be considered that there was a major gene affecting the cocoon weight and cocoon shell weight between *sch* and *od*. If the recombination frequencies between *Q* (cocoon weight or cocoon shell weight) and *sch*, between *Q* and *od* were represented by p_{as} and p_{ao} respectively, and that between *sch* and *od* by $p = 0.496 - 0.215 = 0.281$, α expressed the genotype substitution effective value of the putative QTLs (*Q*); $\bar{x}$ expressed the mean of cocoon weight or cocoon shell weight of marker genotype class. According to Mather and Jinks (1982), which estimated the QTLs with morphological marker genes, and to corresponding statistical model, 3 equations were obtained:

$$p_{as} + p_{ao} = p \dots \dots \dots (3)$$

$$\alpha = \frac{1}{2}(\bar{x}_{++} - \bar{x}_{schod}) \dots \dots \dots (4)$$

$$\alpha \left(\frac{p_{ao} - p_{as}}{p} \right) = \frac{1}{2}(\bar{x}_{+od} - \bar{x}_{sch+}) \dots \dots \dots (5)$$

Table III. T-test on the means of cocoon shell weight from each marked gene group in 3 experiments and F-test on their variances.

Tableau III. Test-T sur les moyennes de poids de la coque soyeuse pour chaque groupe génétique dans 3 expériences et test-F sur leurs variances.

Generations	Sex	Marker genotypes				
	Sexe	Marqueurs	+ ^{sch} + ^{od}	<i>schod</i>	+ ^{sch} <i>od</i>	<i>sch</i> + ^{od}
Schod × (Schod·Qiucui)	Male / Mâle	+ ^{sch} + ^{od}		6.977**	2.975**	4.307**
Schod × (Schod·Qiucui)	Female / Femelle			9.670**	2.566*	5.199**
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle			9.735**	5.090**	7.705**
Schod × (Schod·Qiucui)	Male / Mâle	<i>schod</i>	1.09		1.711	0.574
Schod × (Schod·Qiucui)	Female / Femelle		1.48		4.173**	1.156
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		1.48		2.383*	0.919
Schod × (Schod·Qiucui)	Male / Mâle	+ ^{sch} <i>od</i>	1.06	1.16		1.095
Schod × (Schod·Qiucui)	Female / Femelle		1.05	1.41		2.384*
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		2.00*	1.35		2.913**
Schod × (Schod·Qiucui)	Male / Mâle	<i>sch</i> + ^{od}	1.37	1.25	1.45	
Schod × (Schod·Qiucui)	Female / Femelle		1.94*	1.31	1.85*	
Schod × Qiucui (F ₂)	Female / Femelle		1.66	1.13	1.20	

The data in the upper half part right to the diagonal line were *t*-values; those in the lower half part left to the diagonal line were *F*-values / Les données dans la partie supérieure droite par rapport à la diagonale sont des valeurs *t*; celles dans la demi partie inférieure gauche par rapport à la diagonale sont des valeurs *F*.

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

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

For solving the set of equation (3), (4) and (5), we obtained the estimated values of α , p_{QS} and p_{QO} . The parameter estimates of 3 experiments were set out in Table IV. We know from the table IV that the results of 3 experiments were extremely identical. It can be predicted that there are two genes affecting cocoon weight and cocoon shell weight existing on the first linkage group at 28.8 and 30.4 map distances respectively. From table IV, it can also be seen that although the generation types (BC_1 and F_2) of two female populations were different, the genotype substitution effect values (α) estimated were quite close to each other. While the effect value estimated from male population was only half of that of female. It can be explained by the fact that the female has only a Z chromosome, but the male has two Z chromosomes, of which one chromosome carried all of the deductive genes, i.e. it was caused by the difference between the genotypes of the female and male estimated (Fig. 1). From this result, it was also observed that at these loci, there were partial dominant effects. The F -test values of variances of the cocoon weight and cocoon shell weight within 4 marker genotype classes in 3 experiments were set out in the lower part left to diagonal line of Table II and Table III respectively. From the Table II and Table III, it was observed that among these F -values, only 4 values reached significant level, the rest did not. It can be proved that when variances within marker genotype class almost equated with each other, Q lay between the two marker genes would independently affect this character with other genes, i. e. there was no obvious epistatic effect. Hence, we can consider that there was no obvious epistatic effect between the genes responsible for cocoon weight and cocoon shell weight on Z chromosome and the genes at other loci.

Table IV. Effect value of genes responsible for the cocoon weight and the cocoon shell weight on the first linkage group and their loci.

Tableau IV. Valeur effet des gènes responsables du poids du cocon et du poids de la coque soyeuse sur le premier groupe de liaison et leurs loci.

Cross type	Sex	Cocoon weight				Cocoon shell weight			
		α (cg)	p_{QS}	p_{QO}	Q locus	α (cg)	p_{QS}	p_{QO}	Q locus
Type de croisement	Sexe	Poids du cocon				Poids de la coque soyeuse			
		α (cg)	p_{QS}	p_{QO}	locus de Q	α (cg)	p_{QS}	p_{QO}	locus de Q
Schod $\times$ (Schod $\cdot$ Qiucui)	Male / Mâle	7.7	0.078	0.203	1—29.3	1.97	0.101	0.180	1—31.6
Schod $\times$ (Schod $\cdot$ Qiucui)	Female / Femelle	14.44	0.078	0.203	1—29.3	3.05	0.080	0.201	1—29.5
Schod $\times$ Qiucui (F_2)	Female / Femelle	14.36	0.064	0.217	1—27.9	3.09	0.086	0.195	1—30.1
Mean / Moyenne			0.073	0.208	1—28.8		0.089	0.192	1—30.4

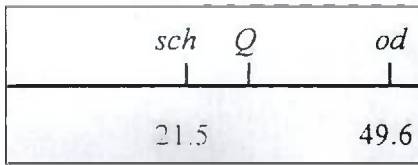


Fig 2. The loci of *sch*, *od* and *Q* on the 1st linkage group

Fig 2. Loci de sch, od et Q sur le premier groupe de liaison.

At present, the statistical models for locating the genes of quantitative character with molecular markers were pointed out by geneticists all over the world. But in this paper, the most classic statistical method was applied. It resulted in a good repetition of analytical result, although its analysis was simple, which required a few marker genes. So it still has a certain value in practice.

When calculating the recombination frequency, this paper used the directly additive expression $p = p_{QS} + p_{QO}$ arose by Mather et al., (1982). It can also obtain the same result by using probability expression $p = p_{QS} + p_{QO} - 2p_{QS}p_{QO}$ except that the estimates of p_{QS} and p_{QO} were slightly bigger.

Zhao et al., (1996) evaluated a lot of genetic map functions. Here, if we use Haldane's (1919) map function to convert recombination frequencies into distances in Morgan, the loci of the two genes are 42.9 cM (centimorgan) (cocoon weight) and 46.8 cM (cocoon shell weight) respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Professor Junting Huang, Sericultural Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, and Professor Jingquan Liu, Sericultural Institute of Shandong Province, for providing experimental materials with no expenditure.

REFERENCES

- HALDANE J. B. S. (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genetics*, 8:299-309.
- LU X.-Y, YANG M.-G., LI D.-N. et al., (1981) Study on the inheritance of quantitative characters in the silkworm (*Bombyx mori* L.) *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 7(1):27-39.
- MATHER K., JINKS J. L. (1982) The genetical foundation. *Biometrical Genetics*. 3rd ed., Chapman and Hall, London. 1-36.
- SHEN T.- H. (1928) On the inheritance of some quantitative characters in *Bombyx mori* L. *Jour. College of Agri. Imp. Univ. of Tokyo*, 10(1), 39-66.
- SHUN B. - Z., HU Y. - Z. (1965) Studies on the inheritance of quantitative characters in the silkworm II. *Acta Sericologia Sinica*, 3(1):42-46.
- SUZUKI K., ICHUMARU M. (1960) On the inheritance of the weight of cocoon shell in *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 29(6):501-505.
- ZHAO H. - Y., SPEED P. T. (1996) On genetic map functions. *Genetics*, 142, 1369-1377.

LES LOCUS DES GENES RESPONSABLES DU POIDS DU COCON ET DU POIDS DE LA COQUE LOCALISES SUR LE CHROMOSOME SEXUEL DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI*) ET L'ANALYSE DE LEURS EFFETS

K.-R. HE*, J.-H. HUANG & X.-R. ZHU

Sericultural Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Chine.

La variété de vers à soie Schod avec les gènes marqueurs sch et od sur le premier groupe de liaison (chromosome Z) a été croisée avec Quicui qui donne un poids élevé du cocon. Sur la base de l'analyse des générations de ségrégations (BC₁ et F₂) à partir du croisement des deux variétés mentionnées ci-dessus, les locus des caractères quantitatifs ont été localisés selon Mather et Jinks (1982). Les résultats ont démontré qu'il existe deux gènes affectant le poids du cocon et le poids de la coque du cocon sur le premier groupe de liaison, qui se trouvent à des distances cartographiques de 28,8 et 30,4 respectivement. Il existe un effet dominant partiel et pas d'épistasie sur les deux locus.

INTRODUCTION

Le poids du cocon et le poids de la coque du cocon sont deux caractères économiques importants du ver à soie. Depuis un demi siècle, des chercheurs de différents pays ont fait une étude approfondie sur ces caractères et ont obtenu de nombreux résultats utiles. Shen (1928), Suzuki et coll. (1960) et Shun et coll. (1965) ont remarqué qu'au moins quatre gènes influencent le poids de la coque du cocon du ver à soie, trois d'entre eux étant localisés sur des autosomes, le quatrième étant localisé sur le chromosome sexuel. Lu et coll. (1981) ont signalé que le poids du cocon du ver à soie est contrôlé par au moins quatre paires de gènes, l'une d'entre elles étant localisée sur le chromosome sexuel. Cependant, jusqu'à présent, on n'a jamais mené d'études sur la localisation réelle des gènes en ce qui concerne le poids du cocon et le poids de la coque du cocon.

Dans cet article, la localisation des gènes affectant le poids du cocon et le poids de la coque localisés sur le chromosome sexuel du ver à soie, a été déterminée avec succès en utilisant deux gènes marqueurs localisés sur le chromosome sexuel, et leurs effets génétiques ont été analysés.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels (testés) :

La variété de vers à soie Schod, fournie par l'Institut Séricicole, Académie Chinoise des Sciences Agricoles, avec deux gènes marqueurs, c'est-à-dire Sch (locus 1-21,5) à l'origine de la couleur chocolat de la larve nouvellement éclos et od (locus 1-49,6) responsable de la mutation oily, localisés sur son chromosome sexuel, est une race pure avec un poids de cocon faible. La structure du chromosome sexuel mâle de Schod est $Z^{schod}Z^{schod}$. La variété pure Quicui, race ayant un poids de

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance. Projet soutenu par la Natural Scientific Foundation de la Province de Zhejiang en Chine.

cocon important, a été fournie par l'Institut Séricicole de la province de Shandong. Sa structure chromosomique sexuelle femelle est $WZ^{+sch+od}$.

2. Méthodes :

Selon la procédure indiquée dans la Figure 1, le croisement de retour (BC_1) et la F_2 de Quicui $\times$ Schod ont été réalisés. Au printemps 1996, les deux générations de larves ont été séparées en deux sections selon la couleur du corps de leur larve nouvellement éclos (chocolat ou foncée). Lorsqu'elles sont matures, les larves normales et les larves huileuses dans chaque section sont séparées et placées sur différents montages marqués. Au septième jour après l'installation, les cocons ont été récoltés et coupés. On a séparé les pupes mâles et femelles. Ainsi, tous les cocons sont rangés en quatre classes (conformément aux génotypes marqués), c'est-à-dire noir normal, chocolat et huileux, chocolat normal, huileux et noir. Les poids du cocon et de la coque du cocon de chaque individu ont été pesés.

3. L'analyse statistique :

3. 1. Test de la différence des variances entre chaque classe de génotypes marqueurs par le test F .

$$\text{Formule : } F = \frac{s_m^2}{s_n^2} \quad (s_m^2 \geq s_n^2) \dots\dots\dots (1)$$

Où s_m^2 et s_n^2 sont les variances de deux classes des génotypes marqueurs ; m et n sont les nombres d'individus dans les deux classes de génotypes marqueurs respectivement.

3. 2. Test des différences de moyennes entre chaque classe de génotypes marqueurs par le test t .

$$\text{Formule : } t = \frac{|\bar{x}_n - \bar{x}_m|}{\sqrt{\frac{S_n^2 + S_m^2}{n + m}}} \sqrt{\frac{nm(n + m - 2)}{n + m}} \dots\dots\dots (2)$$

Où $\bar{x}_n$ et $\bar{x}_m$ sont les moyennes de deux classes de génotypes marqueurs.

3. 3. Estimation du locus et de l'effet génique des gènes de caractères quantitatifs localisés sur le chromosome Z par la méthode de localisation des gènes avec gène marqueur, proposé par Mather et Jinks (1982).

RESULTATS ET CONCLUSION

Le type de croisement et les types de ségrégation des génotypes marqueurs en F_2 et BC_1 sont illustrés dans la Fig. 1. Comme présenté dans la Fig. 1, nous avons pris trois sortes d'individus comme objets de l'analyse, c'est-à-dire femelle F_2 , mâle et femelle de BC_1 . Nous avons appelé ces trois types les trois expériences dans le texte suivant. On a aussi découvert que les structures des gènes des trois expériences étaient similaires pour ce qui est du chromosome Z, qui pourrait être analysé par la même méthode.

Si les localisations de *sch* et *od* sur le premier groupe de liaison sont telles qu'indiquées sur la Fig. 2, le locus du caractère quantitatif (QTLs) Q est à gauche de *sch*, les moyennes de la classe ++ et de la classe +*od* sont les mêmes, et les moyennes de la classe *sch*+ et de la classe *schod* sont aussi les mêmes. De façon similaire, si Q est à droite de *od*, les moyennes de la classe ++ et de la classe *sch*+ sont les mêmes, et les moyennes de la classe +*od* et de la classe *schod* sont aussi les mêmes. Si Q est entre *sch* et *od*, les moyennes des classes des génotypes marqueurs sont différentes (Mather et

Jinks, 1982). A cet effet, les moyennes entre les quatre classes de génotypes marqueurs dans les trois expériences ont été testées par le test t .

Les moyennes, l'écart-type et le nombre d'individus testés pour le poids du cocon et le poids de la coque des quatre classes de génotypes marqueurs dans les trois expériences sont indiqués dans le tableau I. Les valeurs t des moyennes du poids du cocon et du poids de la coque entre les classes de génotypes marqueurs ont été inscrites dans la moitié supérieure à droite de la ligne diagonale des tableaux II et III respectivement. Les trois résultats expérimentaux des deux caractères sont parfaitement identiques dans les tableaux II et III. Excepté le fait que les différences de moyennes de *schod* et *sch+* ne sont pas significatives, presque toutes les autres sont significatives ou très significatives. Par conséquent, on peut considérer qu'il existe un gène majeur qui affecte le poids du cocon et le poids de la coque du cocon entre *sch* et *od*. Si les fréquences de recombinaison entre Q (poids du cocon ou poids de la coque du cocon) et *sch*, entre Q et *od* sont représentées par p_{as} et p_{ao} respectivement, celle entre *sch* et *od* est $p = 0,496 - 0,215 = 0,281$.

α exprime la valeur effective de substitution du génotype des QTLs (Q) putatif ; $\bar{x}$ exprime la moyenne du poids du cocon ou du poids de la coque de la classe de génotype marqueur. Selon Mather et Jinks (1982), qui ont estimé les QTLs avec des gènes marqueurs morphologiques, et selon le modèle statistique correspondant, trois équations ont été obtenues :

$$p_{as} + p_{ao} = p \dots\dots\dots(3)$$

$$\alpha = \frac{1}{2}(\bar{x}_{++} - \bar{x}_{schod}) \dots\dots\dots(4)$$

$$\frac{\alpha(p_{ao} - p_{as})}{p} = \frac{1}{2}(\bar{x}_{+od} - \bar{x}_{sch+}) \dots\dots\dots(5)$$

En résolvant le système d'équations (3), (4) et (5), les valeurs de α , p_{as} et p_{ao} ont été obtenues. Les estimations des paramètres dans les trois expériences sont présentées dans le tableau IV. D'après le tableau IV, nous voyons que les résultats des trois expériences sont parfaitement identiques. On peut penser qu'il existe deux gènes influençant le poids du cocon et le poids de la coque du cocon sur le premier groupe de liaison à des distances cartographiques de 28,8 et 30,4 respectivement. A partir du tableau IV, on peut aussi observer que bien que les types de générations (BC_1 et F_2) des deux populations femelles soient différents, les valeurs d'effet de substitution du génotype (α) calculées sont assez proches les unes des autres, alors que la valeur d'effet calculée à partir de la population mâle représente seulement la moitié de celle de la population femelle. Cela peut s'expliquer par le fait que la femelle possède seulement un chromosome Z, alors que le mâle a deux chromosomes Z, dont un porte tous les gènes déductifs c'est-à-dire qu'il est provoqué par la différence entre les génotypes des femelles et des mâles estimés (Fig.1). A partir de ce résultat, on peut remarquer qu'il existe des effets dominants partiels sur ces locus. Les valeurs du test F des variances du poids du cocon et du poids de la coque à l'intérieur des quatre classes de génotypes marqueurs dans trois expériences ont été présentées dans la partie la plus basse à gauche de la ligne diagonale des tableaux II et III respectivement. A partir des tableaux II et III, on observe que parmi ces valeurs F , seulement quatre valeurs ont atteint un seuil significatif, les autres ne l'ont pas atteint. On peut prouver que lorsque les variances à l'intérieur de la classe du génotype marqueur sont presque équivalentes les unes aux autres, Q se situant entre les deux gènes marqueurs affecterait indépendamment ce caractère avec d'autres gènes, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'effet épistatique évident. Par conséquent, nous pouvons considérer qu'il n'y a pas d'effet épistatique évident entre les gènes responsables du poids du cocon et du poids de la coque du cocon sur le chromosome Z et les gènes d'autres locus.

A présent, les modèles statistiques pour localiser les gènes des caractères quantitatifs avec des marqueurs moléculaires ont été décrits par des généticiens dans le monde entier. Dans cet article, la méthode statistique la plus classique a été appliquée. Elle a entraîné une bonne répétition du résultat

analytique, bien que son analyse soit simple, ce qui a nécessité quelques gènes marqueurs. Par conséquent, elle a toujours une certaine valeur pratique.

Lors du calcul de la fréquence de recombinaison, nous avons utilisé l'expression additive directe $p = p_{QS} + p_{QO}$ présentée par Mather et coll. (1982). Le même résultat peut être obtenu en utilisant l'expression de probabilité $p = p_{QS} + p_{QO} - 2p_{QS} + p_{QO}$ excepté le fait que les valeurs de p_{QS} et p_{QO} étaient légèrement plus grandes.

Zhao et coll. (1996) ont calculé beaucoup de fonctions cartographiques génétiques. Ici, si nous utilisons la fonction cartographique de Haldane (1919) pour convertir les fréquences de recombinaison en distances Morgan, les locus des deux gènes sont à 42,9 cM (centimorgan) (poids du cocon) et 46,8 cM (poids de la coque du cocon) respectivement.

ANTENNAL AND MOUTHPART SENSILLA OF THE MUGA SILKWORM, *ANTHERAEA ASSAMA* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)

L. K. HAZARIKA* & SUNAYAN BARDOLOI

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

*Based on light and scanning electron microscopic observations, external morphology, distribution and number of antennal and mouth part sensilla of *Antheraea assama* Westwood are described. Sensilla-chaetica, -trichodea, -styloconica, -basiconica I, II and III were distinguished. The predominant group of sensilla was sensilla basiconica distributed over antenna and maxilla.*

Keywords: *Antheraea assama*, antenna, mouth part, sensilla.

INTRODUCTION

Insects are capable of adequately and specifically monitoring their external environments by employing a host of exteroceptors. Exteroceptors are present on various parts of the insect body mainly on antennae, mouthparts and prolegs (Akai, 1976; Devit and Smith, 1982; Anderson and Hallberg, 1990; Asaoka and Akai, 1991). Respective functions are assigned for these sensilla on different body parts of lepidopteran insects, such as the apical sensilla on the maxillary palpi are olfactory receptors (Ishikawa, 1963, 1966; Schoonhoven and Dethier, 1966; Hansen and Dethier, 1973; Dethier, 1977), while the medial and lateral styloconics on the galea, and sensory receptors on the epipharynx are gustatory receptors (Dethier and Kuch, 1971; Deboer *et al.*, 1977). Similarly certain hairs and sensilla on the antennae, maxillae and tarsi of insects were reported to act as thermoreceptors, for example, sensilla trichodea, -basiconica, -coeloconica and styloconic pegs (Altner and Prillinger, 1980; Altner and Loftus, 1985).

The aim of the present study is to examine the external morphology and distribution of various sensilla on the antennae and mouthparts of the Muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) larvae, an indigenous sericogenic species native to North East India producing golden yellow coloured silk (Bardoloi and Hazarika, 1992), so as to understand their involvement in feeding and microhabitat selection. Furthermore, work on sensilla on this species are lacking; this study is the first attempt on this aspect.

MATERIALS AND METHODS

Antennae and mouthparts of fifth instars (72 h post moult) of *A. assama* were excised and were prefixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2-7.4) for 2 h at 0°C. The specimens were then washed three times (30 min each) in the same buffer. Subsequent post fixation in 1 % osmium tetroxide for 2 h, specimens were then washed three times (30 min each) in distilled water. Following dehydration in a graded series of acetone (30, 50, 70, 80, 90, 95 and 100 %), they were dried to a critical point using CO₂ (Polaron E 3000 Apparatus) and mounted on aluminium stubs

* To whom correspondence should be addressed.

with double sided sticky tape and coated with gold palladium (350° A thick) in a JEOL, JFC 1100 sputterer. They were then examined under a scanning electron microscope (JSF, 35-CF) at 15 KV. Five specimens for each part from five different larvae were examined. Sensillae were identified based on Schneider (1964), McIver (1975) and Ramaswamy, S. B. (Personal communication).

Sensillar measurements were determined by measuring each sensillum on five specimens.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Antenna and antennal sensilla:

Each antenna is a short segmented protuberance clearly divisible into scape (Sc) (375.00-383.00 μ m long and 250.00-266.00 μ m in width), pedicel (pd) (610.00-616.66 μ m long and 160.00-166.66 μ m wide) and sensory hairs (Sh) [(193.00-833.00 μ m long and 2.30-7.80 μ m wide respectively) (short and long ones)] (Fig. 1A). Numerical distribution of various sensilla in the antennal segments is shown in Table I. The blunt depressed apical end of each antenna bears a complex of sensory receptors, of which the two sensory hairs are the most conspicuous. The sensory hairs are basically smooth surfaced with some striations to lend structural support.

In addition to these sensory hairs, the disc like concave apical end of the pedicel bears certain sensory cones of 11.66-13.33 μ m in length and 4.16-5.00 μ m in diameter (Table I) whose spongy surfaces are perforated (Fig. 1B, C, Sb I) such are the typical characteristics of chemoreceptors (Van der Pers *et al.*, 1980). This group of sensilla was also found on antennae of *Drosophila melanogaster* Meigen (Itoh *et al.*, 1991), Tetrigidae (Orthoptera) (Bland, 1991), and also in *Speonomus hydrophilus* Jeannel (Crouau and Crouau-Roy, 1991). Another segmented cone like cuticular elevation of 10.00-10.62 μ m in length and 5.25-5.62 μ m in diameter (Table I) was also observed on the antennal tip (Fig. 1C, Ss) within a ring like surrounding (Fig. 1C*). Similar elevations in the heliothine larvae are termed sensilla styloconica (Baker *et al.*, 1986). The smaller peg like structures (Fig. 1C, Sb II) evident near the sensillum styloconicum ranging in length from 2.50-3.10 μ m and 1.80-2.50 μ m in diameter (Table I) are usually referred to as basiconic pegs in other insects (Bland, 1983). Devitt and Smith (1982) described similar structures in the palpi of *Euxoa messoria* (Harris) simply as 'pegs' having similar functions like those of basiconic sensilla. Inside and around the ring of the antennal apical end there are a few cuticular openings and multichanneled openings (Fig. 1C, co, mo).

Table I. Means $\pm$ SE length and width of various sensilla and its number on the antenna of 5th instar *A. assama*.

Tableau I. Longueur et largeur moyennes de diverses sensilles et leur nombre sur l'antenne de A. assama au cinquième âge.

Type of sensilla	Length μ m	Width μ m	Number
Type de sensille	Longueur μ m	Largeur μ m	Nombre
Sensillum styloconicum	10.37 $\pm$ 0.75	5.49 $\pm$ 0.10	1
Sensilla basiconica (Sb I)	12.77 $\pm$ 0.45	4.72 $\pm$ 0.22	3
Basiconic pegs (Sb II)	2.70 $\pm$ 0.16	2.26 $\pm$ 0.19	2
Pointes à base conique (Sb II)			

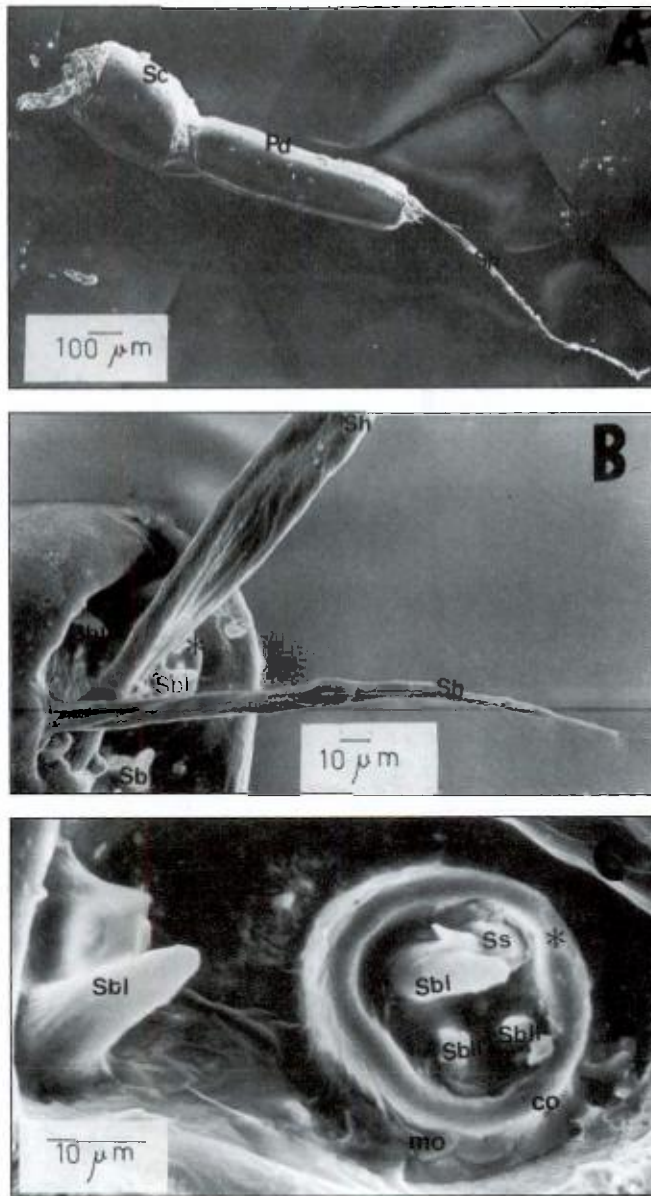


Fig. 1. Antennal sensilla of the 5th instar *A. assama*. A. The whole antenna, divided into scape (Sc), pedicel (Pd) and sensory hairs (Shd). B. Apical tip of the pedicel showing the concave disc bearing various sensilla [sensilla basiconica I, (Sb I)] and a ring (*). C. Part of the apical tip of the pedicel showing the ring (*) which bears Sb I, Sb II, sensilla styloconica (Ss). Cuticular openings (Co) and multichanneled openings (mo) are also seen.

Fig. 1. La sensille antennaire chez *A. assama*, au 5ème âge A. L'antenne dans sa totalité, est composée d'un scape (Sc), un pédicèle (Pd) et de poils sensoriels (Sh). B. L'extrémité apicale du pédicèle présentant le disque concave supportant diverses sensilles [sensille basiconique I, (Sb I)] et un anneau (*). C. Partie de l'extrémité apicale du pédicèle montrant l'anneau (*) qui supporte Sb I, Sb II, les sensilles styloconiques (Ss). Les ouvertures cuticulaires (Co) et les ouvertures multicanaux (mo) sont également visibles.

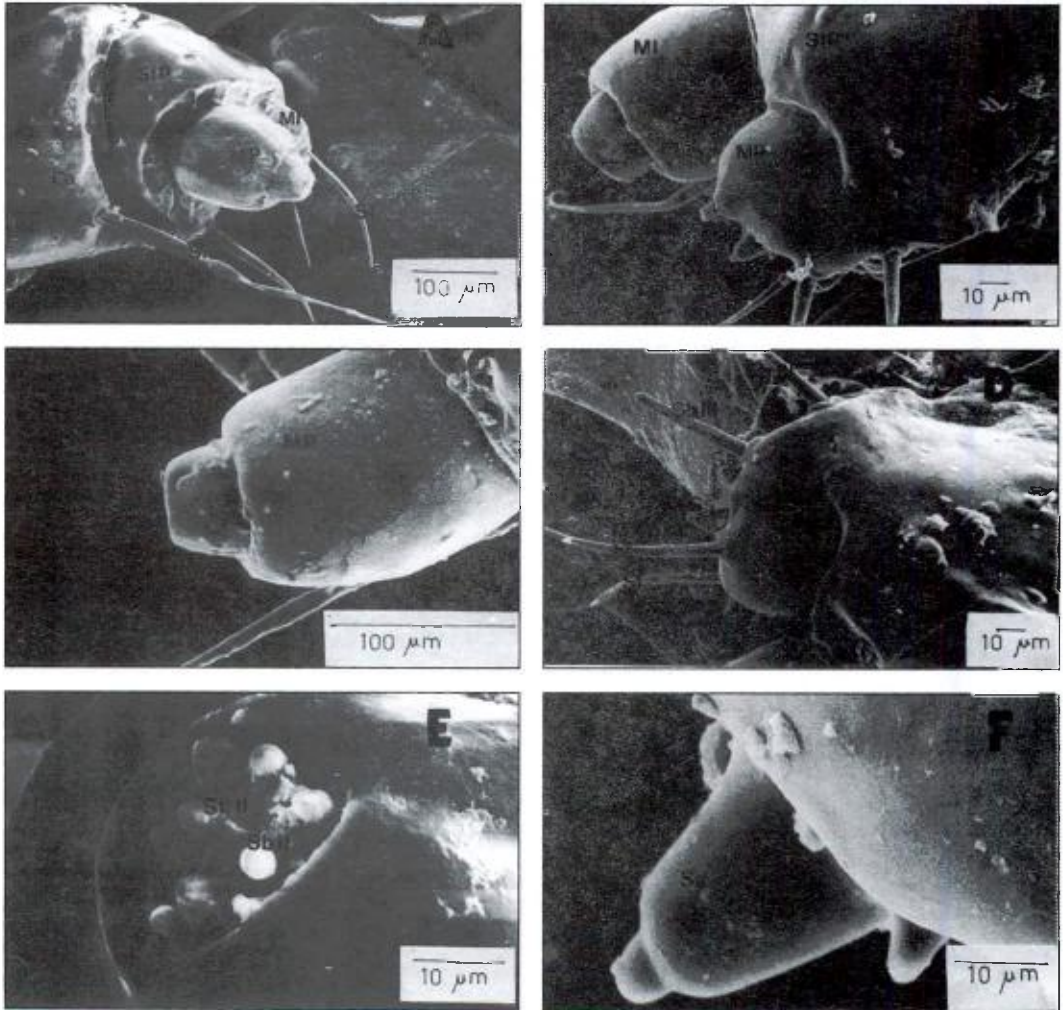


Fig. 2. Sensilla on the maxilla of 5th instar *A. assama*. **A.** Whole maxilla showing the cardo (Ca), stipes (Stp), maxillary palp (Mp) and lobe (MI), sensory hairs (Sh) and sensilla trichodea (St). **B.** Shows the origin of Mp and MI from the Stp. **C.** 2-segmented Mp enlarged. **D.** MI bearing various sensilla like Sb III, Ss, St. **E.** Tip of the Mp to show the presence of Sb II. **F.** Ss enlarged to show its 2-segmented appearance.

Fig. 2. La sensille sur la maxillaire d'*A. assama* au 5ème âge. **A.** La maxillaire entière montrant le cardo (Ca), les stipes (Stp), le palpe (Mp) et le lobe (MI) maxillaires, les poils sensoriels (Sh) et la sensille trichode (St). **B.** Origine de Mp et de MI à partir de Stp. **C.** Agrandissement de 2 Mp segmentés. **D.** MI supportant diverses sensilles comme Sb III, Ss, St. **E.** Extrémité de Mp montrant la présence de Sb II. **F.** Ss agrandie pour montrer ses deux aspects segmentés.

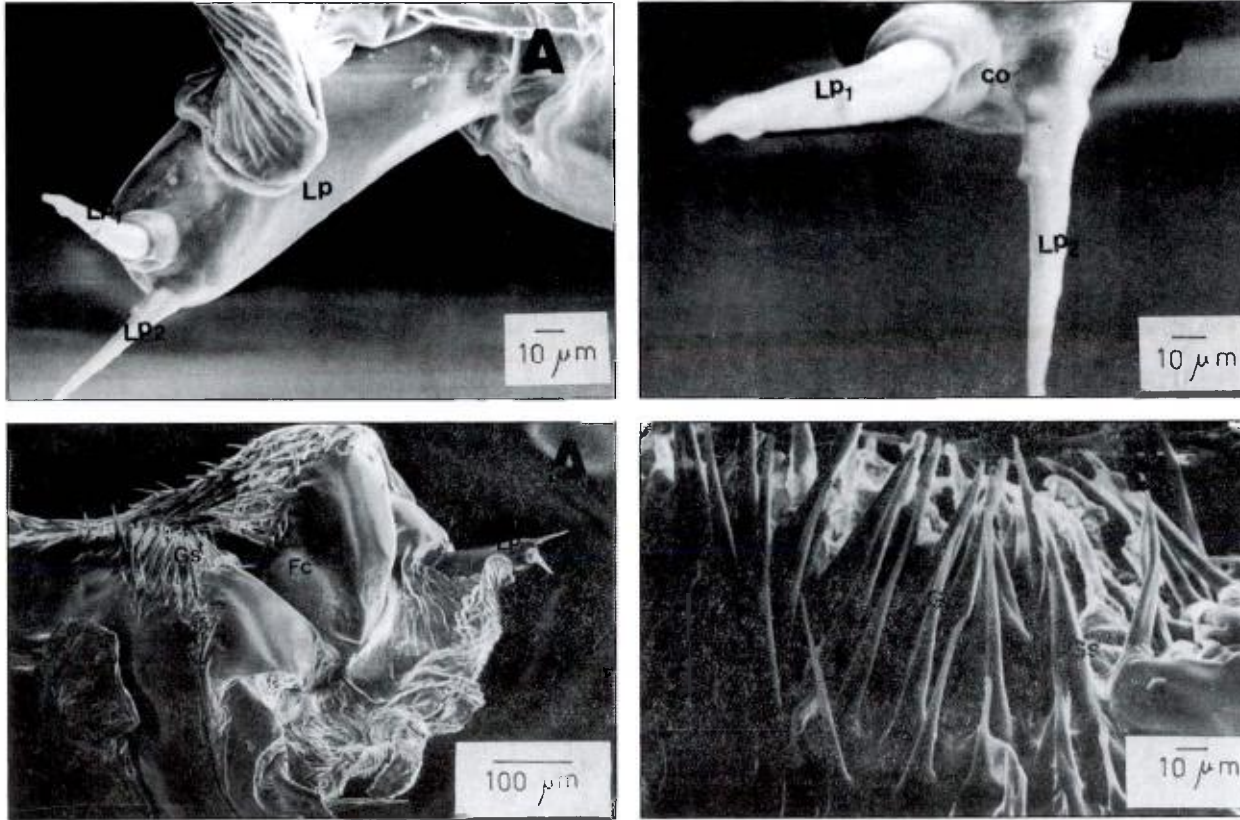


Fig. 3 (top). Labial palp (Lp) of *A. assama*. A. Bearing two sensilla (Lp₁ and Lp₂). B. Outgrowths on Lp₂ and cuticular openings (co) on Lp₁.

Fig. 3 (haut). Le palpe labial (Lp) de *A. assama*. A. Supportant deux sensilles (Lp₁ et Lp₂). B. Excroissances sur Lp₂ et les ouvertures cuticulaires (co) sur Lp₁.

Fig. 4 (bottom). Hypopharynx of *A. assama*. A. General location of the hypopharynx, food canal (Fc) and labial palp (Lp). B. Gustatory sensilla (Gs) on the floor of the hypopharynx.

Fig. 4 (bas). L'hypopharynx de *A. assama*. A. Localisation générale de l'hypopharynx, du canal alimentaire (Fc) et du palpe labial (Lp). B. La sensille gustative (Gs) sur le plancher de l'hypopharynx.

Table II. Mean $\pm$ SE lengths and widths of various sensilla and their number on the different mouthparts of 5th instar *A. assama*.*Tableau II.* Longueurs et largeurs moyennes $\pm$ SE de diverses sensilles et leur nombre sur différentes parties buccales chez *A. assama* au cinquième stade.

Type of sensilla <i>Type de sensille</i>	Length / Longueur μm	Width / Largeur μm	Number / Nombre μm
Maxilla / <i>Maxille</i>			
Sensilla trichodea <i>Sensille trichode</i>	70.83 $\pm$ 9.16	6.33 $\pm$ 0.59	2
Sensilla styloconica <i>Sensilles styloconiques</i>	29.49 $\pm$ 1.32	21.72 $\pm$ 0.22	2
Long sensillum basiconica (Sb III) <i>Longue sensille basiconique (Sb III)</i>	51.50 $\pm$ 4.49	7.33 $\pm$ 0.13	2
Basiconic pegs (Sb II) <i>Pointes basiconiques (Sb II)</i>	5.55 $\pm$ 0.45	3.85 $\pm$ 0.26	8
Labium / <i>Labium</i>			
Median labial palp <i>Palpe labial médian</i>	50.16 $\pm$ 0.13	19.06 $\pm$ 0.02	1
Lateral labial palp <i>Palpe labial latéral</i>	49.66 $\pm$ 0.27	8.12 $\pm$ 0.04	1
Hypopharynx / <i>Hypopharynx</i>			
Gustatory sensilla <i>Sensille gustative</i>	69.86 $\pm$ 4.86	6.00 $\pm$ 0.94	Innumerable/ <i>Innombrable</i>

2. Structure of maxilla and its sensilla

In *A. assama*, the paired maxillae are greatly reduced (Fig. 2A) but distinctly divisible into cardo (Ca) (420.55-437.50 μm in length and 610.55-625.00 μm in width), stipes (st) (240.00-250.00 μm long and 330.5-337.50 μm wide), galea or maxillary lobe (Ml) (60.00-65.00 μm in length 80.00-85.00 μm wide at the base) and maxillary palp (Mp) (100.00-110.00 μm long and 79.50-82.50 μm wide). They are embedded in the soft cuticle, dorsal to the labium. The maxillary palp is segmented, soft, pliant and rounded, while the lobe is unsegmented and round bearing apical sensory structures (Fig. 2 B, C, D).

Striated sensory hairs (Sh) ranging from 450.00-500.00 μm in length and 18.75-20.00 μm in diameter attached to circular sockets were found on the inner side of the cardo and stipes (Fig. 2A).

Fig. 2E shows the sensory receptors of the maxillary palp, which include eight cone-like cuticular elevations (Sb II) 5.00-6.66 μm in length 3.33-4.44 μm in diameter (Table II), that appear to be equivalent to basiconic sensilla in other lepidopterans to act as gustatory sensilla. Schoonhoven (1972) reported the presence of eight such sensilla on each of the maxillary palpi of *Pieris brassicae* (L). Similarly the maxillary lobe was found to contain sensilla styloconica (Fig. 2, Ss) (26.00-32.00 μm

in length and 21.17-22.00 μm in diameter) equivalent to those present on the galca of *Heliothis virescens* (F.) (Baker *et al.*, 1986) along with certain hairy sensilla (St) with a slender distally curved stem (55.00-92.00 μm in length and 5.00-7.50 μm in diameter; Table II). Chemosensory functions of maxillary sensilla were demonstrated in *Bombyx mori* L. larvae (Ishikawa, 1963, 1966). However, another type of sensilla was found on the maxillary lobe, which unlike sensilla trichodea were blunt and not distally curved (Fig. 2D, Sb III). Arising from a slightly raised base, the 46.00-62.00 μm long and 7.00-7.50 μm wide (Table II) sensilla are structurally similar to the long basiconic sensilla.

3. Structure of labium and its sensilla

Labium is reduced to a spinnerate and two small palpi of 130.00-133.33 μm in length and 45.00-50.00 μm in breadth. Each unsegmented labial palp (Fig. 3, Lp) is consisted of two labial palp sensilla (Fig. 3, Lp1, Lp2). The 49.00-50.00 μm long and 8.00-8.18 μm wide (Table II) lateral palp sensillum (Lp2) is rather cylindrical with some outgrowths and the medial segmented one (Lp1) is with a bulbous base, ranging from 50.00-50.20 μm in length and 19.00-19.09 μm in diameter. Such receptors were also observed in *Helicoverpa zea* Boddie and *H. virescens* (Baker *et al.*, 1986) and also in *E. messoria* (Devitt and Smith, 1982). The bulbous base of the medial labial palp sensillum (Lp1) is provided with a few cuticular openings (Fig. 3B, co).

4. Structure of hypopharynx

The hypopharynx (Fig. 4A) is lined by numerous hair like structures (Fig. 4, Gs) ranging from 58.00-76.00 μm in length and 4.00-8.00 μm in diameter at the base (Table II), along the food canal (Fc). Similar hair like structures along the food canal in other lepidopterous larvae were also reported to be gustatory receptors (Dethier and Kueh, 1971).

Six types of sensilla have been identified on antennae and different mouthparts of *A. assama* larvae to act either as mechano- or as chemo-receptor, which are almost similar to those described in other lepidopteran larvae. Basiconic sensilla have earlier been reported to perform thermoreceptive functions in adult flea beetle (Ritcey and Melver, 1990) and other insects. On the other hand, workers like Schoonhoven (1967, 1972), Loftus and Corbiere-Tichane (1981) reported the sensillum styloconicum to be temperature receptive in some other lepidopteran insects which might be true for *A. assama* larvae as well. Basiconic sensilla of the antennal tip and maxillary palp are chemoreceptors in *A. assama* larvae.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Department of Sericulture, Assam and Assam Science, Technology & Environmental Council, Guwahati. We thank the Regional Sophisticated Instrumentation Centre, Shillong for providing SEM facilities. Prof. Sonny B. Ramaswamy, Mississippi State University, Drawer EM, MS 39762, USA has kindly identified the sensilla and critically reviewed the manuscript.

REFERENCES

- AKAI H. (1976) Surface structure of insects, pp. 1-139, Tokyo University Press, Tokyo.
- ALTNER H., LOFTUS R. (1985) Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 30 : 273-295.
- ALTNER H., PRILLINGER L. (1980) Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *Int. Rev. Cytol.*, 67 : 69-139.
- ANDERSON P., HALLBERG E. (1990) Structure and distribution of tactile and bimodal taste/tactile sensilla on the ovipositor, tarsi and antennae of flour moth *Ephesia kuehniella* (Z.) (Lepidoptera: Pyraliidae). *Int. J. Insect Morphol. and Embryol.*, 19 : 13-24.

- ASAOKA K. AND AKAI H. (1991) Morphology of the larval taste organs of *Anthearea yamamai* and their spike responses to stimulation with certain sugars and alkaloids. Wild Silkmoths 1989-90, pp. 35-42, Japanese Society for Wild Silkmoth, Tsukuba.
- BAKER G. T., PARROT W. L., JENKINS J. N. (1986) Sensory receptors on the larval maxillae and labia of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 15: 227-232.
- BARDOLOI S., HAZARIKA L. K. (1992) Seasonal variation of body weight, lipid reserves, blood volumes and hemocyte population of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae). Environ. Entomol., 21 (6): 1398-1403.
- BLAND R. G. (1983) Sensilla on the antennae, mouthparts and body of the larva of the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 12: 261-272.
- BLAND R. G. (1991) Antennal and mouthpart sensilla of Tetrigidae (Orthoptera). Ann. Entomol. Soc. Amer., 84: 195-200.
- CROUAU Y., CROUAU-ROY B. (1991) Antennal sensory organs of a troglobitic coleoptera *Speonomus hydrophilus* Jeannel (Catopidae): An ultrastructural study by chemical fixation and cryofixation. Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 20: 169-184.
- DEBOER G., DETHIER V. G., SCHOONHOVEN L. M. (1977) Chemoreceptors in the preoral cavity of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) and their possible function in feeding behaviour. Entomol. Exp. Appl., 21: 287-298.
- DETHIER V. G. (1977) Gustatory sensing of complex mixed stimuli by insects. In 'Proc. Int. Symp. Olfaction and Taste VI'. Ed by J. Lemagen, JRL Press Ltd., London, pp. 323-331.
- DETHIER V. G., KUCH J. H. (1971) Electrophysiological studies of gustation in lepidopterous larvae. I. Comparative sensitivity to sugars, amino acids and glycosides. Z. Verol. Physiol., 72: 343-363.
- DEVITT B. D., SMITH J. J. B. (1982) Morphology and fine structure of mouthpart sensilla in the dark sided cutworm *Euxoa messoria* (Harris) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 11: 255-270.
- HANSEN F. E., DETHIER V. G. (1973) Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.). J. Insect Physiol., 19: 1019-1034.
- ISHIKAWA S. (1963) Response of maxillary chemoreceptors in the larva of the silkworm, *Bombyx mori* to stimulation by carbohydrates. J. Cell Comp. Physiol. 61: 99-107.
- ISHIKAWA S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larva of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Cell Physiol. 71-11.
- ITOH J., YOKOHARI F., TANIMURA T., TOMINAGE Y. (1991) External morphology of sensilla in the sacculus of an antennal flagellum of the fruit fly *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 20: 235-243.
- LOFTUS R., CORBIERE-TICHANE G. (1981) Antennal warm and cold receptors of cave beetle *Speophyes lucidulus* Delar. in sensilla with a lamellated dendrite. I. Response to sudden temperature change. J. Comp. Physiol., 143: 443-452.
- Mc IVER S. B. (1975) Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. Annu. Rev. Entomol., 20: 381-397.
- RITCEY C. M., Mc IVER S. B. (1990) External morphology of antennal sensilla of four species of adult flea beetles (Coleoptera: Chrysomellidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol. 19: 141-153.
- SCHNEIDER D. (1964) Insect antennae. Annu. Rev. Entomol., 9: 103-122.
- SCHOONHOVEN L. M. (1967) Some cold receptors in larvae of three lepidopterous species. J. Insect Physiol. 13: 821-826.
- SCHOONHOVEN L. M. (1972) Plant recognition by lepidopterous larvae. In 'Insect Plant Relationship'. H. F. Van Einden ed., Symp. R. Entomol. Soc. Lond. No. 6. London, pp. 87-99.
- SCHOONHOVEN L. M., DETHIER V. G. (1966) Sensory aspects of host plant discrimination by lepidopterous larvae. Arch. Neerl. Zool. 16: 497-530.

VAN DER PERS J. N. C., CUPERUS P. L., DEN OTTER C. D. (1980) Distribution of sense organs on male antennae of small ermine moths, *Yponomeuta* spp (Lepidoptera: Yponomeutidae). Int. J. Insect.Morphol. and Embryol., 9 : 15-23.

LES SENSILLES ANTENNAIRE ET BUCCALE DU VER A SOIE MUGA, *ANTHERAEA ASSAMA* (LEPIDOPTERE: SATURNIIDAE)

L. K. HAZARIKA* AND SUNAYAN BARDOLOI

Department of Entomology, Assam Agricultural University, Jorhat 785 013, Assam, Inde.

*Basées sur des observations aux microscopes optique et électronique à balayage, la morphologie externe, la distribution et le nombre de sensilles antennaires et buccales de *Antheraea assama* Westwood sont décrits. On distingue les sensilles chaetica, trichodea, styloconica, basiconica I, II et III. Le groupe prédominant de sensilles est la sensille basiconica répartie sur l'antenne et la maxille.*

INTRODUCTION

Les insectes sont capables d'examiner de façon adéquate et spécifique leur environnement en utilisant un ensemble de récepteurs externes. Les récepteurs sont présents sur diverses parties du corps de l'insecte principalement sur les antennes, les pièces buccales et les fausses pattes (Akai, 1976 ; Devit et Smith, 1982 ; Anderson et Hallberg, 1990 ; Asaoka et Akai, 1991). Des fonctions respectives ont été attribuées pour ces sensilles sur différentes parties du corps des lépidoptères, ainsi les sensilles apicales sur le palpe maxillaire sont des récepteurs olfactifs (Ishikawa, 1963, 1966 ; Schoonhoven et Dethier, 1966 ; Hansen et Dethier, 1973 ; Dethier, 1977), alors que les styloconiques médians et latéraux sur la galea, et les récepteurs sensoriels sur l'épipharynx sont des récepteurs gustatifs (Dethier et Kuch, 1971, Deboer et coll., 1977). De la même façon, certains poils et sensilles sur les antennes, les maxilles et le tarse des insectes agiraient comme des thermorécepteurs, par exemple, les sensilles trichodea, basiconica, coeloconica et les crochets styloconiques (Altner et Prillinger, 1980 ; Altner et Loftus, 1985).

Le but de la présente étude est d'examiner la morphologie externe et la répartition des diverses sensilles sur les antennes et les appareils buccaux chez les larves du ver à soie Muga, *Antheraea assama* Westwood (Lépidoptère : Saturniidae), une espèce indigène séricigène originaire du nord-est de l'Inde produisant de la soie couleur jaune or (Bardoloi et Hazarika, 1992), de façon à comprendre leur implication dans la sélection alimentaire et du microhabitat. En outre, une recherche sur les sensilles de cette espèce fait défaut ; cette étude est le premier essai.

MATERIELS ET METHODES

Les antennes et les appareils buccaux des cinquièmes âges (72 h post mue) d'*A. assama* sont disséqués et préfixés dans de la glutaraldehyde à 2 % dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,2-7,4) pendant 2 heures à 0°C. Les spécimens sont ensuite lavés trois fois (30 minutes chacun) dans le même tampon. Puis, on procède à une fixation ultérieure dans 1 % de tétroxyde d'osmium pendant 2 h ; les spécimens sont ensuite lavés trois fois (30 minutes chacun) dans de l'eau distillée. Suite à la déshydratation dans une série graduée d'acétone (30, 50, 70, 80, 90, 95 et 100 %),

* Auteur auquel doit être adressée toute correspondance.

ils sont séchés avec du CO₂ (l'appareil Polaron E 3000) et montés sur des talons en aluminium avec une bande adhésive à double face et enrobés de palladium ou (épaisseur de 350° A) dans un appareil JEOL, JFC 1100. Ils sont ensuite analysés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (JSF, 35-CF) à 15 KV. Cinq spécimens pour chaque partie des cinq larves différentes sont examinés. Les sensilles sont identifiées selon les définitions de Schneider (1964), McIver (1975) et Ramaswamy, S. B. (communication personnelle).

Les dimensions des sensilles sont déterminées en mesurant chaque sensille sur cinq spécimens.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'antenne et les sensilles antennaires :

Chaque antenne est une courte protubérance segmentée clairement divisible en scape (Sc) (375,00-383,00 µm de long et 250,00-266,00 µm de large), en pédicelle (pd) (610,00-616,66 µm de long et 160,00-166,66 µm de large) et en poils sensoriels (Sh) [(respectivement 193,00-833,00 µm de long et 2,30-7,80 µm de large) (les courts et les longs)] (Fig. 1A). La répartition numérique des diverses sensilles dans les segments antennaires est présentée dans le tableau I. Le bout apical franc de chaque antenne supporte un ensemble de récepteurs sensoriels, dont les deux poils sensoriels sont les plus visibles. Les poils sensoriels ont une surface fondamentalement lisse avec quelques striations pour donner un support structural.

En plus de ces poils sensoriels, le bout apical concave en forme de disque du pédicelle supporte certains cônes sensoriels de 11,66-13,33 µm de long et de 4,16-5,00 µm de diamètre (tableau I) dont les surfaces spongieuses sont perforées (Fig. 1B, C, Sb I) ; telles sont les caractéristiques typiques des chimiorécepteurs (Van der Pers et coll., 1980). Ce groupe de sensilles se trouve également sur les antennes de *Drosophila melanogaster* Meigen (Itoh et coll., 1991), les Tetrigidae (Orthoptera) (Bland, 1991), et également chez *Speonomus hydrophilus* Jeannel (Crouau et Crouau-Roy, 1991). Une autre protubérance cuticulaire ressemblant à un cône segmenté de 10,00-10,62 µm de long et de 5,25-5,62 µm de diamètre (tableau I) se remarque aussi sur le bout antennaire (Fig. 1C, Ss) à l'intérieur d'un pourtour en forme d'anneau (Fig. 1C*). Des excroissances similaires chez les larves héliothines sont appelées sensilles styloconica (Baker et coll., 1986). Des structures en forme de pointes plus petites (Fig. 1C, Sb II) visibles près du sensillum styloconicum de 2,50-3,10 µm de long et 1,80-2,50 µm de diamètre (tableau I) sont habituellement appelées pointes basiconiques chez les autres insectes (Bland, 1983). Devitt et Smith (1982) ont décrit des structures analogues sur le palpe de *Euxoa messoria* (Harris) simplement comme des "pointes" ayant des fonctions similaires à celles des sensilles basiconiques. A l'intérieur et autour de l'anneau du bout apical antennaire se trouvent quelques ouvertures cuticulaires et multicannelées (Fig. 1C, co, mo).

2. La structure de la maxille et de ses sensilles :

Chez *A. assama*, les maxilles appariées sont largement réduites (Fig. 2A) mais distinctement divisibles en cardo (Ca) (420,55-437,50 µm de long et 610,55-625,00 µm de large), en stipes (st) (240,00-250,00 µm de long et 330,50-337,50 µm de large), en galea ou lobe maxillaire (Ml) (60,00-65,00 µm de longueur et 80,00-85,00 µm de large à la base) et en palpe maxillaire (Mp) (100,00-110,00 µm de long et 79,50-82,50 µm de large). Elles sont enveloppées d'une cuticule molle en position dorsale du labre. Le palpe maxillaire est segmenté, mou, souple et arrondi, alors que le lobe est non segmenté et arrondi supportant les structures sensorielles apicales (Fig. 2B, C, D).

Des poils sensoriels striés (Sh) de 450,00-500,00 µm de long et 18,75-20,00 µm de diamètre liés aux cavités cuticulaires se trouvent sur la face intérieure du cardo et des stipes (Fig. 2A).

La Fig. 2E montre que les récepteurs sensoriels du palpe maxillaire, qui comprennent huit excroissances cuticulaires en forme de cône (Sb II) de 5,00-6,66 µm de long et 3,33-4,44 µm de diamètre (tableau II), semblent correspondre aux sensilles basiconiques chez d'autres lépidoptères pour agir comme des sensilles gustatives. Schoonhoven (1972) signale la présence de huit sensilles identiques sur chacun des palpes maxillaires de *Pieris brassicae* (L.). De la même façon, on sait que

le lobe maxillaire contient les sensilles styloconica (Fig. 2, Ss) (26,00-32,00 μm de long et 21,17-22,00 μm de diamètre) équivalentes à celles présentes sur la galea de *Heliothis virescens* (F.) (Baker et coll., 1986) accompagnées de certaines sensilles poilues (St) avec une tige fine arrondie distale (55,00-92,00 μm de long et 5,00-7,50 μm de diamètre ; tableau II). Les fonctions chimiosensorielles des sensilles maxillaires sont décrites chez les larves du *Bombyx mori* L. (Ishikawa, 1963, 1966). Cependant, un autre type de sensilles se trouve sur le lobe maxillaire, qui contrairement aux sensilles trichodea sont émoussées mais elles ne sont ni distales, ni arrondies (Fig. 2D, Sb III). Résultant d'une base légèrement surélevée, les sensilles de 46,00-62,00 μm de long et 7,00-7,50 μm de large sont, du point de vue de la structure, similaires aux longues sensilles basiconiques.

3. La structure du labium et de ses sensilles :

Le labium est réduit à une filière et à deux petits palpes de 130,00-133,33 μm de long et 45,00-50,00 μm de large. Chaque palpe labial non segmenté (Fig. 3, Lp) comporte deux sensilles de palpe labial (Fig. 3, Lp1, Lp2). La sensille du palpe latéral de 49,00-50,00 μm de long et 8,00-8,18 μm de large (tableau II) est plutôt cylindrique avec quelques excroissances et la sensille segmentée médiane (Lp1) comporte une base bulbeuse de 50,00-50,20 μm de long et 19,00-19,09 μm de diamètre. De tels récepteurs se remarquent également chez *Helicoverpa zea* Boddie et chez *H. virescens* (Baker et coll., 1986) et aussi chez *E. messoria* (Devitt et Smith, 1982). La base bulbeuse de la sensille des palpes labial et médian (Lp1) est munie de quelques ouvertures cuticulaires (Fig. 3B, co).

4. La structure de l'hypopharynx :

L'hypopharynx (Fig. 4A) est couvert de nombreuses structures ressemblant à des poils (Fig. 4, Gs) de 58,00-76,00 μm de long et 4,00-8,00 μm de diamètre à la base (tableau II), le long du tube digestif (Fc). Des structures similaires ressemblant à des poils le long du tube digestif chez d'autres larves de lépidoptères sont aussi des récepteurs gustatifs (Delhies et Kuch, 1971).

Six types de sensilles ont été identifiés sur les antennes et les divers appareils buccaux des larves de *A. assama* pour agir soit comme récepteurs mécaniques soit comme chimiorécepteurs, qui sont presque similaires à ceux décrits chez d'autres larves de lépidoptères. Les sensilles basiconiques ont été précédemment proposées pour remplir des fonctions thermoréceptives chez la puce adulte (Ritcey et McIver, 1990) et chez d'autres insectes. Par ailleurs, des chercheurs tels que Schoohoven (1967, 1972), Loftus et Corbiere-Tichane (1981) ont signalé que le sensillum styloconicum est réceptif à la température chez d'autres insectes lépidoptères, ce qui pourrait être également vrai chez les larves de *A. assama*. La sensille basiconique du bout antennaire et le palpe maxillaire sont des chimiorécepteurs chez les larves de *A. assama*.

EFFECTS OF FLUORIDE ON CHANGES OF CALCIUM, COPPER AND IRON LEVEL IN THE IMPORTANT ORGANS OF SILKWORM LARVAE (*BOMBYX MORI* L.)

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

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

*The effects of fluoride on changes of calcium, copper and iron content in different body parts were studied in the larvae of two silkworm (*Bombyx mori*) varieties, i. e. Zhenong 1 and Hang 8, by artificially adding NaF in mulberry leaves at the time of feeding, to investigate the mechanism of fluoride toxicity to silkworm larvae and fluoride resistant difference of different varieties. It was found that calcium content in the midgut tissues, fat body and integument increased as the fluorine concentration in food increased, and also increased as the time of fluoride administration lasted. There is a significant difference of calcium accumulation between two varieties, which was correspondence to the distribution of fluorine concentration in the organs of the two varieties. Changes of copper and iron content were not so significant as calcium, and also no significant relationship was observed between two varieties associated with excessive ingestion of fluoride. It was believed that calcium had a closest relation to the fluorosis of silkworm larvae and played an important role in the fluoride resistance of silkworm varieties.*

Keywords: Silkworm larvae, fluoride, calcium, copper, iron, toxicity mechanism.

INTRODUCTION

Fluoride toxicity on *Bombyx mori* has been extensively known in China in recent years. Researchers have paid extensive attention to breeding the highly fluoride resistant silkworm races, to develop antidotes to decrease the toxicity of fluoride on silkworm, and to study mechanism of fluoride toxicity to silkworm larvae. Previous papers have reported the effect of fluoride on growth, development and economic parameters in silkworm, fluoride loading and kinetic in different tissues of fluorosis silkworm (Chen, 1993, 1995). Animal studies showed that the alteration of metal element metabolism caused by extra fluoride absorption is one of the important causes of fluoride toxicity (Singh et Kanwar, 1981). Lin *et al.* (1994) and Chang (1995) have reported that fluoride restrained the Ca, Mg concentration in haemolymph after feeding fluoride added mulberry leaves. Whether the fluoride altered the physiologically essential metallic element metabolism in silkworm has not been reported. The present paper deals with the calcium, copper and iron element changes in three different tissues of two silkworm varieties by artificially adding fluoride. The objectives of this paper are to investigate changes in the level of Ca, Cu and Fe in the midgut, fat body and integument of silkworm following fluoride toxicity, and to elucidate the mechanism of silkworm fluorosis.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry leaves used in this investigation were soaked with 0, 30, 60, 120, 240, 480, 960mg kg⁻¹ NaF solutions for ten minutes, respectively, and then the treated leaves were dried at room temperature. As the leaves grown in the field have gradually accumulated atmospheric fluoride, their

soluble fluoride concentration varies with a variety of factors such as the age of leaf, atmospheric fluoride contents, etc. The fluoride concentrations of experimental leaves, including the control group and NaF-treated groups, were determined before feeding, the average fluorine concentrations of each treatment are: 33.9, 89.8, 115.4, 255.8, 361.9, 875.6 and 1150.7mg kg⁻¹ respectively.

Two silkworm varieties, Zhenong 1 (Chinese bivoltine, highly resistant to fluoride pollution) and Hang 8 (Japanese bivoltine, sensitive to fluoride pollution), were used in the present study. Fifth instar larvae were fed with NaF solution treated mulberry leaves from the first feeding for a period of 48 hours. Silkworm larvae were sampled for tissue dissection at intervals of 24, 48 and 96 hours after the first feeding, and the integument, midgut tissue and fat body were vivisectioned separately.

To analyze metal elements, a known amount of dried tissue is digested by HNO₃ and HClO₄ by appropriate dilution with deionized water. The solution was used for analysis with atomic absorption spectrophotometry (Hitachi 180-80 Atomic Absorption Spectrophotometer). All glassware and sampling bottles were cleaned in 20 % HNO₃ solution to remove all possible contamination. In addition, a blank was made in the same way as the tissue sample did so that to make the appropriate corrections.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Effect of Fluoride on calcium level in the important organs of silkworm larvae:

Fig. 1 showed the calcium level in midgut of fluorosis silkworm larvae. The results indicated that the calcium level in midgut tissue was increased as the fluoride concentrations in food increased, and also accelerated by the feeding duration of fluoride-treated leaves. It was reported that F⁻ with Ca²⁺ in cytoplasm could be combined to CaF₂ precipitate with very low solubility (Meng *et al.*, 1995). The increase of calcium concentration in midgut might be due to the extra fluorine absorbed from food constantly combined with the cytoplasm Ca²⁺ into calcium fluoride precipitation, as a result, cells have to keep on absorbing intercellular Ca²⁺ to maintain the vital level of intracellular Ca²⁺. This hypothesis gains support from our results as well as those of Mokrzynska and Machoy (1993), showing fluorine in combination with Ca²⁺. The role of Ca²⁺ and other cations in reducing fluoride toxicity in cattle, sheep and rabbits are also well established (Kessabl *et al.*, 1988; Tsuchida and Yanagisawa, 1985).

Moreover, there is a significant difference in calcium level changes between two different silkworm varieties. As we can see by comparing two varieties in fig. 1, the highly fluoride resistant variety, Zhenong 1, accumulated more calcium than the low fluoride resistant variety Hang 8. And calcium concentration in low fluoride resistant variety, Hang 8, was significantly increased within the treatment groups of relatively low fluoride concentration (under 255.8mg kg⁻¹), while the calcium accumulation did not show significant increase in the treatments of high fluoride concentration (over 361.9mg kg⁻¹). However, the calcium accumulation of highly fluoride resistant variety, Zhenong 1, was slowly increased in low concentration fluoride treated groups, then it was rapidly increased in high concentration fluoride treated groups. This might suggest that the difference of calcium accumulation in midgut of fluorosis silkworm larvae was an important fact which caused the fluoride resistant difference of different silkworm varieties. Because CaF₂ is not toxic to silkworm, the higher calcium accumulation in tissues meant that more calcium could combine with fluoride to reduce the concentration of active fluorine ion in tissues, as a result, alleviated the toxicity of fluoride to silkworm.

Changes of calcium level in fat body were quite different. As shown in fig. 2, three curves of Zhenong 1 are very close, that is, the concentration of calcium in the fat body increased as the increase of fluorine concentration in mulberry leaves, but did not change as the time of fluoride administration lasted, however it decreased after the stop of fluoride oral administration. Nevertheless, change of calcium level in fat body of Hang 8 is vigorous, the tendency is: it was increased as the increase of fluorine concentration in the food: fluorine concentration sampled at 24 > hours > 48 hours > 96 hours,

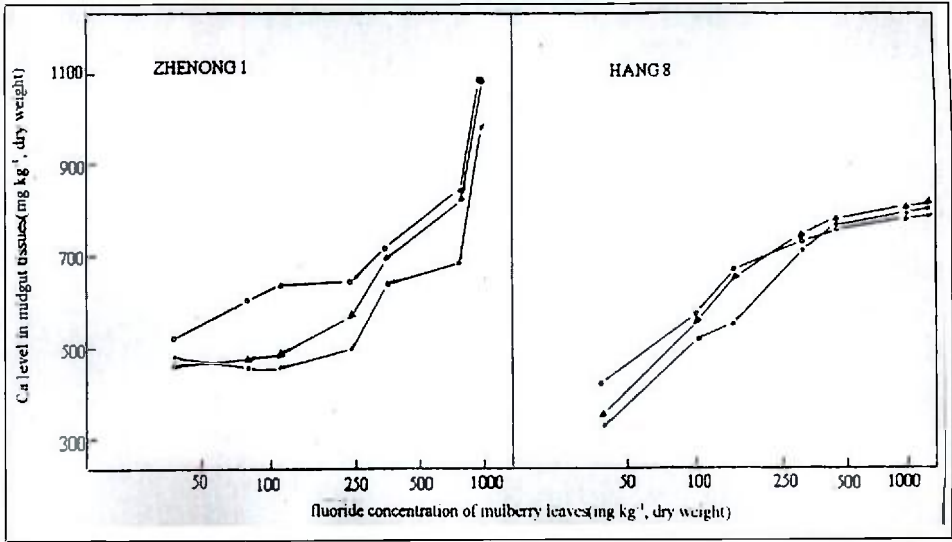


Fig. 1. Changes of Ca content in midgut tissues of fluorosis silkworm

Fig. 1. Changements du contenu en Ca dans les tissus de l'intestin moyen du ver à soie fluorosé.

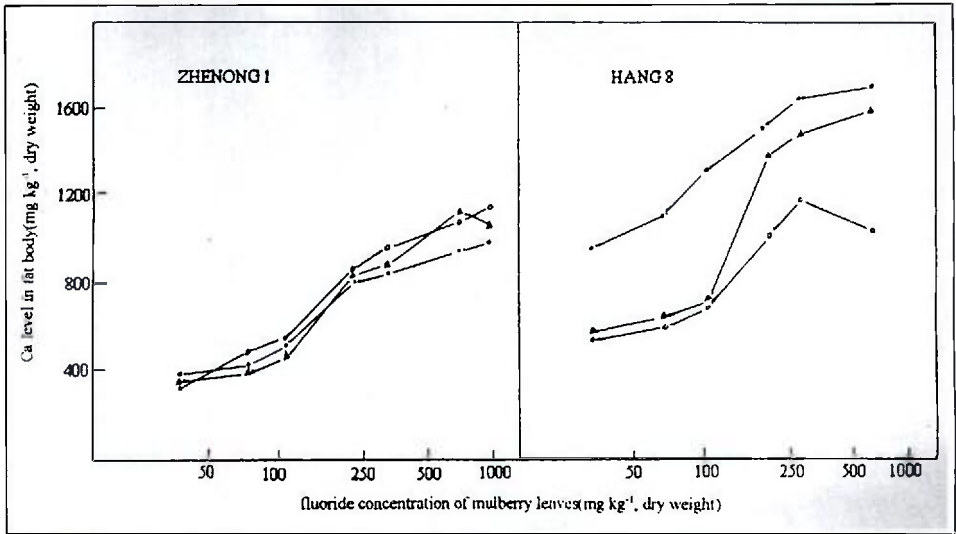


Fig. 2. Changes of Ca content in fat body of fluorosis silkworm.

Fig. 2. Changements du contenu en Ca dans le corps gras du ver à soie fluorosé.

In all the fig:

- 24 hr fluoride administrated group / Groupe auquel le fluor est administré pendant 24 hr.
- 48 hr fluoride administrated group / Groupe auquel le fluor est administré pendant 48 hr.
- △—△ 96hr fluoride administrated group / Groupe auquel le fluor est administré pendant 96 hr.

especially the 24 hour sample is significantly higher than the other two. Furthermore, calcium content in fat body of Hang 8 was much higher than that of Zhenong 1, that is consistent with the distribution of fluorine concentration (Chen, 1995), which suggested the possible relation of calcium accumulation and fluorine absorption in the fat body of silkworm. In the curve of samples taken from the fluoride treatment of 96 hours after the first feeding, the drop down of calcium level at the point of top fluorine concentration in the food was to be explained by further experiment.

Integument was observed to be maximally calcium concentrating organ, which is greatly increased

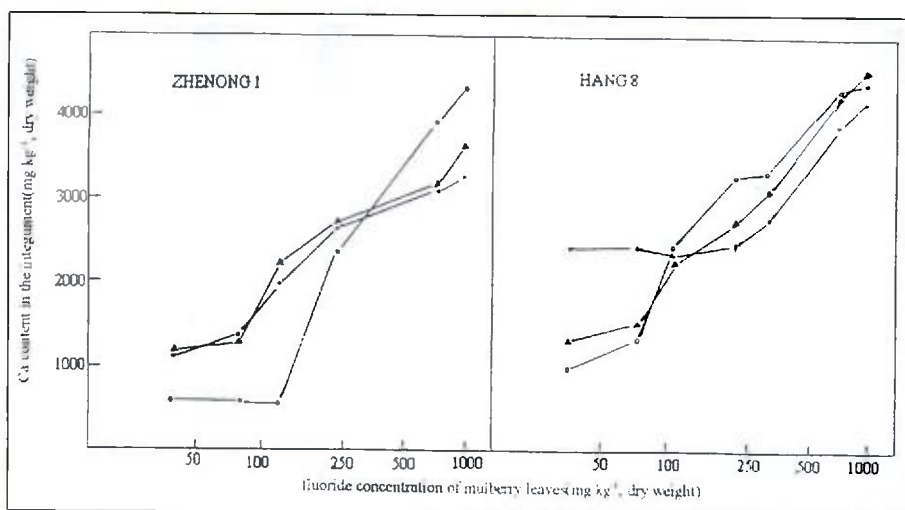


Fig. 3. Changes of Ca content in the integument of fluorosis silkworm.

Fig. 3. Changements du contenu en Ca dans le tégument du ver à soie fluorosé.

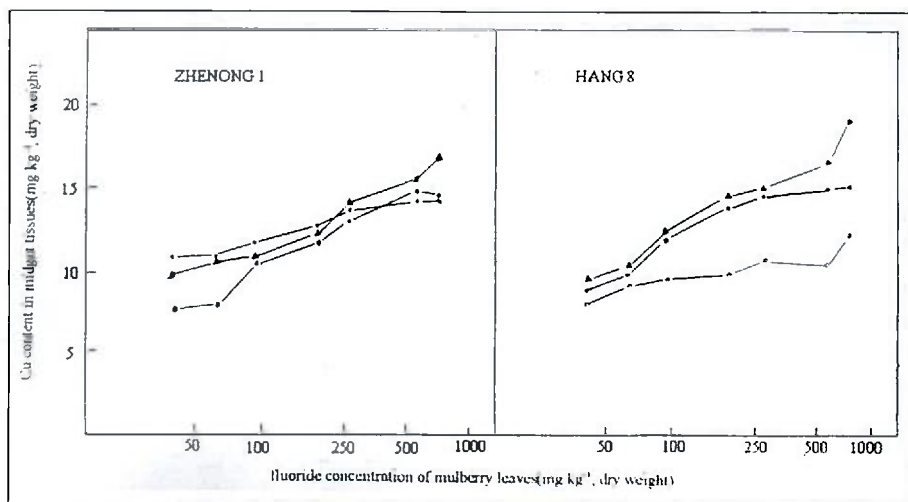


Fig. 4. Effect of fluoride on Cu content in midgut tissues of silkworm larvae.

Fig. 4. Effet du fluorure sur le contenu en Cu de l'intestin moyen des larves du ver à soie.

as the fluoride in mulberry increased, shown in fig. 3. It is well known that calcium is the activator of muscle contraction. The increase of fluorine absorption in integument would be bound to deposit Ca^{2+} and decrease the active Ca^{2+} , thus accelerate the further absorption of free calcium in order to ensure the normal physical function, this returned to accumulate higher calcium fluoride deposition, therefore the total calcium concentration in the integument was greatly increased.

2. Changes of copper concentration in different organs of silkworm larvae following fluoride administration:

Generally to say, the copper content in different tissues of silkworm larvae is much lower than calcium, and its change following fluoride toxicity is also less significant than calcium. Fig. 4, 5, 6 showed that copper content in midgut of fluorosis silkworm was slightly increased, while copper content in the fat body was significantly increased as the fluoride concentration in the food increased, but its content in the integument was very stable, stayed within 4-6ppm. And there is no difference between the two tested varieties. Based on the above result, it comes to the conclusion that effect of fluoride on the alteration of copper concentration was very pronounced in fat body, not important in midgut, no affect in integument, and there was no relationship between change of copper content following fluoride toxicity and fluoride resistant ability of silkworm varieties.

It is known that copper is a physiologically essential metallic element of many enzyme activity, such as polyphenol oxidase. Fat body is a middle metabolism organ and energy source, in which biological oxidation-reduction occurred. Therefore, fat body is the most important organ for effect of fluoride on copper metabolism in different organs of silkworm larvae.

3. Effects of fluoride on changes of Iron content in different organs of silkworm larvae:

Changes of iron content following fluoride toxicity are shown in fig. 7, 8 and 9. Results demonstrated that Fe levels in three organs were roughly increased when the fluoride concentration in mulberry increased. However the changes were not so significant and regular as those of calcium and copper, especially in the low fluoride concentration treated groups, the Fe level had no obvious increase as the increase of fluoride concentration in the food. And in high fluoride treated groups, the Fe level increased significantly as the increase of fluoride concentration in the food, especially in fat body tissues. There was no obvious difference in the effect of fluoride on Fe level between two silkworm varieties, which indicated that Fe level change was not related to the fluoride resistant ability of different silkworm varieties.

Iron is the activator of many enzymes such as Cytochrome, Cytochrom oxidase, and peroxidase which depend on the valence change of iron ion to carry out oxidation-reduction reaction and electron transfer. Therefore, the fact that the effect of fluoride toxicity on iron level was mainly on the fat body can be explained here.

It was demonstrated that excessive fluoride could interact with and alter the metabolism of Ca, Mg, Cu, Mn and Fe (Guo, 1990), but no report on effect of excessive fluoride on physiologically essential metallic element in fluorosis silkworm larvae. Based on the above studies, the author came to the conclusion that excessive fluoride altered Ca, Cu and Fe metabolism in silkworm tissues, which was believed to be one of fluoride toxicity mechanisms to silkworm, and the difference of calcium level change between different varieties was related to the fluoride resistant ability of silkworm larvae.

By analysis on the changes of these three elements in different organs of fluorosis silkworm, it was found that the total calcium level in silkworm tissues was higher than total copper and iron, excessive fluoride had much greater effect on calcium level than the other two, and only calcium level change showed significant difference between silkworm varieties with different fluoride resistant ability. At the same time, the effect of excessive fluoride on calcium occurred in low fluoride concentration but on Cu and Fe mainly occurred in high fluoride concentration. Therefore, it was believed that calcium had the closest relation to the detrimental effects of excessive fluoride on the silkworm.

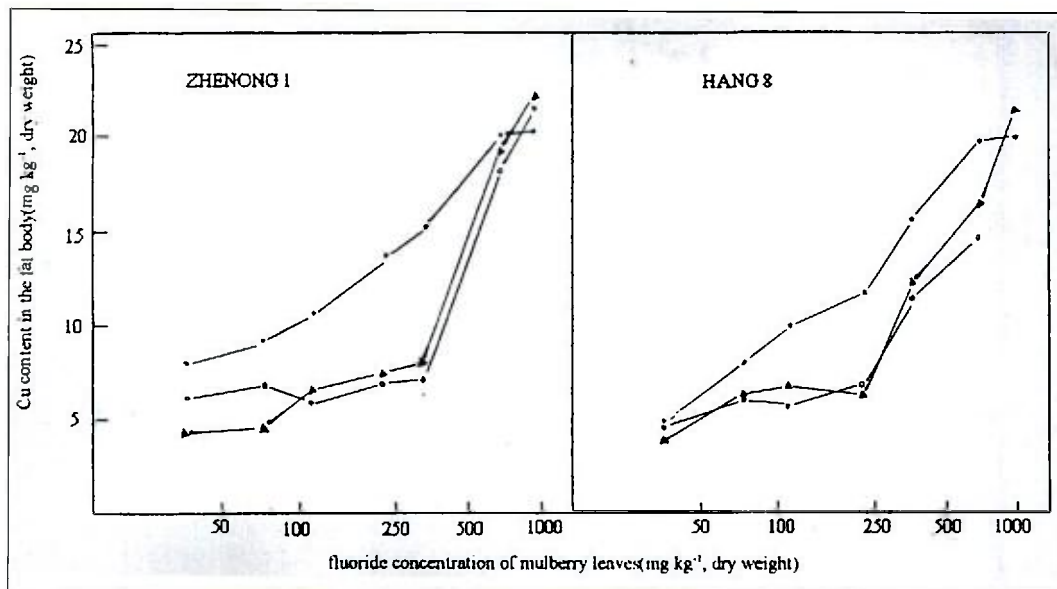


Fig. 5. Effect of fluoride on Cu content in fat body of silkworm larvae.

Fig. 5. Effet du fluorure sur le contenu en Cu du corps gras des larves du ver à soie.

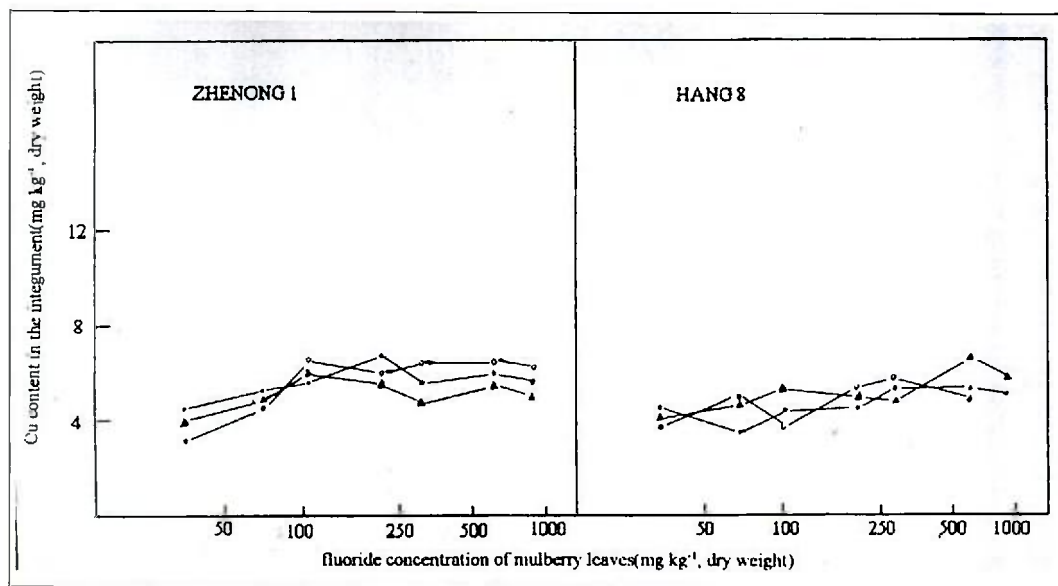


Fig. 6. Effect of fluoride on Cu content in the integument of silkworm larvae.

Fig. 6. Effet du fluorure sur le contenu en Cu de l'intestin moyen des larves du ver à soie.

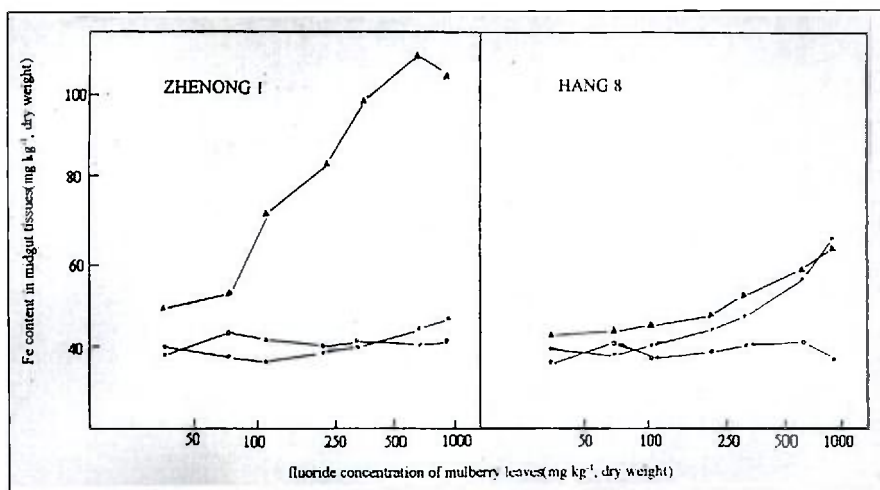


Fig. 7. Relation of fluoride concentration in the food and Fe content in midgut tissues of silkworm larvae.

Fig. 7. Relation entre la concentration de fluorure dans l'alimentation et le contenu en Fe des tissus de l'intestin moyen des larves du ver à soie.

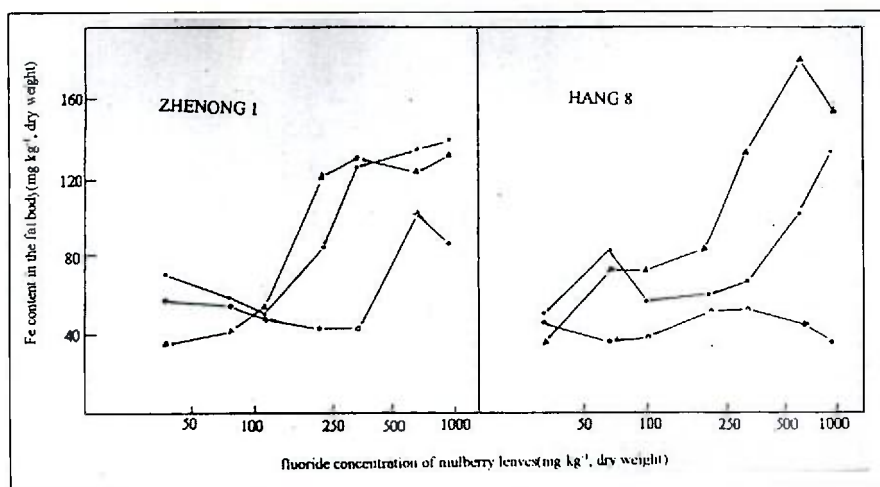
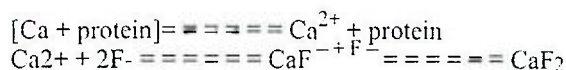


Fig. 8. Relation of fluoride concentration in the food and Fe content in fat body of silkworm larvae.

Fig. 8. Relation entre la concentration de fluorure dans l'alimentation et le contenu en Fe du corps gras des larves du ver à soie.

It is known that calcium plays a very important effect in animal physiological activity and takes a second message effect. Owing to the affinity of Ca^{2+} , excessive fluoride formed innocuous complex — CaF_2 precipitate with Ca^{2+} by following model:



On the one hand, this would alleviate the toxicity of F^- to the cell, but, on the other hand, the calcium ion deprivation in cell matrix would result in detachment of cell. In addition, calcium ion is the activator of producing muscle contraction. When free calcium ion was precipitated by fluoride, the muscle contraction would be hindered. One of the symptoms of fluorosis silkworm larvae was inactivity and sluggish, which was suggestive of weakened muscle contraction because of the free Ca^{2+} depletion in the cytoplasm. It was discovered that free Ca^{2+} decreased and total calcium content increased in midgut cells in vitro with the increase of fluoride concentration added (Meng *et al.*, 1995), which indicated that midgut cells had to absorb more free Ca^{2+} in order to maintain necessary Ca^{2+} level for the normal physical function. The studies on man and rabbit also showed decrease of Ca^{2+} in blood serum as the fluoride increased. Therefore, the Ca^{2+} depletion observed in tissues following fluoridation seems to be of great physiological significance and can be related to varied pathological changes reported following fluorosis.

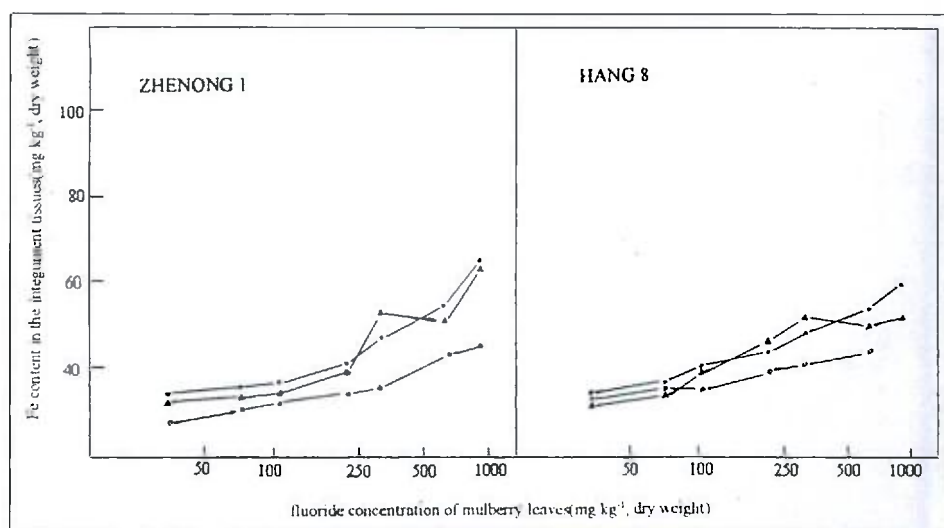


Fig. 9. Relation of fluoride concentration in the food and Fe content in the integument of silkworm larvae.

Fig. 9. Relation entre la concentration de fluorure dans l'alimentation et le contenu en Fe du tégument des larves du ver à soie.

As for the Cu and Fe, they are not only important micronutrients of animals, but also play important effect in cell function. The Cu and Fe level changes in tissues would result in impairing cell metabolism related with Cu and Fe, hence causing fluorosis.

It is also well known that Ca, Cu and Fe are the constituents and activators of many enzymes, such as peptidase, alpha-amylases, phosphatase, ATPase. The alteration of Ca, Cu and Fe level caused by fluoride would affect the enzyme activity related with these elements. Biochemical studies on fluorosis

silkworm demonstrated that many kinds of enzyme activity of silkworm in midgut were inhibited (Lin *et al.*, 1994; Guan, 1991).

From the point of alleviating fluorine ion toxicity to cells, the formation of CaF_2 precipitation could be considered to be a solution for precaution and cure of fluorosis silkworm larvae since non-ionic fluoride (CaF_2) did not have any biological activity, which is not toxic to silkworm (Chen, 1987). It was reported that the administration of calcium compounds in the food of domestic animals can ease up the fluoride toxicity caused by fluoride pollution. That the practical application by spraying fresh limewash on fluoride contaminated mulberry leaves had also demonstrated positive effect. The hypothesis of limewash function was that the active Ca^{2+} from the fresh limewash could form CaF_2 precipitation with superficial fluorine ion on the mulberry leaves, so that the fluorine ion concentration was greatly decreased in mulberry leaves silkworm ingested; moreover, extra Ca^{2+} from limewash will supply Ca^{2+} resource in tissues. However, because of the strong alkaline of limewash and the difficulty of controlling active concentration, it could not only destroy the nutritive quality of mulberry leaves and silk quality, but the detoxication effect was unstable as well. The authors suggested that developing some neutral calcium compound or organic calcium compounds might be the direction to explore the effective antidotes to the precaution and cure of fluorosis silkworm.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the International Foundation for Science for funding this research.

REFERENCES

- CHANG R.-C. (1995) Change of pH value and calcium ion concentration in haemolymph of the toxicated silkworm larvae by fluoride. *Bulletin of Sericulture*, 26(2), 14-15.
- CHEN Z.-W. (1989) Some physiological and biochemical changes of fluorosis silkworm, *Bombyx mori* L., *Acta Sericologia Sinica*, 13, 164-168.
- CHEN Y.-Y. (1993) Changes in fluoride and calcium ion concentration in the blood of the fluorosis affected silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 33, 153-157.
- CHEN Y.-Y., WU Y.-C. (1995) Fluoride loading and kinetics in different tissues of larvae of fluorosis silkworm (*Bombyx mori* L.). *Sericologia*, 34, 1-10.
- GUAN Z.-Z. (1991) An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Chinese J. Preventive Medicine*, 25(1), 33-35.
- GUOL.-T. (1990) Determination of Ca, Mg, Cu, Fe and Zn in serum by atom absorption spectrometer. *Chinese J. Environment and Health*, 7, 174-175.
- KESSABL M., HAMLIRI A., BRAUN J. P. (1988) Experimental fluorosis in sheep: fluoride kinetics and alleviating effects of aluminium sulfate. *Fluoride*, 21, 193-200.
- LIN J.-R., SHI Y.-S., LU R.-C., LIN L., ZHONG S.-Q. (1994) Effects of fluoride on the enzyme activities and contents of calcium and magnesium ions in haemolymph of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologia Sinica*, 20, 115-118.
- MENG Z.-Q., LU Y.-Y., BANNO Y., KOGA K., KAWAGUCHI Y. (1995) Effects of NaF on the calcium ion concentration in isolated midgut cells of *Bombyx mori*. *J. Japanese Sericulture*, 63, 310-314.
- TSUCHIDA M., YANAGISAWA F. (1985) Effect of fluoride on rabbits fed low calcium. *Fluoride*, 18, 41-46.
- MOKRZYNSLA A. M., MACHOY Z. (1993) Another look at the interaction of fluoride with calcium. *Fluoride*, 29, 143-148.
- SINGH M., KANWAR K. C. (1981) Effect of fluoride on copper, manganese and zinc in bone and kidney. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26, 428-431.

EFFETS DU FLUORURE SUR LES CHANGEMENTS DU NIVEAU DE CALCIUM, DE CUIVRE ET DE FER DANS LES ORGANES ESSENTIELS DES LARVES DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.)

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

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

*Les effets du fluorure sur les changements du contenu en calcium, cuivre et fer dans les différentes parties du corps ont été étudiés chez les larves de deux variétés du ver à soie (*Bombyx mori*), c'est-à-dire Zhenong 1 et Hang 8, en ajoutant de façon artificielle du NaF sur les feuilles de mûrier au moment du nourrissage, pour étudier le mécanisme de la toxicité du fluorure chez les larves du ver à soie et la différence de résistance au fluorure des différentes variétés. On sait que le contenu en calcium dans les tissus de l'intestin moyen, le corps gras et le tégument augmente quand la concentration en fluor dans l'alimentation augmente, et s'accroît aussi pendant la durée d'administration du fluorure. Il existe une différence significative dans l'accumulation du calcium entre les deux variétés, ce qui correspond à la distribution de la concentration de fluor dans les organes des deux variétés. Les changements de concentrations en cuivre et en fer ne sont pas aussi significatifs que celles du calcium. De même, aucune relation importante n'est observée entre les deux variétés associée à l'ingestion excessive de fluorure. Nous pensons que le calcium a une relation plus étroite avec la fluorose des larves du ver à soie et joue un rôle important dans la résistance au fluorure des variétés de vers à soie.*

INTRODUCTION

La toxicité du fluorure pour *Bombyx mori* a été constatée de façon considérable en Chine depuis quelques années. Les chercheurs ont porté une grande attention à la sélection de races de vers à soie résistants à une grande quantité de fluorure, au développement d'antidotes pour diminuer la toxicité du fluorure chez le ver à soie, et à l'étude du mécanisme de toxicité du fluorure chez les larves du ver à soie. Des articles antérieurs ont montré l'effet du fluorure sur la croissance, le développement et les paramètres économiques chez le ver à soie, le chargement de fluorure et la cinétique dans les différents tissus du ver à soie fluorosé (Chen, 1993, 1995). Des études ont montré que l'altération du métabolisme des métaux provoquée par l'absorption de fluorure supplémentaire est une des causes importantes de la toxicité du fluorure chez les animaux (Singh et Kanwar, 1981). Lin et coll. (1994) et Chang (1995) ont rapporté que le fluorure entraîne la diminution de la concentration de Ca et de Mg dans l'hémolymph après avoir nourri les animaux avec des feuilles de mûrier contenant du fluorure. On n'a pas signalé que le fluorure modifie le métabolisme essentiel des métaux chez le ver à soie. Cet article traite des changements en éléments calcium, cuivre et fer dans trois tissus différents de deux variétés de ver à soie en ajoutant du fluorure de façon artificielle. Cet article a pour but d'examiner les changements du niveau de Ca, Cu et Fe dans l'intestin moyen, le corps gras et le tégument du ver à soie suivant la toxicité du fluorure, et d'élucider le mécanisme de la fluorose chez le ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles de mûrier utilisées dans cette étude sont trempées dans des solutions de 0, 30, 60, 120, 240, 480 et 960 mg kg⁻¹ de NaF pendant dix minutes, respectivement ; ensuite les feuilles traitées sont séchées à température ambiante. Comme les feuilles ont accumulé peu à peu du fluorure atmosphérique, leur concentration en fluorure soluble varie en fonction de divers facteurs tels que l'âge de la feuille, les concentrations en fluorure atmosphérique, etc. Les concentrations en fluorure des feuilles expérimentales, y compris le groupe témoin et les groupes traités au NaF, sont déterminées avant le nourrissage, les concentrations moyennes en fluor de chaque traitement sont : 33,9 ; 89,8 ; 115,4 ; 255,8 ; 361,9 ; 875,6 et 1150,7mg kg⁻¹ respectivement.

Deux variétés de vers à soie, Zhenong 1 (bivoltin chinois, très résistant à la pollution au fluor) et Hang 8 (bivoltin japonais, sensible à la pollution au fluorure), sont utilisées dans cette étude. Les larves du cinquième âge sont nourries avec des feuilles de mûrier traitées avec une solution de NaF à partir du premier nourrissage pendant 48 heures. Des échantillons de larves de vers à soie sont prélevés pour la dissection des tissus à des intervalles de 24, 48 et 96 heures après le premier nourrissage, et on a pratiqué des dissections séparées du tégument, du tissu de l'intestin moyen et du corps gras.

Afin d'analyser les éléments métalliques, une quantité connue de tissu séché est digérée par HNO₃ et HClO₄ par une dilution appropriée avec de l'eau déionisée. La solution est utilisée pour l'analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique (spectrophotomètre d'absorption atomique Hitachi 180-80). Tous les matériels de verre et les bouteilles prises pour les échantillons sont nettoyés dans une solution à 20 % de HNO₃ pour enlever toute contamination possible. De plus, un blanc a été fait de la même façon que l'échantillon de tissu de façon à faire les corrections appropriées.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Effet du Fluorure sur le niveau de calcium dans les organes importants des larves du ver à soie :

La figure 1 montre le niveau de calcium dans l'intestin moyen des larves de ver à soie fluorosé. Les résultats indiquent que le niveau de calcium dans l'intestin moyen est augmenté lorsque les concentrations de fluorure dans l'alimentation augmentent, et est aussi accéléré par la durée d'alimentation avec des feuilles traitées au fluorure. On a rapporté que le F⁻ avec Ca²⁺ pourrait être combiné dans le cytoplasme et donner un précipité CaF₂ avec une solubilité très faible (Meng et coll., 1995). L'accroissement de la concentration en calcium dans l'intestin moyen pourrait être dû au fluor supplémentaire absorbé à partir de la nourriture constamment combiné avec le Ca²⁺ du cytoplasme en précipité de fluorure de calcium, et ainsi, les cellules doivent sans cesse absorber le Ca²⁺ intracellulaire pour maintenir le niveau vital du Ca²⁺ intracellulaire. Cette hypothèse corrobore nos résultats ainsi que ceux de Mokrzynska et Machoy (1993), présentant la combinaison du fluor avec le Ca²⁺. Le rôle du Ca²⁺ et d'autres cations dans la réduction de la toxicité du fluorure chez le bétail, les moutons et les lapins est bien établi (Kessabi et coll., 1988 ; Tsuchida et Yanagisawa, 1985).

De plus, il existe une différence significative dans les changements de concentration en calcium entre les deux variétés de vers à soie. Comme on peut le voir en comparant les deux variétés dans la figure 1, la variété hautement résistante au fluorure, Zhenong 1, a accumulé plus de calcium que la variété Hang 8 peu résistante au fluorure. Et la concentration de calcium dans la variété faiblement résistante au fluorure, Hang 8, a été augmenté de façon significative à l'intérieur des groupes de traitement à concentration de fluorure relativement faible (au-dessous de 255,8mg kg⁻¹), alors que l'accumulation de calcium ne montre pas d'augmentation significative dans les traitements à concentration de fluorure élevée (au-dessus de 361,9mg kg⁻¹). De plus, l'accumulation de calcium chez la variété hautement résistante au fluorure, Zhenong 1, est lente dans les groupes traités au fluorure à faibles concentrations, et elle est rapide chez les groupes traités aux fortes concentrations de fluorure. Cela pourrait signifier que la différence d'accumulation de calcium dans l'intestin moyen

des larves du ver à soie fluorosé est un facteur important qui provoque la différence de résistance au fluorure des différentes variétés de vers à soie. Parce que CaF_2 n'est pas toxique pour le ver à soie, l'accumulation importante de calcium dans les tissus signifierait que plus de calcium pourrait se combiner avec du fluorure pour réduire la concentration de l'ion fluor actif dans les tissus, et par conséquent, diminuerait la toxicité du fluorure chez le ver à soie.

Les changements du niveau de calcium dans le corps gras sont assez différents. Comme le montre la figure 2, les trois courbes de Zhenong 1 sont très proches ; il s'agit de la concentration en calcium dans le corps gras qui augmente en même temps que l'accroissement de la concentration en fluorure dans les feuilles de mûrier mais ne varie pas pendant la durée de l'administration de fluorure, cependant elle baisse après l'arrêt de l'administration orale du fluorure. Néanmoins, le changement du niveau de calcium dans le corps gras de Hang 8 est important, la tendance est : il est augmenté par l'accroissement de la concentration en fluor dans l'alimentation : les concentrations en fluor trouvées sur les échantillons sont dans l'ordre suivant : 24 heures > 48 heures > 96 heures, en particulier l'échantillon de 24 heures est sensiblement plus élevé que les deux autres. En outre, le contenu en calcium dans le corps gras de Hang 8 est beaucoup plus élevé que dans celui de Zhenong 1, ce qui correspond avec la distribution de la concentration en fluor (Chen, 1995), et ce qui évoque la relation possible entre l'accumulation du calcium et l'absorption du fluor dans le corps gras du ver à soie. Dans la courbe des échantillons ayant subi un traitement au fluor 96 heures après le premier nourrissage, la baisse du niveau de calcium pour la concentration maximale en fluor dans l'alimentation doit être expliquée par d'autres expériences.

On observe que le tégument est un organe de concentration maximale en calcium, qui est augmenté de façon considérable lorsque que le fluorure dans le mûrier augmente, comme le montre la figure 3. On sait bien que le calcium est l'activateur de la contraction musculaire. L'accroissement de l'absorption de fluor dans le tégument déposerait inévitablement du Ca^{2+} et diminuerait le Ca^{2+} actif, et accélérerait ainsi l'absorption complémentaire de calcium libre afin d'assurer la fonction physique normale : cela revient à accumuler un précipité de fluorure de calcium plus élevé, par conséquent la concentration totale en calcium dans le tégument est augmentée de façon accrue.

2. Changements de la concentration de cuivre dans les différents organes des larves du ver à soie suivant l'administration du fluorure :

D'une manière générale, le contenu en cuivre dans différents tissus des larves du ver à soie est beaucoup plus faible que celui du calcium, et sa variation en fonction de la toxicité au fluorure est aussi moins significative que celle du calcium. Les figures 4, 5 et 6 montrent que le titre en cuivre dans l'intestin moyen du ver à soie fluorosé est légèrement accru, alors que le contenu en cuivre dans le corps gras est accru de façon significative quand la concentration en fluorure dans l'alimentation augmente, mais son niveau dans le tégument est très stable, entre 4 et 6 ppm. De plus, il n'existe aucune différence entre les deux variétés testées. Selon le résultat, on peut conclure que l'effet du fluorure sur la modification de la concentration de cuivre est très prononcé dans le corps gras, peu important dans l'intestin moyen, n'affecte pas le tégument, et il n'y a pas de relation entre le changement du contenu en cuivre et la quantité de fluorure et la capacité de résistance au fluorure des variétés de vers à soie.

On sait que le cuivre est un élément métallique physiologiquement essentiel de l'activité de beaucoup d'enzymes, tel que la polyphénol oxydase. Le corps gras est un organe du métabolisme moyen et une source d'énergie, dans laquelle l'oxydoréduction biologique se produit. Par conséquent, le corps gras est l'organe le plus important pour l'effet du fluorure sur le métabolisme du cuivre dans différents organes des larves du ver à soie.

3. Effets du fluorure sur les changements du contenu en fer dans les différents organes des larves du ver à soie :

Les figures 7, 8 et 9 montrent les changements du contenu en fer suivant la toxicité au fluorure. Les résultats montrent que les niveaux de Fe dans les trois organes sont augmentés brusquement avec

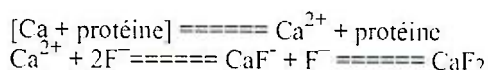
la concentration de fluorure dans le mûrier. Néanmoins, les changements ne sont pas si significatifs et réguliers comme ceux du calcium et du cuivre, en particulier dans les groupes traités avec une concentration de fluorure faible, le niveau de Fe ne présente aucune augmentation visible alors que la concentration de fluorure dans l'alimentation augmente. De plus, dans les groupes traités avec des quantités élevées de fluorure, le niveau de Fe augmente de façon significative avec la concentration de fluorure dans l'alimentation, en particulier dans les tissus du corps gras. Il n'existe aucune différence manifeste dans l'effet du fluorure sur le niveau de Fe entre les deux variétés de vers à soie, ce qui indique que le changement du niveau de Fe ne se rapporte pas à la capacité de résistance au fluorure des différentes variétés de vers à soie.

Le fer est l'activateur de nombreux enzymes tels que la Cytochrome oxydase, et la peroxydase qui dépendent du changement de valence de l'ion fer pour effectuer la réaction d'oxydoréduction et le transfert d'électrons. Par conséquent, on peut expliquer ici que l'effet de la toxicité du fluorure sur le niveau du fer se trouve principalement sur le corps gras.

Il a été démontré qu'un excès de fluorure pourrait interagir avec et modifier le métabolisme de Ca, Mg, Cu, Mn et Fe (Guo, 1990), mais aucun rapport n'a été publié sur l'effet d'un excès de fluorure sur les métaux physiologiquement essentiels chez les larves du ver à soie fluorosé. Basé sur les études ci-dessus, nous concluons qu'un excès de fluorure modifie le métabolisme de Ca, Cu et Fe dans les tissus du ver à soie, ce qui peut être un des mécanismes de la toxicité du fluorure chez le ver à soie, et la différence du changement du niveau de calcium entre les diverses variétés a un rapport avec la capacité de résistance au fluorure des larves du ver à soie.

Grâce à des analyses sur les changements de ces trois éléments dans les différents organes du ver à soie fluorosé, on a découvert que le niveau de calcium total dans les tissus du ver à soie est plus élevé que la totalité de cuivre et de fer, un excès de fluorure ayant un effet beaucoup plus grand sur le niveau du calcium que sur les deux autres, et seul le changement du niveau du calcium montre une différence significative entre les variétés de vers à soie ayant une capacité de résistance au fluorure différente. En même temps, l'effet d'un excès de fluorure sur le calcium se produit pour une faible concentration de fluorure mais sur Cu et Fe l'effet est visible pour des concentrations de fluorure élevées. On peut donc penser que le calcium a une relation plus étroite avec les effets nocifs d'un excès de fluorure chez le ver à soie.

On sait que le calcium a un effet considérable dans l'activité physiologique animale et a un effet secondaire de messenger. A cause de l'affinité du Ca^{2+} , l'excès de fluorure forme un complexe inoffensif (précipité de CaF_2 avec du Ca^{2+}) suivant le modèle :



D'un côté, cela allégerait la toxicité de F^- pour la cellule, mais, d'un autre côté, la privation de l'ion calcium dans la matrice cellulaire entraînerait le détachement de la cellule. De plus, l'ion calcium est l'activateur de la contraction musculaire. Lorsque l'ion calcium libre est précipité par le fluorure, la contraction musculaire serait gênée. Un des symptômes des larves du ver à soie fluorosé est l'inactivité et l'inertie, ce qui évoque l'idée d'une contraction musculaire affaiblie à cause de la déplétion du Ca^{2+} libre dans le cytoplasme. On a découvert que le Ca^{2+} libre diminuait et que le calcium total augmentait in vitro dans les cellules de l'intestin moyen avec l'accroissement de la concentration de fluorure ajoutée (Meng et coll., 1995), ce qui signifie que les cellules de l'intestin moyen ont dû absorber plus de Ca^{2+} libre afin de maintenir le niveau de Ca^{2+} nécessaire pour la fonction physique normale. Les études sur l'homme et le lapin ont aussi montré une baisse de Ca^{2+} dans le sérum sanguin lorsque le fluorure augmente. La déplétion de Ca^{2+} ainsi observée dans les tissus suivant la fluoration semble être d'une grande signification physiologique et peut avoir un rapport avec les changements pathologiques divers observés après fluorose.

En ce qui concerne le Cu et le Fe, ils ne sont pas seulement des substances micronutritives d'animaux, mais ont aussi un effet considérable dans la fonction cellulaire. Les changements du niveau

de Cu et Fe dans les tissus entraîneraient un affaiblissement du métabolisme cellulaire lié au Cu et au Fe, provoquant ainsi la fluorose.

On sait aussi que Ca, Cu et Fe sont des constituants et des activateurs de nombreuses enzymes telles que la peptidase, les alpha-amylases, la phosphatase, l'ATPase. La modification du niveau de Ca, Cu et Fe causée par le fluorure affecterait l'activité enzymatique relative à ces éléments. Des études biochimiques sur le ver à soie fluorosé ont démontré que plusieurs sortes d'activités enzymatiques du ver à soie dans l'intestin moyen sont inhibées (Lin et coll., 1994 ; Guan, 1991).

Si l'on considère l'allègement de la toxicité de l'ion fluor pour les cellules, la formation d'un précipité de CaF_2 pourrait être considérée comme une solution pour la défense et la guérison des larves de ver à soie fluorosées puisque le fluorure non-ionique (CaF_2) n'a aucune activité biologique, ce qui n'est pas toxique pour le ver à soie (Chen, 1987). On a rapporté que l'administration de composés de calcium dans l'alimentation des animaux domestiques peut soulager la toxicité par le fluorure provoquée par la pollution. L'application pratique consistant à vaporiser de la chaux fraîche sur les feuilles de mûrier contaminées au fluorure a également montré un effet positif. L'hypothèse de la fonction de la chaux est que le Ca^{2+} actif de la chaux fraîche pourrait former le précipité de CaF_2 avec l'ion fluor superficiel sur les feuilles de mûrier, afin que la concentration de l'ion fluor soit diminuée de façon considérable chez le ver à soie qui a ingéré des feuilles de mûrier ; par ailleurs, le supplément de Ca^{2+} de la chaux fournira des ressources en Ca^{2+} dans les tissus. Cependant, à cause de la forte alcalinité de la chaux et la difficulté à contrôler la concentration active, on ne pourrait non seulement détruire la qualité nutritive des feuilles de mûrier et la qualité de la soie, mais l'effet de détoxification serait également inégal. Les auteurs suggèrent que le développement de quelques composés de calcium neutres ou des composés de calcium organiques pourrait être la voie pour explorer les antidotes efficaces pour la prévention et la guérison de la fluorose du ver à soie.

A COMPARATIVE STUDY ON THE EFFECTS OF DFB, BHC AND DDT ON THE UZI FLY, *EXORISTA SORBILLANS* (= *E. BOMBYCIS*) (DIPTERA : TACHINIDAE)

L. H. SHIVASHANKARAPPA & H. P. PUTTARAJU

Department of Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore 560 056, India.

To study their effects on the uzi fly, *Exorista sorbillans*, commercially available insecticides, i.e., DFB (Diflubenzuron), BHC (Benzenehexachloride) and DDT (Dichloro diphenyl trichloro ethane) were fed to these flies at concentrations of 0.02, 0.04, 0.06 and 0.1% of DDT in 8% glucose solution. Concentrations of 0.06 and 0.1% of BHC and 0.1% showed complete mortality. Concentrations of BHC and DDT lower than these resulted in a lower rate of mortality and the survivals exhibited partial sterility. On the other hand, DFB fed male and female flies did not show any adverse effects on longevity, vigour and sexual competitiveness. However, female flies with complete sterility at all DFB concentrations tested and male flies with partial sterility were recorded at 0.02 and 0.04% respectively. About 96% males sterility was recorded at 0.1% DFB.

Keywords: *Exorista sorbillans*, DFB, BHC, DDT, *Bombyx mori*, longevity, fecundity hatchability.

INTRODUCTION

The uzi fly, *Exorista sorbillans*, is a serious endoparasitoid of the silkworm, *Bombyx mori*, causing great damage to the silk industry in India. Though several workers (Siddappaji and Channabasavanna 1990; Jolly *et al.*, 1991) have made an attempt to use various insecticides to control the uzi fly, a systematic evaluation of potential insecticides on the uzi fly has not been made. In continuation of our earlier studies, (Shivashankarappa and Puttaraju, 1994, 1995 a&b; Puttaraju and Shivashankarappa, 1995) an attempt has been made to evaluate the effects of DFB, BHC and DDT on mortality, longevity, fecundity and hatchability of the uzi fly, *E. sorbillans*.

MATERIALS AND METHODS

Post-parasitic maggots of the uzi fly, *E. sorbillans* were collected from the cocoon market at Ramanagaram, Karnataka, and brought to the laboratory to metamorphose into pupae and then into adults in wire-mesh netted cages. Commercially available Diflubenzuron (DFB), Benzene hexachloride (BHC) and Dichloro diphenyl trichloro ethane (DDT) were prepared at concentrations of 0.02, 0.04, 0.06 and 0.1% and administered separately, along with 8% glucose soaked in cotton, to male and female flies for a period of 24 hours. Aqueous solutions of the required percentage (weight/volume) of DFB, BHC and DDT were prepared in 8% glucose solution. After 24 hours of treatment, about 20 male flies of each concentration of all the three insecticides were allowed to mate with the same number of one day old untreated virgin females. Also, the treated females of each concentration of all insecticides were allowed to mate with untreated males. A control batch (20 untreated males and 20 untreated females) was used as the reference. The mated female flies were

allowed to oviposit on about two hundred, 5th instar silkworm larvae. Mortality, longevity, fecundity and hatchability data were recorded as described in our earlier papers (Shivashankarappa and Puttaraju, 1995a; Puttaraju and Shivashankarappa, 1995).

RESULTS

The effects of DFB, BHC, and DDT on the rate of mortality, longevity, fecundity and hatchability are presented in Table I. The male and female flies treated with DFB at all concentrations indicated did not show any mortality. But the flies treated with 0.06 and 0.1% BHC showed 100% mortality. A lower mortality rate was recorded in males (53.3%) than in females (60%) when treated with 0.02% BHC. Complete mortality for both males and females was observed by testing 0.06% and 0.1% of BHC respectively, whereas concentrations of 0.02% and 0.04% BHC gave only partial mortality (53.3% and 60% at 0.02% for males and females and 66.7% and 73.3% at 0.04% for males and females).

For DDT 100% mortality for both males and females was obtained at the concentration of 0.1%. The other concentrations tested gave increasing survival as the concentration of DDT decreased (see Table I).

With regard to longevity, there was no significant difference between control flies and flies fed with DFB. When the flies were fed with 0.02 and 0.04% of BHC and 0.02, 0.04 and 0.06% of DDT the longevity was reduced (6 days) when compared to control flies which lived for 10 days. However, flies treated with higher concentrations (0.06, 0.1% of BHC and 0.1% of DDT) died within two days after eclosion.

Fecundity was normal when DFB treated male flies were mated with untreated female flies. Fecundity was lower (ranging from 92-97) when DFB treated female flies were mated with untreated male flies than control flies (130). When 0.04% BHC treated male flies were cross mated with untreated female flies the rate of fecundity was reduced to 96. On the other hand, the rate of fecundity was reduced to 92 and 85 respectively, when 0.02 and 0.04% BHC treated female flies were cross mated with untreated male flies. Male flies treated with 0.02, 0.04 and 0.06% of DDT did not show any effect on fecundity when cross mated with untreated females. However, the fecundity rate was reduced to 96 and 57 when treated females (0.02 and 0.06% of DDT) were cross mated with untreated males. Further, the fecundity rate was inversely proportional to the concentration of BHC and DDT i.e., increased concentration of BHC and DDT resulted in a decreased fecundity rate.

Interestingly, none of the eggs of the female flies treated with the various concentrations of DFB, cross mated with untreated male flies hatched, indicated complete sterility. However, the hatchability reduced when males treated with different concentrations of DFB cross mated with untreated female flies. The rate of reduction depended on the concentration of insecticides used. Only 4.10 and 9.70% hatchability was recorded at 0.1 and 0.06% DFB, respectively whereas it was 29.80 and 35.20% at 0.04 and 0.02% DFB, respectively. Flies treated with 0.02 and 0.04% BHC exhibited the highest hatchability 60.63 and 29.17% respectively when treated male were cross mated with untreated females. On the other hand hatchability reduced to 10.35 and 6.43% in 0.02 and 0.04% BHC respectively when treated females were cross mated with untreated male flies. The female flies treated with 0.02, 0.04 and 0.06% DDT were cross mated with untreated males showed reduced hatchability i.e. 19.84, 19.69 and 17.54% respectively. Whereas the untreated females cross mated with the males treated with 0.02, 0.04 and 0.06% concentrations of DDT showed 45.42, 40.73 and 40.35% hatchability respectively.

DISCUSSION

The present study has established that BHC and DDT when fed through the diet at concentrations of 0.06-0.1% in 8% glucose affect strongly the mortality of uzi flies. Apart from the mortality the

Table I. Effects of DFB, BHC & DDT (mixed in glucose solution) on the mortality, longevity, fecundity, fertility and sterility of the uzi fly.

Tableau I. Effets du DFB, BHC & DDT (mélangés dans une solution de glucose) sur la mortalité, la longévité, la fertilité et la stérilité de la mouche uzi.

Treatment	Concn (%)	Number of flies tested		Adult mortality (%)						Survivality (%)		Total mortality		Longevity of M & F flies (day)	Nature of cross	Fecundity Rate/flies	Average	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F				Hatching (%)	Sterility (%)
Traitement	Concn (%)	Nombre de mouches testées		Mortalité adulte (%)						Taux de Survie (%)		Mortalité totale		Longévité des mouches M & F (jours)	Nature du croisement	Fécondité Taux/ mouches	Moyenne	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F				Ecllosion (%)	Stérilité (%)
DFB	0.02	20	20	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	10	UF × TM	132	35.20	64.80
															TF × UM	97	0	100
	0.04	20	20	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	10	UF × TM	126	29.80	70.00
															TF × UM	96	0	100
	0.06	20	20	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	10	UF × TM	125	9.70	90.30
BHC															TF × UM	94	0	100
	0.1	20	20	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	10	UF × TM	132	4.10	95.90
															TF × UM	92	0	100
	0.02	20	20	13.3	20.0	20.0	13.3	20.0	26.7	46.70	40.0	53.3	60.0	6	UF × TM	127	60.63	39.37
															TF × UM	92	10.35	89.65
BHC	0.04	20	20	13.3	26.7	33.1	13.3	20.0	33.3	33.3	26.7	66.7	73.3	6	UF × TM	96	29.17	70.83
															TF × UM	85	6.43	93.57
	0.06	20	20	26.7	40.0	40.0	53.4	33.3	6.6	0	0	100	100	3	UF × TM	Flies dead/ Mouches mortes		
															TF × UM	"		
	0.1	20	20	40.0	66.7	46.7	33.3	13.3	0.0	0	0	100	100	2	UF × TM	Flies dead / Mouches mortes		
															"	"		

Continued overleaf / Suite page suivante.

Table I. (Continued). *Table I. (Suite)*

Treatment	Concn (%)	Number of flies tested		Adult mortality (%)						Survivality (%)		Total mortality		Longevity of M & F flies (day)	Nature of cross	Fecundity Rate/flies	Average Hatching Sterility (%)	
		M	F	12 hours	24 hrs	48 hrs					M	F	M	F				
Traitement	Concn (%)	Nombre de mouches testées		Mortalité adulte (%)						Taux de Survie (%)		Mortalité totale		Longévité des mouches M & F (jours)	Nature du croisement	Fécondité Taux/ mouches	Moyenne Eclasion Stérilité (%)	
		M	F	12 heures	24 hrs	48 hrs					M	F	M	F				
DDT	0.02	20	20	20.0	13.3	6.7	13.3	20.0	26.7	53.3	46.7	46.70	53.3	6	UF × TM	131	45.42	54.58
															TF × UM	123	19.84	80.16
	0.04	20	20	13.3	13.3	13.3	26.7	26.7	40.0	46.7	20.0	53.3	80.0	6	UF × TM	137	40.73	59.27
															TF × UM	96	19.69	80.31
	0.06	20	20	33.3	26.7	20.0	46.6	20.0	20.0	26.3	7.3	73.3	93.3	6	UF × TM	114	40.35	59.63
															TF × UM	57	17.54	82.46
	0.1	20	20	40.0	46.7	46.7	53.3	13.3	0.0	0	0	100	100	3	UF × TM	Flies dead / Mouches mortes		
															TF × UM	"		
Control / Témoin	-	20	20	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	10	UF × TM	130	84.78	15.22

U = Untreated / *Non traité*. T = Treated / *Traité*. F = Female / *Femelle*. M = Male / *Mâle*.

effects include the rate of longevity of survived flies that decreased to 6 days and reduction in the rate of hatchability. These effects are presumably due to the high toxicity of the insecticides. On the other hand, the flies treated with DFB did not show any effect on longevity, vigour and sexual competitiveness. The fecundity rate decreased compared to that of untreated flies when treated females were cross mated with untreated males. When untreated females were mated with treated males, the fecundity was as in the control batch of flies. Interestingly, the rate of hatchability differs depending on the sex treated. Females seem to be more sensitive than males. The treated female flies did not show hatchability when crossed with untreated male flies. On the other hand, male flies cross mated with untreated females flies exhibit partial sterility. This indicates that the effect of DFB is comparatively less in male flies than in female flies. A similar observation has also been made by De Milo *et al*, (1978) in the army worm. The fact that maximum sterility was not achieved in treated male flies cross mated with untreated female flies is because, spermatozoa had completely been formed before treatment.

In the light of these observations, it can be inferred that among the three insecticides used, DFB may be the most promising agent not by affecting vigour and longevity but by causing a high rate of sterility. Therefore, we can explore the possibility of using DFB to evolve a sterile male technique to control the uzi fly, as has been suggested in our earlier papers (Shivashankarappa and Puttaraju, 1995a&b; Puttaraju and Shivashankarappa, 1995).

REFERENCES

- DEMILO A. B., OSTROMECKY D. M., SHENCHING CHAN REDFERN R. E. & FYE R. L. (1978) Heterocyclic analogues of diflubenzuron as growth and reproduction inhibitors of the Fall Armyworm and Housefly. *J. Agric. Food. Chem.*, 26(1), 164-166.
- JOLLY M.S., BAIG M., NATARAJU B., SAMSOM M. V. & SEN S. K. (1991) Screening of insecticides against the maggots and pupae of the uzi fly, *Exorista sorbillans* Widemann. (Diptera: Tachinidae) *Sericologia* 31(2), 329-332.
- PUTTARAJU H. P. & SHIVASHANKARAPPA L. H. (1995) Application of Diflubenzuron to control the uzi fly, *Exorista sorbillans* (= *E. bombycis*) (Diptera: Tachinidae) *Sericologia* 35(4), 755-758.
- SHIVASHANKARAPPA L. H. & PUTTARAJU H. P. (1994) Effect of Diflubenzuron on the ovarian development of the uzi fly, *Exorista sorbillans* (= *E. bombycis*) (Diptera: Tachinidae) *J. Mendel*, 11(3-4), 101-102.
- SHIVASHANKARAPPA L. H. & PUTTARAJU H. P. (1995a) Effect of Diflubenzuron on the reproduction of the uzi fly, *Exorista sorbillans*, (= *E. bombycis*) (Diptera : Tachinidae) *Sericologia*, 35(4), 763-766
- SHIVASHANKARAPPA L. H. & PUTTARAJU H. P. (1995b) Application of Diflubenzuron in Aqueous form to induce sterility in the uzi fly, *Exorista sorbillans* - A feasibility study. *Pers. Cytol. Genet.* 8, 339-349.
- SIDDAPPAJI C. & CHANNABASABANNA G. P. (1990) The Indian uzi fly, *Exorista bombycis*, a parasitic of the mulberry silkworm. *Indian J. Seric.*, 29(1), 119-137.

ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DU DFB, BHC ET DDT SUR LA MOUCHE UZI, *EXORISTA SORBILLANS* (= *E. BOMBYCIS*) (DIPTERA : TACHINIDAE)

L. H. SHIVASHANKARAPPA & H. P. PUTTARAJU

Department of Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore 560 056 Inde.

Pour étudier leurs effets sur la mouche uzi, *Exorista sorbillans*, des insecticides commercialement disponibles, c'est-à-dire DFB (Diflubenzuron), BHC (Hexadichlorobenzène) et DDT (Dichloro diphenyltrichloro éthane) sont donnés dans l'alimentation à ces mouches à des concentrations de 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 % dans une solution de glucose à 8 %. Des concentrations de 0,06 et 0,1 % de BHC et 0,1 % de DDT entraînent une mortalité totale. Avec des concentrations de BHC et de DDT plus faibles que celles entraînant le taux le plus faible de mortalité, les survivants présentent une stérilité partielle. Par contre, les mouches mâles et femelles nourries au DFB ne montrent aucune différence de longévité, de vigueur et de compétitivité sexuelle. Néanmoins, on obtient des mouches femelles avec une stérilité totale à toutes les concentrations de DFB testées et des mouches mâles avec une stérilité partielle avec respectivement 0,02 et 0,04 %. Environ 96 % de la stérilité des mâles est enregistrée à 0,1 % de DFB.

INTRODUCTION

La mouche uzi, *Exorista sorbillans*, est un sérieux endoparasitoïde du ver à soie, *Bombyx mori*, provoquant de grands dommages à l'industrie de la soie en Inde. Bien que plusieurs auteurs (Siddappaji et Channabasavanna 1990 ; Jolly et coll., 1991) aient essayé d'utiliser divers insecticides pour contrôler la mouche uzi, une évaluation systématique des insecticides possibles sur la mouche uzi n'a pas été réalisée. Dans la continuation de nos études précédentes (Shivashankarappa et Puttaraju, 1994, 1995 a&b ; Puttaraju et Shivashankarappa, 1995), un essai a été fait pour évaluer les effets du DFB, BHC et DDT sur la mortalité, la longévité, la fécondité et l'éclosion de la mouche uzi, *E. sorbillans*.

MATERIELS ET METHODES

Les asticots post-parasitaires de la mouche uzi, *E. sorbillans* sont recueillis sur le marché aux cocons à Ramanagaram, Karnataka, et amenés au laboratoire pour se transformer en pupes puis en adultes dans des cages grillagées. Commercialement disponibles, le Diflubenzuron (DBF), le Benzenhexachloride (BHC) et le Dichloro diphenyltrichloro éthane (DDT) sont préparés à des concentrations de 0,02, 0,04, 0,06 et 0,1 % et administrés séparément, avec un coton trempé dans une solution à 8 % de glucose, aux mouches mâles et femelles pendant 24 heures. Des solutions aqueuses au pourcentage requis (poids / volume) de DFB, BHC et DDT sont préparées dans une solution de glucose à 8 %. Après 24 heures de traitement, environ 20 mouches mâles de chaque concentration de l'ensemble des trois insecticides sont mises en accouplement avec le même nombre de femelles vierges non traitées âgées d'un jour. Des femelles traitées de chaque concentration de tous les insecticides sont accouplées avec des mâles non traités. Un groupe témoin (20 mâles non traités et 20 femelles non traitées) est utilisé comme référence. Les mouches femelles accouplées sont mises à

pondre des oeufs sur environ deux cents larves de vers à soie du cinquième âge. Les données de mortalité, longévité, fécondité et d'éclosion sont enregistrées comme décrites dans nos articles précédents (Shivashankarappa et Puttaraju, 1995a ; Puttaraju et Shivashankarappa, 1995).

RESULTATS

Les effets du DFB, BHC et DDT sur le taux de mortalité, la longévité, la fécondité et l'éclosion sont présentés dans le tableau I. Les mouches mâles et femelles traitées avec le DFB à toutes les concentrations indiquées ne montrent aucune mortalité. Mais la mortalité chez les mouches traitées avec du BHC à 0,06 et 0,1 % est de 100 %. On obtient un taux de mortalité plus faible chez les mâles (53,3 %) que chez les femelles (60 %) quand ils sont traités avec du BHC à 0,02 %. Une mortalité totale pour les mâles et les femelles est observée en expérimentant respectivement 0,06 % et 0,1 % de BHC, alors que des concentrations de 0,02 % et 0,04 % de BHC donnent seulement une mortalité partielle (53,3 % et 60 % à 0,02 % pour les mâles et les femelles et 66,7 % et 73,3 % à 0,04 % pour les mâles et les femelles).

En ce qui concerne le DDT, une mortalité de 100 % pour les mâles et les femelles est obtenue à une concentration de 0,1 %. Les autres concentrations testées donnent une survie croissante en même temps que la concentration de DDT décroît (voir le tableau I).

En ce qui concerne la longévité, il n'y a pas de différence significative entre les mouches témoins et les mouches nourries avec du DFB. Lorsque les mouches sont nourries avec 0,02 et 0,04 % de BHC et 0,02, 0,04 et 0,06 % de DDT, la longévité est réduite (6 jours) par comparaison avec les mouches témoins qui vivent pendant 10 jours. Néanmoins, les mouches traitées avec des concentrations plus élevées (0,06, 0,1 % de BHC et 0,1 % de DDT) meurent dans un délai de deux jours après l'éclosion.

La fécondité est normale quand les mouches mâles traitées au DFB sont accouplées avec les mouches femelles non traitées. La fécondité est plus faible (de 92 à 97) que chez les témoins (130), chez les mouches femelles traitées au DFB accouplées avec les mouches mâles non traitées. Quand les mouches mâles traitées avec 0,04 % de BHC sont accouplées avec les mouches femelles non traitées, le taux de fécondité est réduit à 96. Par ailleurs, le taux de fécondité est respectivement réduit à 92 et 85, lorsque les mouches femelles traitées avec 0,02 et 0,04 % de BHC sont accouplées avec les mouches mâles non traitées. Les mouches mâles traitées avec 0,02, 0,04 et 0,06 % de DDT n'entraînent aucune modification de la fécondité quand elles sont accouplées avec les femelles non traitées. Cependant, le taux de fécondité est réduit à 96 et 57 quand les femelles traitées (0,02 et 0,06 % de DDT) sont accouplées avec les mâles non traités. De plus, le taux de fécondité est inversement proportionnel à la concentration en BHC et en DDT, c'est-à-dire que la concentration accrue de BHC et DDT conduit à un taux de fécondité diminué.

De façon intéressante, aucun oeuf des mouches femelles traitées avec diverses concentrations de DFB, accouplées avec des mouches mâles écloses, ne présente une stérilité totale. Le taux de réduction dépend de la concentration d'insecticides utilisés. Seulement 4,10 et 9,70 % d'éclosion sont enregistrés respectivement à 0,1 et 0,06 % de DFB, alors qu'elle est respectivement de 29,80 et 35,20 % à 0,04 et 0,02 % de DFB. Les mouches traitées avec 0,02 et 0,04 % de BHC présentent l'éclosion la plus élevée, à savoir respectivement 60,63 et 29,17 % lorsque les mâles traités sont accouplés avec les femelles non traitées. Par ailleurs, l'éclosion est réduite à 10,35 et 6,43 % avec respectivement 0,02 et 0,04 % de BHC lorsque les femelles traitées sont accouplées avec les mouches mâles non traitées. Les mouches femelles traitées avec 0,02, 0,04 et 0,06 % de DDT qui sont accouplées avec les mâles non traités affichent une éclosion réduite c'est-à-dire respectivement 19,84, 19,69 et 17,54 %. Alors que les femelles non traitées accouplées avec les mâles traités à des concentrations de DDT de 0,02, 0,04 et 0,06 % présentent respectivement 45,42 ; 40,73 et 40,35 % d'éclosion.

DISCUSSION

La présente étude a démontré que le BHC et le DDT fournis avec une alimentation à des concentrations de 0,06-0,1 % dans 8 % de glucose affectent fortement la mortalité des mouches uzis. Exceptée la mortalité, les effets sont également évidents sur le taux de longévité des mouches survivantes qui diminue jusqu'à six jours et la réduction du taux d'éclosion. Ces effets sont vraisemblablement dus à la grande toxicité des insecticides. En revanche, les mouches traitées avec le DFB ne montrent aucun effet sur la longévité, la vigueur et la compétitivité sexuelle. Le taux de fécondité diminue si on le compare à celui des mouches non traitées lorsque les femelles traitées sont accouplées avec les mâles non traités. Lorsque les femelles non traitées sont accouplées avec les mâles traités, la fécondité est la même que dans le groupe de mouches témoin. De façon intéressante, le taux d'éclosion diffère selon le sexe traité. Les femelles semblent être plus sensibles que les mâles. Les mouches femelles traitées ne montrent aucune éclosion quand elles sont croisées avec les mouches mâles non traitées. Par contre, les mouches mâles accouplées avec les mouches femelles non traitées affichent une stérilité partielle. Ceci indique que l'effet du DFB est comparativement moindre chez les mouches mâles que chez les mouches femelles. Une remarque similaire a aussi été faite par De Milo et coll., (1978) concernant la chenille de la leucanie. Le fait que la stérilité maximale n'est pas obtenue chez les mouches mâles traitées accouplées avec les mouches femelles non traitées provient du fait que la formation complète du spermatozoïde est intervenue avant le traitement.

A la lumière de ces observations, il peut être conclu que parmi les trois insecticides utilisés, le DFB peut être l'agent le plus prometteur en n'affectant pas la vigueur et la longévité mais en provoquant un taux élevé de stérilité. Par conséquent, nous pouvons examiner la possibilité d'utiliser le DFB pour élaborer une technique de stérilisation du mâle pour contrôler la mouche uzi, comme cela a été suggéré dans nos articles précédents (Shivashankarappa et Puttaraju, 1995 a&b ; Puttaraju et Shivashankarappa, 1995).

EVALUATION OF AZADIRACHTIN FOR THE CONTROL OF THE UZIFLY *BLEPHARIPA ZEBINA* (DIPTERA: TACHINIDAE)

R. N. SINGH & K. THANGAVELU*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 234, India.

*Application of Azadirachtin to maggots of the uzifly **Blepharipa zebina** (Diptera: Tachinidae), completely disrupted subsequent development to prepupae, pupae and adults. In a dose- and stage dependent manner Azadirachtin caused a delay and inhibition of puparium formation, loss of weight, pupal death, prevention of emergence of adults and malformation to adults structures. The sensitivity to Azadirachtin varied considerably during development, indicating that Azadirachtin interfered with specific activities which find expression in the particular developmental stages. Three day old and older pupae were not affected even at the higher doses of Azadirachtin were 0.1 and 0.4 µg / maggot respectively. All these aspects are discussed in detail.*

INTRODUCTION

The search for various methods and substances to control noxious insects without adverse side effects on silkworms is of primary importance in sericulture. Of the various components of Integrated Pest Management, pesticides are the most powerful tool available for pest control, but there are shortcomings like development of resistance, sudden resurgence of target pests, induced outbreak of secondary pests and environmental contamination (Lacobson, 1989., Klocke and Barnby 1989., Isman *et al.*, 1990., Klocke and Kubo, 1991., Schmutterer, 1992., Ascher, 1993). Simultaneously, with the use of synthetic pesticides, chemicals of plant origin, have been in use for pest control.

Neem *Azadirachta indica*, A. Juss, a recent craze of plant origin, is subject of extensive investigations in the modern format of research. It contains a diverse array of biologically active principles. Azadirachtin, a tetranortriterpenoid, is the best known active principle (Larson, 1988., Broughton *et al.*, 1986., Koul, *et al.* 1990., Mordue and Blackwell, 1993). It has antifeedant, antiovipositional, growth disrupting and fecundity reducing properties on different insects (Schmutterer, 1985 and 1988., Saxena, 1989). In recent years, many neem seed products like its oil, cake, crude extracts and purified fractions have been tested commercially against a large number of insect species. The results indicate that azadirachtin and other neem extracts have insect growth regulatory (IGR) activity against several orders of insects. However, little information has been published on the influence of any IGR substance on immature forms of tachinid flies (Singh and Sinha, 1993., Singh *et al.* 1995., Singh and Thangavelu, 1996). The purpose of this study was to determine if Azadirachtin, the tetranortriterpenoid isolated from the seeds of the neem tree, would affect the development of immature forms of the uzifly.

* Present address: Silkworm and Mulberry Germplasm Station, P. B. No. 44, Thally Road, Hosur - 635 109, India.

MATERIALS AND METHODS

The maggots and pupae population were maintained in the laboratory to meet the regular need of the insects for bioassay studies. Maggots used in the tests were collected from the rearing field and grainages of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. They were held in soil in small metal tins (60 mm diam, 40 mm high) during the course of the test. Late larvae, prepupae and pupae were obtained by keeping the insects in the tins until the stages desired for treatment were reached. The containers were held in the laboratory at 20-25°C during the course of the test.

Azadirachtin (supplied from West coast Herbochem Ltd. Bombay, India) was dissolved in ethanol and solutions were applied topically to the thoracic region of the immature forms (3.5 µl / insect) using a Dutky- Fest microinjector. After treatment, the insects were incubated and examined every 3 - 5 days after treatment and mortality and deformities were recorded. Five replicates were carried out to determine the response of the neem compound. At the onset, azadirachtin was applied in two experiments to prepupae and pupae in amounts that ranged from 1-4 and 0.25-4 µg / insect, respectively. 25 insects were treated at each level.

In a third test, to define the susceptibility more precisely, 2 µg of Azadirachtin was applied to 0-12 h old maggots, prepupae and pupae of *B. zebina*. For each stage 30 insects were treated and incubated with an equal number of control insects. After selecting the most susceptible stage with Azadirachtin, the doses response relationship was evaluated by treating the groups of 25 insects with 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 µg / insect. Mortality, deformation and time required to complete immature stages were recorded. The percentage of insects responding (dead and deformed) in various stages were analysed by probit analysis (Finney, 1952). Longevity of larvae was analysed by analysis of variance and means were separated using Duncans multiple range test.

RESULTS AND DISCUSSION

Results presented in table I indicate that there was high mortality (above 80 %) in the prepupae treated with 1-4 µg / insect of Azadirachtin. However, the effect was less (below 10 %) in the pupae treated after 36 h prepupal period. Similar observations were recorded against a wide variety of immature forms after topical application of 2 µg / Azadirachtin / insect. On exposure of 0-1 day old maggots deformed and delayed development of maggots were experienced. The mortality was above 90 % in prepupal and maggot stage of *B. zebina*. Maximum delayed mortality occurred in fresh maggots and 1-12 h old maggot, where it was 100 % in both cases. Likewise, the exposure of one day old pupae resulted in high mortality (67 %), whereas the late stage pupae was least affected and mortality percentage was low (5 %) (Table II). It may be due to hard outer cuticle in the puparium of the fly, where Azadirachtin fails to penetrate. Active larvae were most affected and there was no normal adult formation. The growth regulatory effects of azadirachtin on larval insects are well known (Mordue and Blackwell, 1993). Treatment of insects with azadirachtin, causes growth inhibition, malformation and mortality in dose dependent manner. It causes remarkable changes in the developing stages of insects. The developmental effects of azadirachtin are attributed to a disruption of endocrine events (Nakanishi, 1975., Klocke and Kubo, 1991). It influences the quantity or quality of the pool of moulting hormone (Rembold *et al.* 1984). This is suggested by the general condition of the deformed insects resulting from the application of azadirachtin. Many of these insects were unable to completely shed their pupal exuvae and those that succeeded were often transformed with nonfunctional wings, malformed abdomens and other morphological abnormalities. In general, these malformed adults did not seem capable of mating; none were able to fly. Similar observations have been reported earlier (Bidman *et al.* 1987., and Koolman *et al.* 1988 for blow fly larvae and Gujar and Mehrotra, 1988 for red pumpkin beetle).

Table I. Percentages of dead and deformed uziflies^a following topical application of azadirachtin to prepupae and pupae^b.

Tableau I. Pourcentages de mouches uzi^a mortes et déformées suite à l'application topique d'azadiractine à des pupes et à des pré-pupes^b.

Azadirachtin µg/insect	Percentage dead and deformed (prepupae treated)	% dead and deformed (pupae treated) ^d
Azadiractine µg/insecte	Pourcentage de morts et déformés (pré-pupes traitées)	% de morts et déformés (pupes traitées)
0.25	—	—
0.50	—	—
1.00	82.00	5.0
2.00	90.00	7.00
4.00	90.00	9.00

a - Corrected Abbott^s formula ; Survival in control = 90% / Formule Abbott corrigée^s ; taux de survie du témoin = 90 %.

b - 20 insects/ application. 20 insectes / application.

c - Azadirachtin applied to prepupae after loss of locomotor ability / Azadiractine appliquée à des pré-pupes après l'arrêt de la locomotion..

d - Azadirachtin applied 36 h after prepupal period / Azadiractine appliquée 36 h après la période pré-pupale.

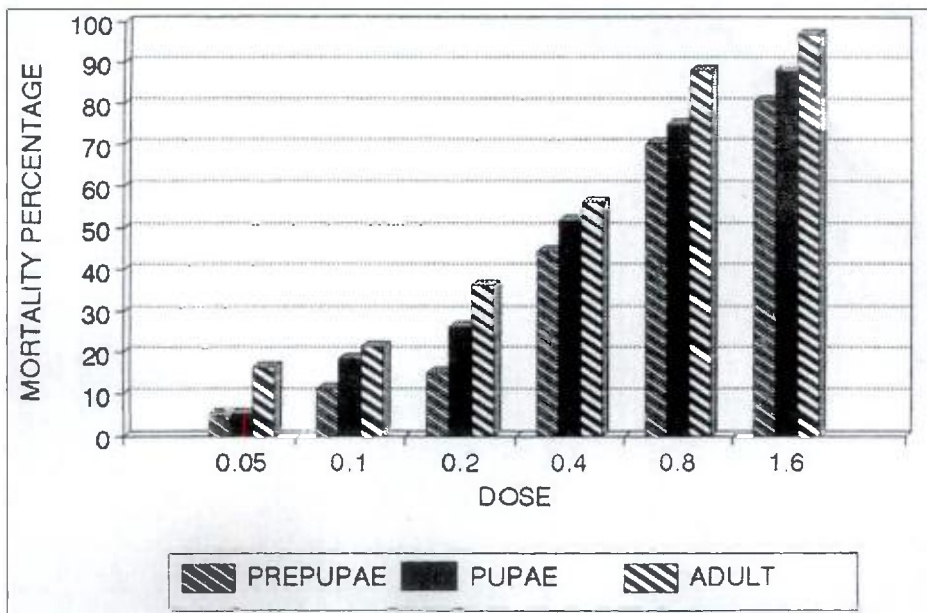


Fig. 1. Calculated percentage of dead and deformed *B. zebina* at indicated stage.
Fig. 1. Pourcentage de mortalité et de déformation au stade indiqué chez *B. zebina*.

Table II. Mortality (dead and deformed insects) of immature uzifly following topical application of 2 µg-azadirachtin per insect^a.

Tableau II. Mortalité (insectes morts et déformés) de mouches uzi non matures suite à l'application topique de 2 µg d'azadiractine par insecte^a.

Stage treated b	Per centage dead and deformed ^c
<i>Stade Traité^b</i>	<i>Pourcentage de mortalité et de déformation^c</i>
Fresh maggots / <i>Asticots frais</i>	100.00
Maggots after 24 hours / <i>Asticots après 24 heures</i>	100.00
Prepupae immobile / <i>Prépupes immobiles</i>	90.00
Pupae 24 hours after moult / <i>Pupes 24 heures après la mue</i>	67.00
Pupae (hard puparium) ^d / <i>Pupes (pupariums durs)^d</i>	5.00

a - Maggots collected in the field and held in the soil.

Asticots recueillis dans le champ et conservés dans le sol.

b - 30 insects per treatment / 30 insectes par traitement.

c - Corrected by Abott's formula / *Corrigé par la formule Abott.*

d - 1-2 days before emergence / 1-2 jours avant l'émergence.

Table III. Duration of the third stage maggot^a following topical application of azadirachtin.

Tableau III. Durée du troisième stade de l'asticot^a après l'application topique d'azadiractine.

Azadirachtin µg/larva	Duration in days ^b	Range of duration	Percent increase
<i>Azadiractine µg/larve</i>	<i>Durée en jours^b</i>	<i>Fourchette de temps</i>	<i>Pourcentage d'augmentation</i>
1.6	18.6	20-30	1140
0.8	14.5	15-22	867
0.4	10.3	10-14	586
0.2	6.8	5-9	353
0.1	4.5	3-6	200
0.05	2.5	2-3	67
0.00	1.5	1-2	

a - Until death or transformation to prepupal stage / *Jusqu'à la mort ou la transformation en stade pré-pupal.*

b - Means followed by different letters differ significantly at $p > 0.05$ / *Les moyennes suivies par différentes lettres diffèrent de façon significative pour $p > 0,05$.*

The results presented in figure 1 indicate the calculated percentage of dead and deformed insects in the indicated development stages (prepupae, pupae and adults), including the cumulative response occurring earlier. Thus the percentage of dead and deformed adults occurring after application of $0.4 \mu\text{g} / \text{larvae}$, includes prepupal and pupal mortalities as 32.53 and 49.62 per cent respectively. Calculated LD 50 and LD 90 mortality levels occurring by the adult stage were 0.1 and $0.4 \mu\text{g}$, respectively. It was observed that some insects treated as larvae ($@ 0.20 \mu\text{g} / \text{insect}$) died in that stage, while others entering into moult from larval to pupal stage or from pupal to adult stage. All responses were generally related to dose (Fig. 1). Why some insects should arrive as larvae, prepupae, and pupae and then succumb to the effects of Azadirachtin as adults and why others should perish in early stage is not clear, but such responses might be attributable to differential depletion of the moulting hormone «pool» as suggested by Rembold *et al.* 1989.

Table IV. Time in days required by third stage uzifly maggots treated topically with azadirachtin (25 larvae / dose) to complete the indicated immature stages.

Tableau IV. Temps en jours requis par les asticots de la mouche uzi au troisième stade traités de manière topique avec de l'azadiractine (25 larves / dose) pour achever les stades immatures indiqués.

Azadirachtin ($\mu\text{g}/\text{larva}$)	Mean number of days after application to complete indicated stage		
	As maggots stage	Prepupae	Pupae
Azadiractine ($\mu\text{g}/\text{larve}$)	Nombre moyen de jours après l'application pour achever le stade indiqué		
	Stade asticot	Prépupe	Pupe
0.00	1.5	2.00	8.5
0.05	3.2	7.40	9.2
0.10	5.4	10.40	14.5
0.20	7.8	12.70	16.5
0.40	12.3	18.90	24.0
0.80	18.5	22.70	25.5
1.60	24.6	36.50	40.0

Data regarding the time required to complete the larval development after application of Azadirachtin are presented in table III and IV. The duration of immature stages increased by increasing doses of Azadirachtin. In the case of the highest doses applied ($1.6 \mu\text{g}$), the individuals that survived as larvae spent more times (1140 %) as long in that stage as did their un-treated counterparts. In every instance the period of time extended, but only at the highest doses ($1.6 \mu\text{g} / \text{maggot}$) the increase was statistically significant. The time required to complete the pupal and prepupal stages also increased. Survivors of larvae treated with $1.6 \mu\text{g}$ of azadirachtin required more time than the controls to complete the respective stages. Topical applications of azadirachtin were thus found to prevent normal development of some forms of immature uziflies. Active maggots were the most susceptible; applications of $1.6 \mu\text{g} / \text{larvae}$ resulted in the death or deformities of all individuals treated. Prepupae

and pupae less than 24 hours old were also susceptible to topical applications, but pupae older than 6-7 days appeared to be completely immune.

REFERENCES

- ASCHER, A. R. S. (1993) Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. Arch Insect Biochem. Physiol. 22, 433-449.
- BIDMAN, H. J., KAUSER, G., MOBUS, P., and KOOLMAN, J. (1987) Effect of Azadirachtin on blowfly larvae and pupae. In Proc. 3rd. Int. Neem Conf. (Eds. Schmutterer H. and Ascher, K. R. S.), PP. 232-272. GTZ, Eschborn, Germany.
- BROUGHTON, H. B., LEY, S. V., SLEWIN, A. M. Z., WILLIAMS, D. J. and MORGAN, E. D. (1986) X-ray crystallographic structure determination of detigloyldihydro-azadirachtin and reassignment of the structure of the limonoid insect antifeedant azadirachtin. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 46-47.
- GUJAR, D. T. and MEHROTRA, K. N. (1988) Biological activity of neem against the Red pumpkin beetle, *Aulocophora foveicollis*. Phytoparasitica 16, 293-302.
- FINNEY, D. J. (1952) Probit Analysis. Cambridge University Press. London.
- ISMAN, M. B., KOUL, A., LOWERY, D. T., ARNASON, J. T., GAGNON, D., STEWART, J. G. AND SALLOUM, G. S. (1990) Development of neem based insecticide in Canada, pp. 32-39. In J. C. Locke & R. H. Lawson (Eds.) Neem Potential in Pest Management programs, Proceeding of the neem workshop, Beltsville, MD. USDA-ARS 86.
- KLOCKE, J. A. and KUBO, I. (1991) Defense of plants through regulation of insect feeding behaviour. Fla. Ent. 74: 18-23.
- KOUL, O., M. B. ISMAN and KETKER, C. M. (1990) Properties and uses of neem *Azadirachta indica*. Can. J. Bot. 68: 1-11.
- KOOLMAN, J., BIDMAN, H. J., LEHMANN, M. and KAUSER, G. (1988) On the mode of action of Azadirachtin in Blowfly larvae and pupae. In Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology (Eds. Schnal F., Zabza, A. and Denliger, D. L.) Vol. 1 pp. 55-67. Wroclaw Technical Univ. Press, Wroclaw.
- KLOCKE, J. A. and KUBO, I. (1991) Defense of Plants through regulation of insect feeding behaviour. Fla Ent. 74, 18-23.
- LACOBSON, M. (1989) Pharmacology and Toxicology of neem. pp. 133-153. In M. Jacobson (eds) Focus on Phytochemicals Pesticides Vol. I: the neem tree. CRC., Boca Raton, FL.
- LARSON, R. O. (1988) The commercialization of neem, pp. 155-168. In M. Jacobson (Eds). Focus on phytochemicals pesticides Vol. I: The neem tree. CRC. Boca Raton FL.
- MORDUE (LUNTZ), A. J. and BLACKWELL, A. (1993) Azadirachtin: update. J. Insect Physiol. 39 (11): 903-924.
- NAKANISHI K. (1975) Structure of the insect antifeedant azadirachtin. Recent Adv. Phytochem. 9:283-298.
- REMBOLD, H., FORSTER, H., CZOPPELT, CH., RAO, J. P. SIEBER, K. P. 1984. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. P roc. 2nd. Int. Neem Conf. Rautschholzhausen, 1983 csehborn GTZ pp 153-62.
- REMBOLD H. (1989) Azadirachtin their structure and mode of action. In insecticides of Plants Origin. ACS Symp. Ser. 187 (Eds Arnason, J. T., Philogene, B. J. R. and Morand p.), pp. 150-163. American Chemical Society, Washington, DC.
- SAXENA, R. C. (1989) Insecticides from neem pp. 110-135. In J. T. Arnason, B. R. J. Philogene & P. Morand (eds) Insecticides of plant origin. ACS Symp. Ser. No. 387. American Chemical Society, Washington, DC.

- SCHMUTTERER, H., (1985) Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions ? Z. Angew. Entomol. 100: 468-475.
- SCHMUTTERER, H., (1988) Potential of Azadirachtin- containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. J. Insect Physiol. 34: 713-719.
- SCHMUTTERER H. (1992) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Ann. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- SINGH, R. N. and SINHA, S. S. (1993) Neem to control pests of tasar. Indian Silk. 32 (8): 42-44.
- SINGH, R. N. and SINHA, S. S. (1995) Toxic and developmental effects of some neem products against Uzifly *Blepharipa zebina*. Annals of Forestry. (Press)
- SINGH, R. N. and THANGAVELU, K. (1996) Influence of neem compound on the growth and development of immature forms of uzifly, *Blepharipa zebina* Walk. (Diptera: Tachinidae). Pestology 20 (3): 16-20.

EVALUATION DE L'AZADIRACHTINE POUR LA LUTTE CONTRE LA MOUCHE UZI *BLEPHARIPA ZEBINA* (DIPTERE : TACHINIDAE)

R. N. SINGH & K. THANGAVELU*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 234, Inde.

*L'application d'Azadirachtine sur les asticots de la mouche uzi **Blepharipa zebina** (Diptère : Tachinidae), interrompt complètement le développement ultérieur en prépuces, des pupes et des adultes. Selon la dose et le stade de développement, l'Azadirachtine entraîne un retard et une inhibition de la formation du puparium, une perte de poids, la mort de la pupa, la suppression de l'émergence des adultes et la malformation des structures des adultes. La sensibilité à l'Azadirachtine varie considérablement pendant le développement, indiquant que l'Azadirachtine intervient dans les activités spécifiques qui trouvent leur expression dans des stades de développement particuliers. Les pupes âgées de trois jours et plus ne sont pas atteintes même à des doses élevées d'Azadirachtine. Les DL50 et DL90 d'Azadirachtine appliquée de façon topique sont de 0,1 et 0,4 µg / larves respectivement. Tous ces aspects sont discutés en détail.*

INTRODUCTION

La recherche de diverses méthodes et substances pour lutter contre les insectes nuisibles sans avoir de réactions secondaires défavorables sur les vers à soie est de première importance en sériciculture. Des divers éléments de la lutte intégrée, les pesticides sont l'outil le plus puissant disponible pour contrôler les insectes nuisibles, mais il existe des points faibles comme le développement de la résistance, la résurgence soudaine des insectes nuisibles cibles, l'éruption d'insectes nuisibles secondaires et la contamination de l'environnement (Jacobson, 1989, Klocke et Barnby 1989, Isman et coll. 1990, Klocke et Kubo, 1991, Schmutterer, 1992, Ascher, 1993). En même temps que l'utilisation des pesticides synthétiques, les produits chimiques d'origine végétale ont été utilisés pour lutter contre les insectes nuisibles.

Le margousier *Azadirachta indica*, A. Juss, le récent modèle d'origine végétale, est sujet à de nombreux travaux dans la recherche moderne. Il contient un ensemble varié de principes biologiquement actifs. L'Azadirachtine, un tétranortriterpénoïde, est le principe actif le plus connu (Larson, 1988, Broughton et coll., 1986, Koul, et coll., 1990, Mordue et Blackwell, 1993). Il réduit l'appétence, l'oviposition, la croissance et la fécondité chez différents insectes (Schmutterer, 1985 et 1988, Saxena, 1989). Depuis quelques années, de nombreux produits de graines de margousier comme son huile, son tourteau, ses extraits bruts et ses fractions purifiées ont été commercialement testés chez un grand nombre d'espèces d'insectes. Les résultats montrent que l'azadirachtine et d'autres extraits de margousier ont une activité de régulateur de croissance d'insectes (RCI) pour plusieurs espèces d'insectes. Cependant, peu d'informations ont été publiées sur l'influence de RCI sur les formes immatures des mouches tachinides (Singh et Sinha, 1993, Singh et coll., 1995, Singh et

* Adresse actuelle : Silkworm and Mulberry Germplasm Station, P. B. No. 44, Thally Road, Hosur-635 109, Inde.

Thangavelu, 1996). Le but de cette étude est de déterminer si l'Azadirachtine, le tetranortriterpénoïde isolé des graines du margousier, affectent le développement des formes immatures de la mouche uzi.

MATERIELS ET METHODES

Les larves et les pupes sont maintenues dans le laboratoire pour des essais biologiques. Les asticots utilisés dans les tests proviennent du domaine d'élevage et de grainage du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta*. Ils sont conservés dans la terre dans des petites boîtes métalliques (60 mm de diamètre, 40 mm de hauteur) tout au long de l'expérience. Les larves tardives, les prépupes et les pupes sont obtenues en gardant les insectes dans des boîtes de fer blanc jusqu'à ce que les stades souhaités pour le traitement soient atteints. Les boîtes sont conservées dans le laboratoire à une température de 20-25° C pendant le déroulement de l'expérience.

L'Azadirachtine (fournie par West Coast Herbochem Ltd. Bombay, Inde) est dissoute dans de l'éthanol et des solutions sont appliquées de façon topique sur la zone thoracique des formes immatures (3,5 µl / insecte) en utilisant un microinjecteur Dutky-Fest. Après le traitement, les insectes sont incubés et examinés tous les 3-4 jours après le traitement et la mortalité et les difformités sont alors constatées. Cinq répétitions sont effectuées pour déterminer la réaction des composés du margousier. Au début, l'azadirachtine a été appliquée dans deux expériences sur les prépupes et les pupes en quantités qui s'étendent de 1 à 4 et de 0,25 à 4 µg / insecte respectivement. 25 insectes sont traités à chaque dose.

Lors d'une troisième expérience, pour définir la sensibilité plus précisément, 2 µg d'Azadirachtine ont été appliqués sur des asticots âgés de 0 à 12 heures, sur des prépupes et des pupes de *B. zebina*. A chaque stade, 30 insectes sont traités et incubés avec un nombre égal d'insectes témoins. Après avoir sélectionné le stade le plus sensible à l'Azadirachtine, la courbe des doses est obtenue en traitant des groupes de 25 insectes avec 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1,6 µg / insecte. La mortalité, les difformités et le temps nécessaire pour mener à bien les stades immatures sont enregistrés. Le pourcentage d'insectes réagissant (morts ou déformés) dans les divers stades est étudié par l'analyse de probit (Finney, 1952). La longévité des larves est étudiée par l'analyse de variance et les moyennes sont comparées en utilisant le test de Duncan.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats présentés dans le tableau I indiquent une mortalité élevée (au-dessus de 80 %) chez les prépupes traitées avec 1 à 4 µg d'Azadirachtine / insecte. Néanmoins, l'effet est moindre (au-dessous de 10 %) chez les pupes traitées après une période prépupale de 36 heures. Des observations similaires ont été enregistrées pour une grande variété de formes immatures après l'application topique de 2 µg d'Azadirachtine / insecte. On a examiné la déformation et le retard de développement pour des asticots âgés de 0 - 1 jour. La mortalité est supérieure à 90 % au stade prépupal et au stade larvaire chez *B. zebina*. La mortalité retardée maximale est obtenue chez les asticots frais et les asticots âgés de 1 à 12 heures, où elle est de 100 % dans les deux cas. De même, l'exposition des pupes âgées de un jour entraîne une mortalité élevée (67 %), alors que les pupes au stade avancé sont moins affectées et le pourcentage de mortalité est faible (5 %) (Tableau II). Cela peut être dû à une cuticule externe dure dans le puparium de la mouche, où l'Azadirachtine pénètre difficilement. Les larves actives sont plus affectées et il n'y a aucune formation adulte normale. Les effets régulateur de croissance de l'azadirachtine sur les insectes larvaires sont bien connus (Mordue et Blackwell, 1993). Le traitement des insectes avec de l'azadirachtine provoque une inhibition de la croissance, la malformation et la mortalité de manière dépendant de la dose. Cela entraîne des changements remarquables aux stades de développement des insectes. Les effets de l'azadirachtine sur le développement sont attribués à une rupture des événements endocrines (Nakanishi, 1975; Klocke et Kubo, 1991). Elle influence la quantité ou la qualité des hormones de mue (Embold et coll., 1984). Cela est confirmé par l'obtention d'insectes déformés résultant de l'application d'azadirachtine.

Beaucoup de ces insectes sont incapables de sortir de leur exuvie pupale et ceux qui y parviennent sont souvent transformés avec des ailes non-fonctionnelles, des abdomens malformés et d'autres anomalies morphologiques. En général, ces adultes malformés ne semblent pas capables de s'accoupler : aucun n'est capable de voler. Des observations similaires ont été rapportées précédemment (Bidman et coll., 1987, et Koolman et coll. 1988) pour les larves de mouches à viande et pour le coléoptère rouge de la citrouille (Gujar et Mehrotra, 1988).

Les résultats présentés dans la figure 1 indiquent le pourcentage accumulé d'insectes morts ou déformés aux stades de développement indiqués (prépupes, pupes et adultes. Ainsi, le pourcentage d'adultes morts ou déformés après l'application de 0,4 μg / larve, inclut les mortalités pré-pupales et pupales (32,53 et 49,62 % respectivement). DL 50 et DL 90 calculées se produisant au stade adulte sont de 0,1 et 0,4 μg . respectivement. On observe que certains insectes traités au stade larvaire (@ 0,20 μg / insecte) meurent à ce stade, alors que d'autres entrent en mue du stade larvaire au stade pupal ou du stade pupal au stade adulte. En général, toutes les réactions dépendent des doses (Fig. 1). Le fait que certains insectes survivent en tant que larves, pré-pupes, et pupes et succombent au stade adulte et que d'autres meurent au début du stade n'est pas facile à expliquer, mais de telles réactions pourraient être attribuées à une déplétion différentielle des hormones de mue comme l'ont suggéré Rembold et coll., 1989.

Les données concernant le temps nécessaire pour mener à bien le développement larvaire après l'application d'Azadirachtine sont présentées dans les tableaux III et IV. La durée des stades immatures est accrue lorsqu'on augmente les doses d'Azadirachtine. Dans le cas de doses élevées (1,6 μg), les individus qui survivent comme des larves passent plus de temps à ce stade qu'en passent leurs homologues non traités. Dans tous les cas, la période est prolongée, mais seulement aux doses les plus élevées (1,6 μg / asticot) : l'augmentation est statistiquement significative. Le temps requis pour terminer les stades pupal et pré-pupal est également augmenté. Les survivants des larves traitées avec 1,6 μg d'azadirachtine mettent plus de temps que les témoins pour terminer les stades respectifs. On a ainsi découvert que les applications topiques d'azadirachtine empêchaient le développement normal de certaines formes de mouches uzi immatures. Les asticots actifs sont les plus sensibles : les applications de 1,6 μg / larve entraînent la mort ou des difformités de tous les individus traités. Les pré-pupes et les pupes de moins de 24 heures sont aussi sensibles aux applications topiques, mais les pupes de 6-7 jours semblent être complètement insensibles.

MICROSPOROGENESE CHEZ LE MURIER, *MORUS ALBA* L.*

FONSECA T. C.¹, BANDEL G.², CUCO S. M.²

1. Divisao de Zootecnia Diversificada, D3, IZ, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13460-000 Nova Odessa, São Paulo, Brésil.
2. Departamento de Genetica, Escola Superior de Agricultura « Luiz de Queiroz », USP, Av. Padua Dias 11, CP 83, CEP 13.400-970 Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Nous avons réalisé l'étude de la microsporogénèse chez le clone IZ 15/7 du mûrier, Morus alba L., dans le but d'observer les phases méiotiques sur le matériel venu du programme d'amélioration de l'Institut de Zootecnie, Sao Paulo, Brésil. On a confectionné des lames par la méthode de squash (écrasement). Aucune irrégularité n'a été observée pendant la division avec la formation des tétrades avec des noyaux normaux. Après la formation des microspores, on peut observer une cytotoxicité dans quelques cellules.

Mots clé : *Morus alba*, microsporogénie, méiose.

INTRODUCTION

La première recherche cytologique sur les plantes du genre *Morus* L. a été réalisée en 1909 par Tahara (Sinoto, 1929) qui a observé qu'elles avaient en général un nombre haploïde de chromosomes égal à 14 ($2n = 28$). Plus tard, en 1920, Osawa aussi en travaillant avec quelques espèces de ce genre a observé des diploïdies et des triploïdies. Ces deux chercheurs avaient des avis divergents sur la taille des chromosomes, Tahara a relaté la présence de 4 chromosomes plus grands et Osawa de seulement deux (Sinoto, 1929).

Datta (1954) a étudié la méiose de quelques espèces de *Morus* et a confirmé l'extrême différence de taille parmi les 12 petites paires et les 2 grandes paires, qui avaient déjà été nommées par Osawa (1920), autosomes et allosomes, respectivement. Les quatre allosomes pourraient, pendant la division méiotique, produire des dyades avec un nombre régulier ou irrégulier de chromosomes comme 13, 14 ou 15, ce qui pourrait provoquer une méiose régulière ou irrégulière.

Basavaiah et coll. (1989) et Basavaiah et coll. (1990) ont étudié les mûriers, *M. serrata* Roxb ($2n = 6x = 84$) et *M. nigra* ($2n = 22x = 308$) respectivement. Dans les deux cas, ils ont observé le développement d'une méiose normale, dans le cas de la diacinese de *M. Serrata* ils ont observé la formation de 42 bivalents. Plusieurs types d'associations chromosomiques de uni à hexavalents, ont été observés au cours de la diacinese et de la métaphase I, mais leur fréquence était faible (0,04 % à 1,28 % respectivement), par rapport à la formation des bivalents (48 %). Des observations semblables ont aussi été faites chez *M. Nigra*.

* Travail partiel de doctorat à l'ESALQ, USP, Piracicaba, SP, Brésil avec bourse du CNPq.

Seuls les travaux de Basavaiah et coll. (1989) et Basavaiah et coll. (1990) présentent des microphotographies des figures méiotiques, mais aucune avec la séquence complète des phases de la méiose comme dans ce travail.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'étude de la microsporogénèse chez le clone IZ15/7 (Fonseca et coll., 1994) de *Morus alba* L., on a utilisé des bourgeons floraux recueillis avant l'anthèse, d'une taille moyenne de $2,10 \pm 0,26$ mm, mesurée au diamètre le plus grand.

Les inflorescences ont été recueillies à chaque heure de 5 h 30 jusqu'à 22 h 30 pendant 3 jours consécutifs, en Septembre 1994 et immédiatement 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.

La méthode de squash (écrasement) a été utilisée pour la préparation des lames. Dans cette méthode, les anthères sont écrasées dans un carmin propionique à 2 %. Les lames considérées comme satisfaisantes sont séparées des lamelles dans l'acide acétique à 45 % et séchées à l'air avant d'être montées dans du baume du Canada.

Cette méthode détruit les tissus mais permet une visualisation de la cellule entière, et en plus est plus efficace et plus rapide pour les études des figures méiotiques dans les cellules sexuelles mâles.

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

RESULTATS ET DISCUSSION

La microsporogénèse est l'opération de formation du grain de pollen. Cette opération se produit dans les anthères, la partie des étamines qui contient les grains du pollen. La division est le point culminant d'une succession d'opérations qui arrivent discrètement ou pas dans la cellule avec le but de sa division. Le cycle cellulaire peut être divisé en deux parties : l'interphase (pendant laquelle la duplication de l'ADN se produit) et la division proprement dite.

Les sous-phases de la prophase I sont montrées dans les figures 1 à 5, la phase leptotène, la phase zygotène, la phase pachytène, la phase diplotène et la phase de diacinese respectivement. Sur la prophase I on peut noter la condensation progressive des chromosomes qui sont bien étendus au leptotène, au début de la synapse dans le zygotène, bien compactés et colorés avec une bonne visualisation en phase pachytène et aussi en phase de diacinese où on peut distinguer 12 bivalents et un tétravalent en anneau et où on peut compter les 28 chromosomes de l'espèce.

Pendant la phase de condensation maximale, la métaphase (figure 6) on observe la taille réduite des chromosomes, c'est à dire que, quelques uns sont encore unis ou regroupés.

Dans l'anaphase I (figures 7 et 8) quand les homologues sont séparés, on peut encore noter quelques chromosomes en retard (trainards) entre la plaque équatoriale et les pôles.

La seconde division se produit sans division du cytoplasme, c'est la cytokinèse. Les microphotographies de la prophase II, de la métaphase II, de l'anaphase II, de la télophase II peuvent être vues sur les figures 9, 10, 11, 12 et 13, respectivement. La figure 13 montre une télophase avec 4 noyaux haploïdes normaux formés.

Pendant les deux divisions aucune irrégularité n'a été observée, ce qui confirme les observations de Basavaiah *et al.*, (1989) et Basavaiah *et al.* (1990) qui même en travaillant avec des espèces polyploïdes n'ont pas rapporté d'irrégularités. Après la formation des microspores, on observe exceptionnellement une cytomixie dans quelques cellules (Figure 14)

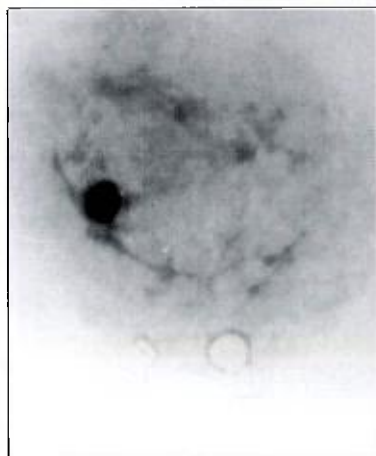


Fig 1. Leptotène / *Leptotene*

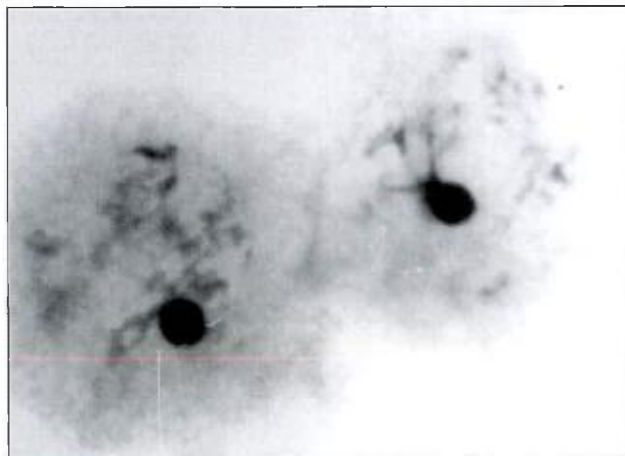


Fig 2. Zygotène / *Zygotene*

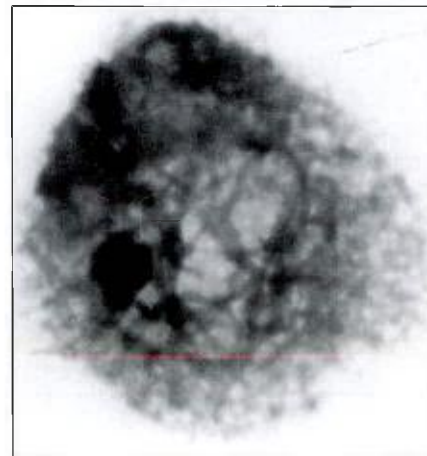


Fig 3. Pachytène / *Pachytene*

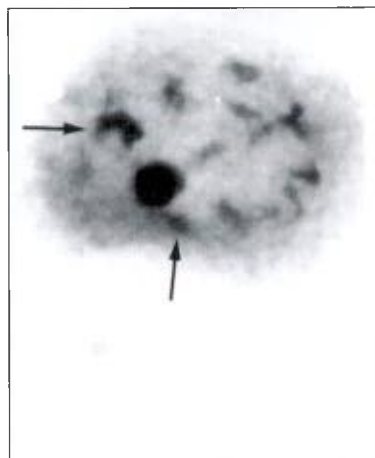


Fig 4 . Diplotène / *Diplotene*

Figures 1 à 5
Séquences de la prophase I chez le
clone du mûrier IZ15/7 *Morus alba*.

Figures 1 to 5
Subphases of Prophase I in the
mulberry clone IZ15/7- *Morus alba*.

5 μ m:

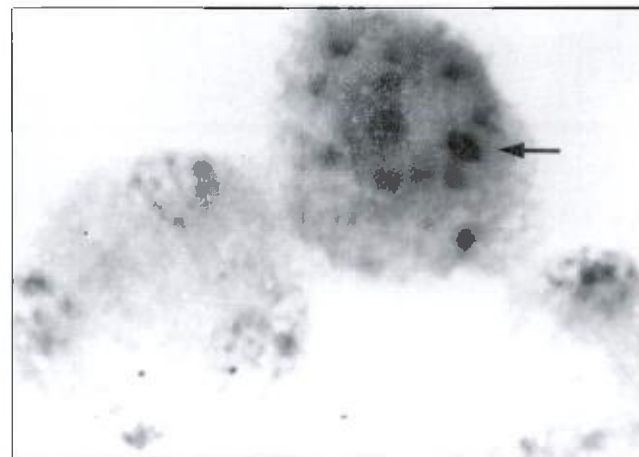


Fig 5. Diacinèse / *Diacinese*

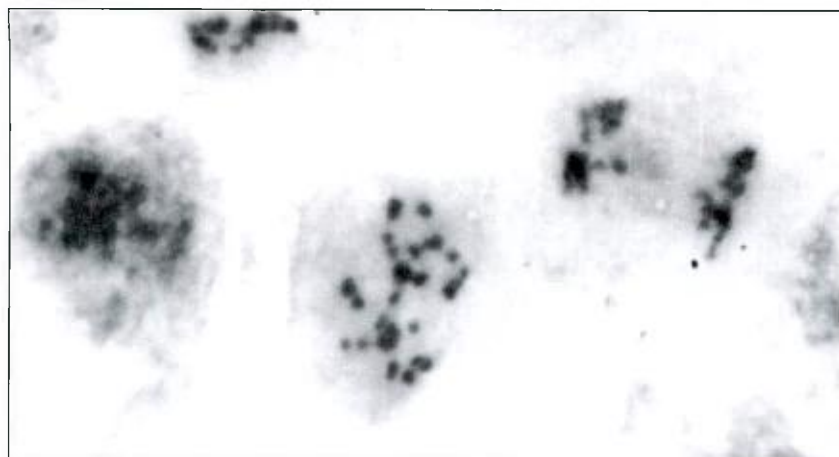


Fig 6.
Metaphase I.

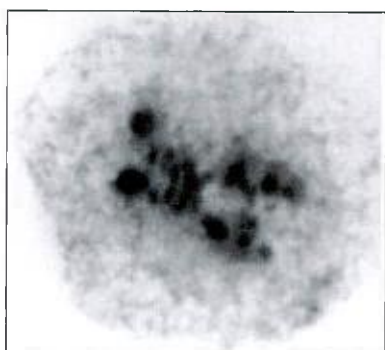


Fig 7. Début de l'anaphase I.
Fig 7. Beginning of anaphase I.

Figures 6-8 Phases de la méiose I (métaphase et anaphase)
chez le clone IZ 15/7 du mûrier *Morus alba* L.

*Figures 6-8 Phases of the meiosis I (metaphase and anaphase) in IZ 15/7 clone of mulberry *Morus alba* L.*

5 µm:

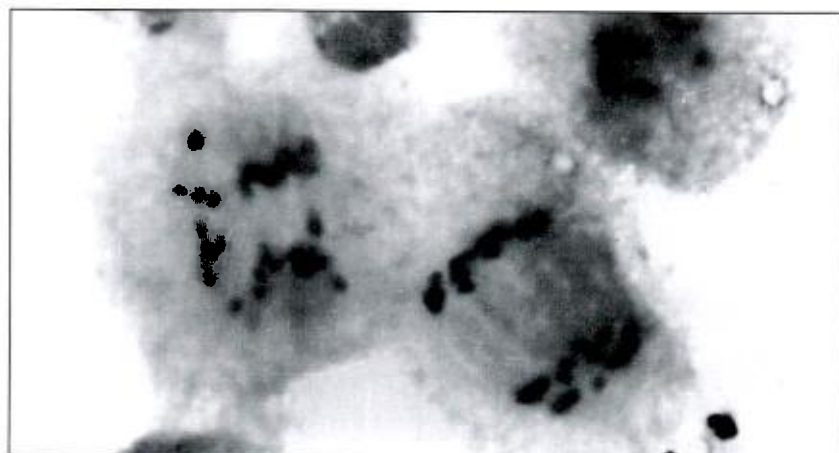


Fig 8. Fin de
l'anaphase I.
*Fig 8. End of
anaphase I.*

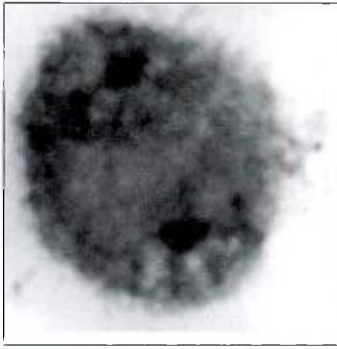


Fig 9. Prophase II.

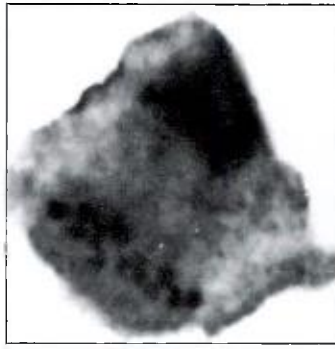


Fig 10. Metaphase II.

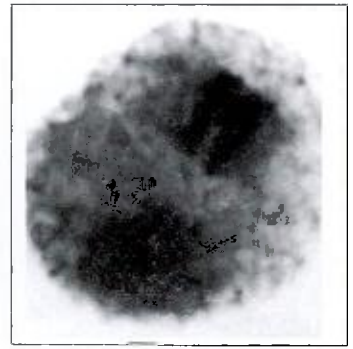


Fig 11. Début de l'anaphase II.
Fig 11. Beginning of anaphase

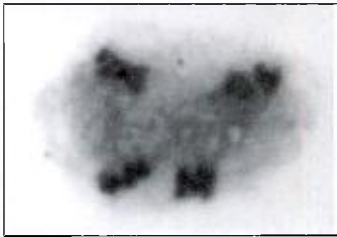


Fig 12. Fin de l'anaphase II
Fig 12. End of anaphase II.

Figures 9-13 Phases de la méiose II chez le clone IZ15/7 du mûrier *Morus alba* L.

Figures 9 -13 Phases of the meiosis II in clone IZ15/7 of mulberry Morus alba.L.

5 µm:

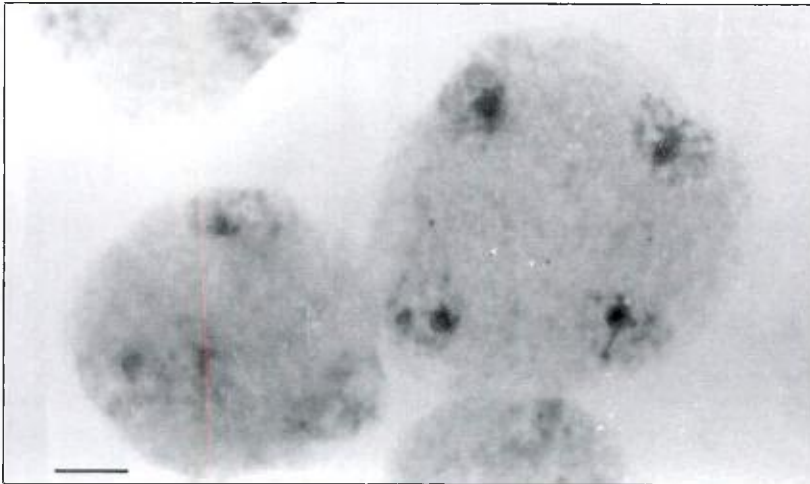


Fig 13. Télophase II / *Telophase II.*



Figure 14. Cytomixie chez le clone IZ15/7 du mûrier *Morus alba* L.

Figure 14. Cytomixy in clone IZ15/7 of mulberry *Morus alba* L.

REFERENCES

- BASAVAIAH, DANDIN S. B., MALA V. R. Microsporogenese in hexaploïde *Morus serrata* Roxb. *Cytologia* 54(4) 747-751, 1989.
- BASAVAIAH, DANDIN S. B., ANIL-DHAR, SENGUPTA K. Meiosis in natural decosaploid (22x) *Morus nigra* L. *Cytologia* 55(3) 505-509, 1990.
- DATTA M. Cytological studies on two species of *Morus*. *Cytologia* 19(1) 86-95, 1954.
- FONSECA T. C., ALMEIDA J. E., OKAMOTO F. Le programme d'amélioration du mûrier dans l'Etat de São Paulo au Brésil. *Sericologia* 34(4) 727-733, 1994.
- LEWIN B., *Genes* VI Oxford University Press, 1996, 1260p.
- OSAWA I. Cytological studies in *Morus* with special reference to triploid mutants. *Bulletin Imperial Sericulture Experimental Station* 1, 318-369, 1920.
- SINOTO Y. Chromosome studies in some dioecious with special reference to allosomes. *Cytologia* 1(1) 109-191, 1929

MICROSPOROGENESIS IN THE MULBERRY*

FONSECA T. C.¹, BANDEL G.² & CUCO S. M.²

1. Divisão de Zootecnia Diversificada, D3, IZ, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13.460-000 Nova Odessa, São Paulo, Brazil.

2. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Av. Pádua Dias 11, CP 83, CEP 13.400-970 Piracicaba, São Paulo, Brazil.

*A study about microsporogenesis in the IZ 15/7 clone of the mulberry, **Morus alba** L. was carried out in order to observe the meiotic stages on the material of the improvement programme from the Zootecny Institute, São Paulo, Brazil. We made slides through the squash method. No irregularities were observed during the division with the formation of tetrads with normal nucleus. After the formation of microspores, a few cells showed cytotoxicity.*

INTRODUCTION

The first cytological research about plants of the genus *Morus* L. was done in 1909 by Tahara (Sinotô, 1929) who observed that they generally had a haploid number of chromosomes equal to 14 ($2n = 28$). Later, in 1920, Osawa who also worked on some species of this kind, observed diploides and triploides. These two researchers had different opinions about the size of the chromosomes, Tahara related the presence of four bigger chromosomes and Osawa related only two bigger chromosomes (Sinotô, 1929).

Datta (1954) studied the meiosis of some species of *Morus* and confirmed the extreme difference of size between the 12 small pairs and the 2 big pairs, which had already been called by Osawa (1920), autosomes and allosomes respectively. The four allosomes could, during the meiotic division, produce dyads with a regular or irregular number of chromosomes like 13, 14 or 15, which could cause a regular or irregular meiosis.

Basavaiah *et al.* (1989) and Basavaiah *et al.* (1990) studied mulberries, *M. serrata* Roxb. ($2n = 6x = 84$) and *M. nigra* L. ($2n = 22x = 308$) respectively. In both cases, they observed the development of a normal meiosis, in the case of the *M. serrata* diakinesis, they observed the formation of 42 bivalents. Several types of chromosomal associations, from univalent to hexavalent, had been observed on the diakinesis and metaphase I, but their frequency was low (from 0,04 % to 1,28 %, respectively), compared to the formation of bivalents (48 %). Similar observations were made on *M. nigra*.

Only the works of Basavaiah *et al.* (1989) and Basavaiah *et al.* (1990) brought microphotographies of meiotic figures, but no figure with the complete sequence of the meiosis stages was presented like in this paper.

* Partial doctorate's work at the ESALQ, USP, Piracicaba, SP, Brazil with a grant from the CNPq.

MATERIALS AND METHODS

For the study about microsporogenesis in the IZ15/7 clone (Fonseca *et al.*, 1994) of *Morus alba* L., we used floral buds picked before anthesis, with a medium size of 2.10 ± 0.26 mm, measured with the largest diameter.

The inflorescences were picked every hour from 5.30 am to 10.30 pm, during the following three days, in september 1994, and immediately fixed in the Carnoy solution (ethanol: acetic acid 3:1.) for 24 hours and permanently kept in alcohol 70 % (v/v) at 10° C.

The *squash* method was used for the preparation of the slides. In this method, the anthers were squashed in 2 % propionic carmine. The slides considered as satisfactory were separated from lamelles in 45 % acetic acid and air dried before being set in Canada balsam.

This method destroyed the tissues but allowed a visualization of the whole cell, and it was also more efficient and rapid for the studies about meiotic figures in male sexual cells.

The meiotic figures were photographed with an Olympus microscope with optovar 1,25X on a Copexpan (Agfa) film and green Olympus filter.

RESULTS AND DISCUSSION

Microsporogenesis was the process of the pollen grain formation. This process occurred in the anthers, the stamen part which hold the pollen grains. The action of division was the highest point of a series of operations which discreetly arrived or not in the cell with the purpose of its division. The cellular cycle could be divided in two parts: the interphase (during which the discreet operations of the DNA duplication occurred) and the division properly speaking.

The subphases of Prophase I were presented in figures 1 to 5, Leptotene, Zygotene, Pachytene, Diplotene and Diakinesis, respectively. On Prophase I, we could see the progressive condensation of the chromosomes which were well tightened to Leptotene, at the beginning of the synapse in the Zygotene, well compacted and colored with a good visualization on the Pachitene and also on the Diakinesis, we could note 12 ring-like bivalents and one ring like tetravalent, where we could see the 28 chromosomes of the species.

During the maximum condensation phase, the Metaphase (Fig. 6), we could observe the reduced size of the chromosomes, i. e. some were still united or gathered.

During the Anaphase (Figures 7 and 8) when the homologues were separated, we could still observe some late chromosomes (laggards) between the equatorial plate and the poles.

The second division took place without the cytoplasmic division, i. e. the cytokinesis. The microphotographies of Prophase II, Metaphase II, Anaphase II, Telophase II could be observed in figures 9, 10, 11, 12 and 13 respectively. Figure 13 showed a Telophase with the 4 haploid normal formed nucleus.

During both divisions, no irregularities were observed, which corroborated the comments of Basavaiah *et al.* (1989) and Basavaiah *et al.* (1990), who even if they worked with polyploid species, did not relate irregularities. After the formation of microspore, a few cells exceptionally presented cytomixis (Fig. 14).

GENETIC DIVERGENCE IN THE MULBERRY

FOTADAR R. K. & DANDIN S. B.

Research Extension Centre, Central Sericultural Research and Training Institute,
Kathua -184101, Jammu, India.

Genetic divergence, as measured by Mahalanobis D² statistics was studied in 58 genotypes of mulberry. All the genotypes got grouped into 23 clusters, twenty two in cluster I, eleven in cluster II, three each in cluster IV and IX and one each in the rest of the clusters. The clustering pattern showed that the genotypes fall in clusters according to their geographical origin. The cluster means of the different characters suggest a wide range of variation for all the characters within and among the clusters. The analysis for estimating the contribution of various characters towards the expression of genetic divergence indicated that total shoot length, weight of 100 leaves, leaf area, rooting, height of the plant, number of leaves per metre shoot length, number of shoot per plant contribute maximum to the genetic divergence in the material and hence must be given greater attention while selecting. The observation on the criterion for selection of genotypes as parents for hybridisation revealed that 5 genotypes included in cluster IV and XVII and also XVII and XIX. Hence, it would be logical to incorporate such genotypes in the future hybridisation program.

Keywords: Genetic divergence, cluster, genotype.

INTRODUCTION

Genetic divergence measuring the heritability relationship among the populations had been used as an important tool in crop improvement program. Expression of heterosis and hybrid vigour mainly depends on the genetic closeness of the parents. Crossing between the most genetically divergent parents for recombination of genes has proved most effective. Hence, study on genetic divergence is a pre-requisite and such type of studies are not carried out earlier for mulberry improvement.

D² statistics, based on multivariate analysis as developed by Mahalanobis (1928) has been adopted by many workers for different crops to study the genetic divergence. Murthy and Arunachalam (1966) and Jain *et al.*, (1981) stated the importance of studying the genetic divergence in breeding for high yielding varieties. Jolly *et al.*, (1989) used D² analysis in *Bombyx mori*. Kartiyar and Singh (1989) studied the genetic divergence in 40 indigenous and exotic strains of *Vicia faba*. Sarkar (1990) suggested that the available basic material need to be clustered before preparing a breeding plan. D² analysis was studied to be most helpful in such case and used it in tasar silkworm (*A. mylitta*) for his studies. Genetic divergence for 10 characters in 3 genotypes of chilli (*Capsicum annum* L.) were studied by Varalakshmi and Babu (1991). Govindan *et al.*, (1992) subjected a collection of eighteen diverse multivoltine strains of silkworm to understand the genetic divergence among the genotypes.

MATERIALS AND METHODS

The material for the present investigation comprised 58 genotypes of diverse origin, out of which 33 were of temperate and 25 of tropical origin. The experiment was carried out during 1989 to 1990 involving four crops and under temperate conditions of Kashmir. The plantation was maintained as per the recommended practices for cultivation under temperate conditions (Fotadar *et al.*, 1989, Ahsan M. M *et al.*, 1990). The genotypes were planted at a spacing of 90 × 180 cm and nitrogen @ 300 kg/ha/yr, potash @ 120 kg/ha/yr, phosphorus @ 120 kg/ha/yr and farm yard manure @ 20 tons/ha/yr were applied as a common dose of fertiliser.

The mean temperature recorded during the course of study ranged from -1.5 ° to 30.9 ° and rainfall from 26.9 to 76.6 mm. The observation on number of shoots per plant, total shoot length, leaf area, 100 leaf weight, height of the plant, leaf petiole ratio, rooting and leaf yield were used for assessing the degree of diversity. D2 analysis based on multivariate analysis. The divergence was obtained as the sum of squares of the difference in the values of the corresponding transformed genotypes. Based on D2 values, the 58 genotypes were grouped into different clusters using Touchers method (Singh and Choudhary, 1979; Rao, C. R., 1952).

The data on number of shoots per plant and total shoot length were recorded from nine randomly selected plants from four crops at the time of harvesting leaves and the average of four observations was calculated. Total shoot length was measured taking the length of all the primary branches. Randomly selected 100 leaves comprising tender, medium and coarse from nine tagged plants were harvested at the time of respective harvesting seasons and stored in polythene covers. Leaf area was calculated by harvesting 15 leaves each of tender, medium and coarse and weighed separately. Seventy five discs were obtained by punching the leaf at five different places and area and weight of the discs was recorded (Anonymous, 1983).

$$\text{Leaf area} = \frac{\text{Area of 75 discs}}{\text{Weight of 75 discs}} \times \text{fresh weight of 15 leaves.}$$

Leaf petiole ratio was observed based on the fresh weight of leaf lamina and petiole. Hundred fresh leaves were randomly selected from each plant covering all growth stages and weight was taken immediately after harvest. Petioles of all the leaves were cut and weighed. The ratio was calculated by dividing the weight of fresh lamina from that of petiole. For calculating internodal distance, total length of 15 randomly selected shoots of each genotype was measured and number of leaves was noted. The total length of shoots divided by total number of leaves gave the internodal distance. Leaves were harvested 60 days after top clipping for spring and 75 days after pruning in autumn from the nine tagged plants and their weight was recorded. The average leaf yield per plant was calculated based on four harvests. Height of the plant was recorded from the base upto the maximum length achieved by a shoot from nine randomly selected plants.

Propagation parameter namely rooting was observed during spring season of both years. Seventy five stem cuttings each in three replications were planted at a spacing of 10 × 20 cm in a randomised block design in nursery beds. Nursery beds were maintained as per the recommended methods (Dandin, 1986). Rooting was recorded after 90 days of planting based on survival and the average of two years data was taken.

RESULTS

Analysis of variance revealed highly significant differences among the genotypes for all the variables indicating the existence of genetic variability among the genotypes. The D2 values varied from 0.0 to 18.7 (Table III). On the basis of relative magnitude of D2 values, the genotypes were grouped into 23 clusters with the assumption that those within the clusters have lower D2 values among themselves than those belonging to two different clusters. Twenty two genotypes were

accommodated in cluster I, eleven in cluster II, three each in cluster IV and IX and one each in rest of the clusters as indicated in table II.

The maximum genetic divergence was observed between the genotypes of cluster I and XVII (69.1) followed by between XVII and IX (Table III) and least genetic divergence ranged between cluster III and V (12.0). The intracluster divergence ranged from 0.0 (lowest) in cluster III, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XXI, XXII, XXIII and highest of 18.7 in cluster II (Table III). Cluster IV had high mean value for total shoot length, height of the plant, internodal distance, cluster VI for leaf yield; cluster XVI for rooting and number of shoots per plant; cluster XIX for leaf petiole ratio; cluster XXII for leaf area, weight of 100 leaves; cluster XXIII for number of leaves per metre shoot length. It can be seen from table III that there is a wide range of variation in cluster means for the characters. Cluster X had the minimum value to number of shoots per plant and rooting, cluster XII for total shoot length, height of the plant, internodal distance; cluster XVI for number of leaves per metre; cluster XXIII for weight of 100 leaves and internodal distance; cluster XII for internodal distance; cluster XV for leaf area and cluster X for leaf yield (table IV). The range of variation within different clusters as regards number of shoots per plant, total shoot length, number of leaves per metre shoot, height of the plant, internodal distance, weight of 100 leaves, leaf yield and rooting is depicted in table V. Maximum variation was recorded in rooting within the cluster I to the extent of 0.50 to 62.33 (12366 %) followed by 407.1 to 2492.4 (512%) in total shoot length in cluster II. Variation in rest of the clusters was recorded negligible (Table V).

The analysis for estimating the contribution of various characters towards the expression of genetic divergence indicated that shoot length (11.87%), weight of 100 leaves (21.36%), leaf area (20.94%), rooting (13.49%), height of the plant (8.94%) and number of leaves per metre shoot length (5.94%), number of shoots per plant (5.76) contribute maximum to the genetic divergence in the material (Table VI).

A perusal of Table III reveals that genetically more divergent genotypes are included in cluster IV and XVII and also XVII and XIX. Such genotypes can be incorporated in an hybridisation program.

DISCUSSION

The clustering pattern showed that the genotypes fall in clusters according to their geographical origin. Cluster I comprised 22 genotypes and all of them are of Japanese origin and cluster II comprised 11 genotypes and all of which are of Indian origin (South India and West Bengal). Rest of the clusters comprised only one genotype each of which is of different origin except cluster IV and IX which comprised of 3 genotypes both tropical and temperate genotypes and of China/India and Japanese/India origin respectively. The reason for this can be attributed in the character constellations that might be associated with a particular region and lose their individuality under local climatic interference (Kartiyar and Singh, 1989). Sindhu (1985) also did find parallelism in fababean. The results obtained by Varalakshmi and Babu (1991) indicated firm relationship between genetic diversity and geographical distance in chilli. Panwar (1970) suggested the Vavilovian way of thought that the genetic diversity is broadly attributed to geographical diversity. The maximum variation within the clusters was recorded in rooting and total shoot length in cluster I and II respectively. The reason for the wide range of variation recorded in cluster I as regards rooting may be attributed to the poor response of rooting through stem cuttings of Japanese genotypes except Chinese white (Fotadar, 1996) since most of which have fallen in cluster I.

The analysis for estimating the contribution of various characters towards expression of genetic divergence indicated that total shoot length, weight of 100 leaves, leaf area, rooting, height of the plant, number of leaves per metre shoot length, number of shoots per plant contribute maximum (88.3%) to the genetic divergence in the material (table VI). Hence, it is clear they are the principal attributes of the genetic architecture of mulberry which must be given greater attention while selecting.

Table I. Details of 58 mulberry genotypes.

Tableau I. Information sur 58 génotypes de mûriers.

Accession no.	Name	Origin	Species
<i>No. d'accension</i>	<i>Nom</i>	<i>Origine</i>	<i>Espèce</i>
G1	Goshoerami	Japan / Japon	<i>M. multicaulis</i>
G2	Rokokuyaso	Japan / Japon	<i>M. multicaulis</i>
G3	Chinese white	China/ Chine	<i>M. alba</i>
G4	Ichinose	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G5	Togowase	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G6	Serpentian	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G7	Chattatul Zangir	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G8	Brantul Kashmir	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G9	Italian sarnal	Italy / Italie	<i>M. alba</i>
G10	Zagatul	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G11	Kokuso-20	Japan / Japon	<i>M. maulicaulis</i>
G12	Kokuso-21	Japan / Japon	<i>M. maulicaulis</i>
G13	Kokuso-27	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G14	Kairyoroso	Japan / Japon	<i>M. maulicaulis</i>
G15	Kasuga	Japan / Japon	<i>M. maulicaulis</i>
G16	Kairyoronezaemigaeshi	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G17	Obowase	Japan / Japon	<i>M. bombycis</i>
G18	Shimonouchi	Japan / Japon	<i>M. bombycis</i>
G19	Sanish-5	Russia / Russie	<i>M. alba</i>
G20	Tsukasakwa	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G21	Limoncina	Italy / Italie	<i>M. alba</i>
G22	Enshatakasuke	Japan / Japon	<i>M. bombycis</i>
G23	Chattatul	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G24	Himachal local	India / Inde	<i>M. maulicaulis</i>
G25	Tomeiso	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G26	Ichehci	Japan / Japon	<i>M. alba</i>
G27	Senmatsu	Japan / Japon	<i>M. bombycis</i>
G28	Botatul	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G29	Zangabud	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G30	Lajward	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G31	Nadigam	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G32	Chinarpati	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. kayayama</i>
G33	French	France	<i>M. alba</i>
G34	kanva-2	India (Karnataka) / Inde	<i>M. indica</i>
G35	Tr-8	India (West Bengal) Inde (Bengale Occidental)	<i>M. alba</i>
G36	Tr-10	India (West Bengal) Inde (Bengale Occidental)	<i>M. alba</i>
G37	C-4	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G38	C-763	India (West Bengal) Inde (Bengale Occidental)	<i>M. alba</i>

Table I. (continued).

Tableau I. (suite)

Accession no.	Name	Origin	Species
<i>No. d'accession</i>	<i>Nom</i>	<i>origine</i>	<i>Espèce</i>
G39	C776	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G40	C-1735	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G41	Tr-4	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G42	Acc-31	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. alba</i>
G43	Mandalay	Burma	<i>M. india</i>
G44	ACC-33	India (Kashmir) / Inde (Cachemire)	<i>M. alba</i>
G45	Female local	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. indica</i>
G46	Mysore local	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. indica</i>
G47	BC-259	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G48	Acc no. 32	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. indica</i>
G49	S-30	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. alba</i>
G50	S-36	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. alba</i>
G51	S-41	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. alba</i>
G52	S-54	India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	<i>M. alba</i>
G53	S-146	India (Dehradun) / Inde (Dehradun)	<i>M. alba</i>
G54	S-799	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G55	S-1301	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G. 56	S-1531	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G57	S-1635	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>
G58	S-1708	India (W. Bengal) / Inde (Bengale Occidentale)	<i>M. alba</i>

The choice of the characters for such studies is quite important as pointed out by Sokal and Daley (1961). They stated that the original aim of the investigation cannot be achieved unless component characters of yield are taken into account because of their economic importance under crop improvement. It can be seen from table III that there is a wide range of variation in cluster means for the characters. The large variability encountered among the characters may be because of the highly heterozygous nature of the genus. The unrestricted mating could have contributed to this large variation, thus large number of clusters were recorded from the present study.

Table II. Composition of clusters in mulberry genotypes.

Tableau II. Composition des groupes de génotypes du mûrier.

Cluster No.	No. of genotypes	Genotypes included	Origin
Groupe No.	Nombre de génotypes	Génotypes inclus	Origine
I	22	Rokokuyaso (G2), Ichinose (G4), Serpentina (G6), Chattal Zangir (G7), Brantul Kashmir (G8), Italian Sarnal (G9) Zagatul (G10), Kokuso-21 (G12), Kairyorozeamigaeshi (G16), Obowase (G17) Shimonouchi (G18), Sanish-5 (G19), Tsukasakawa (G20), Limoncina (G21), Enshatakasuke (G22), Himachal local (G24) Botatul (G28), C-763 (G38), C-1735 (G40), Acc-31 (G42), Acc-32 (G48), Acc-33 (G44),	Japan, Italy / Japon, Italy Kashmir / Cachemire
II	11	Kanva2 (G34), Be-259 (G47), Acc-31 (G46), S-30 (G49), S-36 (G50), S-41 (G51), S-146 (G53), S-799 (G54), S-1531 (G56), S-1635 (G57) and S-1708 (G58)	India (South India) / Inde (Sud)
III	1	Female local (G45)	South India / Sud de l'Inde
IV	3	Chinese white (G3), Tr-10 (G36), C4 (G37)	China/ India / Chine, Inde
V	1	Nadigam (G31)	India (Kashmir) Inde (Cachemire)
VI	1	Mandalay (G43)	Burma
VII	1	S-1301 (G55)	India (Bengal) / Inde (Bengale)
VIII	1	Kasuga (G15)	Japan / Japon
IX	3	Kokuso-20 (G11), Senmatsu (G27), Tr-4 (G41)	Japan / Japon
X	1	Lajward (G30)	India (Kashmir) Inde (Cachemire)
XI	1	Zangabud (G29)	India (Kashmir) Inde (Cachemire)
XII	1	French (G33)	France
XIII	1	Togowase (G5)	Japan / Japon
XIV	1	C-776 (G39)	India (Bengal) / Inde (Bengale)
XV	1	Ichheci (G26)	Japan / Japon
XVI	1	Tr-8 (G35)	India (Bengal) / Inde (Bengale)
XVII	1	Chattatul (G23)	India (Kashmir) Inde (Cachemire)
XVIII	1	Kairyoro (G14)	Japan / Japon
XIX	1	S-54 (G52)	India (Karnataka) / Inde
XX	1	Kokuso-27 (G13)	Japan / Japon
XXI	1	Tomeiso (G25)	Japan / Japon
XXII	1	Goshoerami (G1)	Japan / Japon
XXIII	1	Chinarpati (G32)	India (Kashmir) Inde (Cachemire)

Table III. Showing average intracluster and intercluster values.

Tableau III. Valeurs moyennes intra-groupe et inter-groupe.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
I	17.7	30.7	20.9	30.3	22.5	23.5	21.2	22.9	28.3	21.5	26.3	30.1	26.1
II		18.7	24.8	32.1	25.3	36.1	27.9	33.6	24.5	34.0	40.6	26.1	36.1
III			0.0	34.2	12.0	28.0	17.8	29.3	28.6	14.3	22.8	14.8	35.6
IV				13.9	35.6	25.9	29.7	38.9	26.8	40.6	42.0	41.3	30.8
V					0.0	31.3	20.9	28.9	26.6	18.0	26.8	17.8	36.4
VI						0.0	22.4	33.1	35.8	30.3	31.9	37.9	32.5
VII							0.0	30.8	33.3	18.9	19.1	30.2	32.1
VIII								0.0	30.8	27.7	35.8	35.0	19.8
IX									16.5	36.7	43.3	30.0	30.1
X										0.0	14.0	24.3	35.1
XI											0.0	35.5	37.6
XII												0.0	43.6
XIII													0.0

	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII
I	27.0	33.0	34.1	24.9	32.2	49.0	29.3	33.9	45.2	38.2
II	22.2	25.7	28.0	47.6	39.0	30.0	30.4	33.6	44.6	29.2
III	20.5	28.8	32.1	33.0	40.5	42.0	33.3	37.2	52.8	27.2
IV	29.4	39.0	23.0	69.1	28.3	46.0	29.8	45.7	35.7	21.0
V	21.9	27.5	33.4	34.3	41.6	41.0	35.9	36.3	52.9	29.3
VI	28.8	35.4	30.6	23.8	36.1	53.7	35.5	43.7	50.4	25.6
VII	28.9	36.4	35.5	29.8	33.9	50.2	34.3	40.9	47.8	39.0
VIII	34.3	33.3	42.5	32.2	34.0	51.6	30.5	19.8	43.0	45.5
IX	22.2	27.5	24.7	43.4	33.6	32.8	25.6	32.6	37.2	30.2
X	31.9	38.0	43.0	26.6	41.7	53.8	38.6	39.4	55.6	37.9
XI	40.2	48.1	48.8	26.2	40.6	60.9	41.7	47.9	56.2	44.9
XII	30.0	25.4	33.0	43.9	49.7	34.0	39.1	38.8	58.7	22.2
XIII	39.8	42.9	42.6	35.0	17.5	56.1	21.8	30.5	26.5	47.4
XIV	0.0	15.1	15.3	40.4	44.6	27.9	34.3	35.8	52.3	27.5
XV		0.0	24.9	46.6	50.9	27.1	39.6	29.2	56.5	36.0
XVI			0.0	45.9	44.2	29.8	36.4	43.8	59.3	34.0
XVII				0.0	41.1	66.4	43.6	46.7	56.0	53.9
XVIII					0.0	58.5	19.4	43.7	20.6	47.0
XIX						0.0	45.0	46.0	59.1	30.5
XX							0.0	35.6	28.5	33.8
XXI								0.0	45.8	48.9
XXII									0.0	54.8
XXIII										0.0

Table IV. Cluster means for different characters in mulberry genotypes.

Tableau IV. Moyennes de groupes pour différents caractères chez les génotypes du mûrier.

SL No	Number of shoots per plant	Total shoot length (cm)	Number of leaves per metre shoot	Height of the plant (cm)	Weight of 100 leaves (g)	Internodal distance (cm)	Leaf petiole ratio	Leaf area (Cm ²)	Rooting %	Leaf yield (Kg/Plant)
SL No	Nombre de pousses par plant	Longueur totale des pousses (cm)	Nombre de feuilles pour 1 mètre de pousse	Hauteur du plant (cm)	Poids de 100 feuilles (g)	Distance internodale (cm)	Rapport pétioles / feuille	Surface foliaire (Cm ²)	Racinement %	Rendement en feuilles (Kg/Plant)
I	25.1	1975.5	22.5	259.1	408.5	4.4	7.6	105.6	12.79	1.76
II	13.8	906.7	21.5	214.1	430.9	4.7	10.5	122.5	41.0	0.94
III	9.2	667.0 ^{XX}	22.9	174.9 ^{XX}	280.0	3.9 ^{XX}	9.2	88.0	15.5	0.44
IV	28.9	3196.1	19.0	310.4	410.9	5.2	7.7	188.2	60.1	2.57
V	14.6	754.9	23.9	167.9	288.0	4.2	9.5	83.0	2.2	0.63
VI	32.1	3153.0	21.0	276.1	385.0	4.7	7.1	97.7	64.5	2.67
VII	14.2	843.7	21.3	184.7	364.0	4.5	6.9	101.0	46.7	0.50
VIII	19.9	1571.3	25.3	261.1	570.7	3.7	7.8	82.0	1.2	2.23
IX	29.3	2294.4	21.6	247.6	433.7	4.5	10.1	165.2	10.2	2.20
X	7.9 ^X	401.3	25.1	195.5	295.5	4.1	7.6	70.0	0.3 ^X	0.28 ^X
XI	9.4	514.2	21.3	173.1	273.5	4.7	5.8	84.0	1.5	0.36
XII	7.9	318.1 ^X	26.7	137.3 ^X	243.0 ^X	3.5 ^X	11.3	85.0	11.7	0.30
XIII	24.2	2242.2	22.5	288.3	597.3	4.5	6.2	154.0	8.3	0.30
XIV	27.3	2321.9	20.5	261.8	328.0	4.7	11.2	104.0 ^X	41.3	1.64
XV	31.0 ^X	2295.6	21.8	240.4	437.2	4.6	12.3	66.3	41.7	1.92
XVI	32.9 ^X	3376.0	18.8 ^{XX}	306.3	349.0	5.1	11.1	150.0	66.0 ^{XX}	2.19
XVII	32.8	3105.5	22.2	291.7	395.7	4.6	5.4 ^X	80.3	4.5	2.12
XVIII	23.2	2043.3	22.1	279.6	575.7	4.4	5.5	209.0	14.5	2.55
XIX	24.8	1385.3	24.0	214.5	389.0	4.3	14.7 ^X	144.3	45.8	0.78
XX	22.6	1886.3	22.4	276.6	539.0	4.3	8.4	183.0	5.7	2.40
XXI	22.5	1805.3	20.2	267.5	672.2	5.0	10.0	72.7	0.5	2.35
XXII	26.2	2357.1	19.6	283.6	701.3 ^{XX}	5.1	6.2	261.7 ^{XX}	18.2	3.19 ^{XX}
XXIII	9.9	354.8	27.0 ^{XX}	187.0	215.0	3.5 ^X	12.1	156.0	0.38	0.48

X indicates lowest and XX indicates highest mean values / *X indique les valeurs moyennes les plus basses et XX indique les valeurs moyennes les plus élevées.*

Table V. Difference of the characters within the clusters.

Tableau V. Différence des caractères à l'intérieur des groupes.

Cluster No.	No. of genotypes	No. of shoots / plant	Total shoot length (cm)	No. of leaves / metre	Height of the plant (cm)	Weight of 100 leaves (g)	Internodal distance (cm)	Leaf area (cm ²)	Leaf yield (Kg / Plant)	Rooting %	Leaf petiole ratio
Groupe No.	Nombre de génotypes	Nb. de pousses / plant	Longueur totale de la pousse (cm)	Nb. de feuilles / mètre	Hauteur du plant (cm)	Poids de 100 feuilles (g)	Distance internodale (cm)	Surface foliaire (cm ²)	Rendement en feuilles (Kg / Plant)	Racinement %	Rapport pétioles par feuille
I	22	19.65-35.80	1023.9-3090.9	20.2-29.6	216.8-288.3	255.3-672.2	3.6-4.9	66.3-154.0	1.13-2.43	0.50-62.33	6.50-9.99
II	11	7.16-27.94	407.1-2492.4	18.9-25.9	182.5-243.0	303.0-551.0	4.22-5.28	90.0-156.0	0.58-2.17	20.17-54.83	7.22-12.30
III	1	9.22	667.0	22.9	174.9	280.0	3.98	88.0	0.44	15.50	9.19
IV	3	27.60-27.94	2321.9-3242.2	18.6-20.5	261.8-308.8	328.0-433.6	4.69-5.30	104.0-206.3	1.64-2.83	54.00-63.83	6.74-8.36
V	1	14.62	754.9	23.9	167.9	288.0	4.20	83.0	0.63	2.17	9.52
VI	1	32.10	3153.0	21.0	276.1	385.0	4.67	97.7	2.67	64.50	7.08
VII	1	14.21	843.7	21.3	184.7	364.0	4.49	101.0	0.50	46.67	6.90
VIII	1	27.41	2152.6	22.1	267.5	375.1	4.50	129.0	1.74	2.00	8.18
IX	3	23.71-29.82	1506.5-2684.4	19.1-23.9	236.2-278.8	379.0-459.2	3.80-5.21	104.0-156.3	0.99-2.10	2.67-18.67	6.74-8.36
X	1	7.95	401.3	25.1	159.5	295.5	4.10	83.0	0.28	0.24	7.58
XI	1	9.38	514.2	21.3	173.1	273.5	4.70	84.0	0.36	1.50	5.78
XII	1	23.16	318.1	26.7	137.3	243.00	3.50	85.0	0.30	11.67	11.30
XIII	1	30.97	2472.9	22.2	266.5	420.7	4.50	115.3	2.36	3.00	6.96
XIV	1	27.92	2321.9	20.5	261.8	328.0	4.69	104.0	1.64	41.33	11.22
XV	1	16.98	1112.2	20.5	230.5	422.0	4.65	84.0	0.88	14.83	8.31
XVI	1	32.92	3376.0	18.8	306.3	349.0	5.10	150.0	2.19	66.00	11.06
XVII	1	32.84	3105.5	22.2	291.7	359.7	4.60	80.3	2.12	4.50	5.45
XVIII	1	23.25	2034.3	22.1	279.6	575.7	4.40	209.0	2.55	14.50	5.50
XIX	1	24.83	1385.3	24.0	214.5	389.0	4.29	144.3	0.78	45.83	14.70
XX	1	22.62	1886.3	22.4	276.6	539.0	4.30	183.0	2.40	5.67	8.43
XXI	1	17.07	1165.6	19.4	224.4	403.0	5.18	150.0	0.83	69.00	9.09
XXII	1	26.19	2357.1	19.6	283.6	701.3	5.10	261.7	3.19	18.17	6.19
XXIII	1	9.91	354.8	27.0	187.7	215.0	3.50	156.0	0.48	0.00	12.10

Table VI. Contribution of various characters towards the expression of genetic divergence in mulberry genotypes.*Tableau VI. Contribution de divers caractères à l'expression de la divergence génétique chez les génotypes du mûrier.*

S. No.	Character	Contribution
	<i>Caractère</i>	<i>Contribution</i>
1.	Number of shoots per plant / <i>Nombre de pousses par plant</i>	5.76
2.	Total shoot length (cm.) / <i>Longueur totale de pousses (cm.)</i>	11.87
3.	Number of leaves per metre / <i>Nombre de feuilles par mètre</i>	5.94
4.	Height of the plant (cm.) / <i>Hauteur du plant (cm.)</i>	8.94
5.	Weight of 100 leaves (g) / <i>Poids de 100 feuilles (g)</i>	21.36
6.	Internodal distance (cm.) / <i>Distance internodale (cm.)</i>	3.88
7.	Leaf petiole ratio / <i>Rapport pétioles/feuille</i>	4.20
8.	Leaf area (cm ²) / <i>Surface foliaire (cm²)</i>	20.94
9.	Rooting / <i>Racinement</i>	13.49
10.	Leaf yield (kg / plant) / <i>Rendement en feuilles (kg / plant)</i>	4.55

The second criterion for selection of genotypes as parents for hybridisation using D^2 analysis is the intercluster distances. The intercluster distances are obviously genetically more divergent genotypes as included in cluster I and XVII followed by between XVII and IX. Hence it would be logical to incorporate such genotypes in the future breeding programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to Sh. S. Roy, Statistician, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampur for analysing the data.

REFERENCES

- AHSAN M. M., DHAR A., DHAR, K. L. & FOTADAR R. K. (1990) Package of practices for mulberry cultivation under temperate conditions. *Indian Silk* 29(2), 7-12.
 ANONYMOUS (1983) Collection, conservation and evaluation of mulberry varieties. Annual report. Regional Sericultural Research Station, Pampose, p56.

- DANDIN S. B. & JOLLY M. S. (1986) Mulberry descriptor, *Sericologia* 26(4), 465-475.
- FOTADAR R. K., DHAR A. & AHSAN M. M. (1989) Studies on fertilisation, pruning and spacing on mulberry under temperate conditions In: workshop on plant production techniques, publ. by Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore.
- FOTADAR R. K. (1996) Evaluation and utilisation of mulberry gene pool under temperate conditions, Ph.D. thesis, Bangalore University, Karnataka, India.
- GOVINDAN R. (1992) Studies on genetic divergence in silkworm, *Sericologia* 32(4), 539-542.
- JAIN R. C., PANDAY B. D. & PANDE K. (1981) Genetic divergence in chickpea, *Indian J. Genet.*, 41, 220-225.
- JOLLY M. S., DUTTA R. K., NOAMANI M. K. P., IYENGAR M. N. S., NAGARAJ C. S., BASARAJ H. K., KASHAMA G., RAMAMOCHAN R. P. (1989) Studies on genetic divergence in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., *Sericologia* 29(4) 545-553.
- KARTIYAR, R. P., SINGH A. K. (1989) Genetic divergence for yield contributing traits and protein content in faba bean (*Vicia faba* L.) *Indian J. Genet.* 50(4), 310-313.
- MAHALANOBIS P. C. (1928) A statistical study of Chinese head measurement, *Man in India*, 8, 32-64.
- MURTHY D. M., ARUNACHALAM, V. (1966) The nature of divergence in relation to breeding system in some crop plants *Indian J. Genet.* 26A, 188-198.
- PANWAR I. K. (1970) Studies on genetic divergence in chickpea, *Indian Journal of Plant Breeding*, 31(1), 17-21.
- RAO C. R., (1952) Advanced statistical methods in biometric research Ed. John Wiley and sons Inc. New york.
- SARKAR A. (1990) Towards understanding the problems of breeding in mulberry - the factors involved in biometrical studies p. 7-10 In: proceeding of the workshop on biometrical genetics, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- SINDHU J. S., (1985) Multivariate analysis in faba bean (*Vicia faba* L. *Fabis* New Sl. no. 12,5-7).
- SINGH R. K. & CHOUDHARY B. D. (1979) Biometrical methods in quantitative genetics analysis, Kalyani publishers, New Delhi, p 304.
- SOKAL R. R., DALEY H. Y. (1961) An application of factor analysis to insect behaviour. *Sci. Bull. Univ. Kansas* 42, 1067-1097.
- VARALAKSHMI B. & BABU K. H. (1991) Genetic divergence, heritability and genetic advance in chilli (*capsicum annum* L.) *Indian J. Genet.* 51(2), 174-178.

DIVERGENCE GENETIQUE CHEZ LE MURIER

FOTADAR R. K. AND DANDIN S. B.

Research Extension Centre, Central Sericultural Research and Training Institute, Kathua -
184101, Jammu, Inde.

La divergence génétique, telle qu'elle est mesurée par les statistiques D2 de Mahalanobis, a été étudiée chez 58 génotypes du mûrier. Tous les génotypes se regroupent en 23 ensembles. 22 dans le groupe I, 11 dans le groupe II, 3 dans le groupe IV et dans le groupe IX et 1 dans les autres groupes. Le schéma des ensembles montre que les génotypes se groupent selon leur origine géographique. Les moyennes des ensembles des différents caractères présentent une grande amplitude de variation pour tous les caractères à l'intérieur et entre les groupes. L'analyse consistant à estimer la contribution de divers caractères à la manifestation de la divergence génétique indique que la longueur totale des pousses, le poids de 100 feuilles, la surface de la feuille, le racinement, la hauteur de la plante, le nombre de feuilles par mètre de tige, le nombre de tiges par plante contribuent le plus à la divergence génétique du matériel et par conséquent doivent être l'objet d'une grande attention pour la sélection. L'observation du critère de sélection des génotypes en tant que parents pour l'hybridation a révélé que des génotypes génétiquement divergents font partie des groupes IV et XVII et des groupes XVII et XIX. Par conséquent, il serait logique d'inclure de tels génotypes dans le futur programme d'hybridation.

INTRODUCTION

La divergence génétique qui mesure la relation d'héritabilité entre les populations a été utilisée comme un outil important dans les programmes d'amélioration des récoltes. La manifestation de l'hétérosis et de la vigueur hybride dépend principalement de la proximité génétique des parents. Le croisement entre les parents les plus divergents génétiquement s'est révélé plus efficace pour la recombinaison des gènes. Par conséquent, l'étude sur la divergence génétique est nécessaire et des études de ce type n'ont pas été faites précédemment pour l'amélioration du mûrier.

Les statistiques D2, basées sur l'analyse à plusieurs variables comme développée par Mahalanobis (1928), ont été adoptées par de nombreux chercheurs pour différentes récoltes afin d'étudier la divergence génétique. Murthy et Arunachalam (1966) et Jain et coll. (1981) ont signalé l'importance d'étudier la divergence génétique pour la sélection des variétés très productives. Jolly et coll. (1989) ont utilisé l'analyse D2 chez *Bombix mori*. Kartiyar et Singh (1989) ont étudié la divergence génétique chez 40 races indigènes et exotiques de *Vicia faba*. Sarkar (1990) a suggéré que le matériel de base disponible a besoin d'être réparti en groupes avant de préparer un projet de sélection. L'analyse D2 a été étudiée pour être la plus utile possible dans un tel cas et pour être utilisée chez le ver à soie tasar (*A. mylitta*). La divergence génétique pour 10 caractères chez 3 génotypes du piment (*Capsicum annum L.*) a été étudiée par Varalakshmi et Babu (1991). Govindan et coll. (1992) ont exposé un ensemble de dix-huit lignées multivoltines différentes du ver à soie pour comprendre la divergence génétique entre les génotypes.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel pour la présente recherche comprend 58 génotypes d'origines diverses, dont 33 sont d'origine tempérée et 25 sont d'origine tropicale. L'expérience a été effectuée de 1989 à 1990 pour quatre récoltes et sous les conditions tempérées du Kashmir. La plantation a été maintenue suivant les pratiques recommandées pour la culture sous des conditions tempérées (Fotadar et coll., 1989, Ahsan M. M. et coll., 1990). Les génotypes ont été plantés à des espacements de 90 × 180 cm et le terrain a été amendé à raison de 300 kg / ha / an d'azote, 120 kg / ha / an de potassium, 120 kg / ha / an de phosphore et 20 tonnes / ha / an de fumier.

La température moyenne enregistrée pendant l'étude s'étend de - 1,5° à 30,9° et les précipitations ont été de 26,9 mm à 76,6 mm. L'observation du nombre de pousses par plante, la longueur totale des pousses, la surface de la feuille, le poids de 100 feuilles, la hauteur de la plante, le rapport du pétiole de la feuille, le racinement et le rendement en feuilles ont été utilisés pour évaluer le degré de diversité, l'analyse D2 basée sur l'analyse multivariée. La divergence est obtenue comme la somme des carrés de la différence dans les valeurs des génotypes transformés correspondants. Basés sur les valeurs D2, les 58 génotypes sont groupés en différents ensembles faisant appel à la méthode Touchers (Singh et Choudhary, 1979 ; Rao, C. R., 1952).

Les données sur le nombre de tiges par plante et la longueur totale des tiges ont été enregistrées à partir de neuf plantes sélectionnées de façon aléatoire à partir de quatre récoltes au moment de ramasser les feuilles et la moyenne des quatre récoltes a été calculée. La longueur totale des pousses a été mesurée en prenant la longueur de toutes les branches primaires. Les 100 feuilles tendres, moyennes et dures sélectionnées au hasard à partir de neuf plantes étiquetées ont été récoltées pendant les saisons de récoltes respectives et conservées dans des couvercles en polyéthylène. La surface des feuilles a été calculée en récoltant 15 feuilles tendres, moyennes, dures et pesées séparément. Soixante-quinze disques ont été obtenus en perforant la feuille à cinq endroits différents et la surface et le poids des disques ont été enregistrés (Anonyme, 1983).

$$\text{Surface de la feuille} = \frac{\text{Surface des 75 disques}}{\text{Poids des 75 disques}} \times \text{Poids frais des 15 feuilles}$$

Le rapport du pétiole / feuille est mesuré à partir du poids frais des limbes des feuilles et du pétiole. Une centaine de feuilles fraîches ont été sélectionnées au hasard à partir de chaque plante couvrant tous les stades de croissance et pesées immédiatement après la récolte. Les pétioles de toutes les feuilles ont été coupés et pesés. Le rapport a été calculé en séparant le poids des limbes frais de celui du pétiole. Pour calculer la distance internodale, la longueur totale de 15 pousses sélectionnées au hasard de chaque génotype a été mesurée et le nombre de feuilles a été retenu. La longueur totale des pousses divisée par le nombre total de feuilles donne la distance internodale. Les feuilles ont été récoltées 60 jours après le poinçonnage pour le printemps et 75 jours après avoir été taillées en automne à partir des neuf plantes étiquetées et leur poids a été enregistré. Le rendement moyen en feuilles a été calculé à partir des quatre récoltes. La hauteur de la plante a été enregistrée à partir de la base jusqu'à la longueur maximale atteinte par une pousse à partir des neuf plantes sélectionnées au hasard.

Le paramètre de bouturage appelé racinement a été observé au printemps des deux années. Soixante-quinze boutures de tige, chacune en trois exemplaires ont été plantées à un espacement de 10 × 20 cm selon une répartition en blocs aléatoire disposés de façon aléatoire dans des pépinières. Les pépinières ont été maintenues selon les méthodes recommandées (Dandin, 1986). Le racinement a été enregistré après 90 jours de plantation sur les survivants et la moyenne des données des deux années a été retenue.

RESULTATS

L'analyse de variance révèle des différences très significatives entre les génotypes pour toutes les variables indiquant l'existence d'une variabilité génétique parmi les génotypes. Les valeurs D2 varient de 0,0 à 18,7 (Tableau III). Sur la base de l'ampleur relative des valeurs D2, les génotypes sont groupés en 23 ensembles avec l'hypothèse que ceux à l'intérieur des ensembles ont des valeurs D2 plus faibles entre eux que ceux appartenant à deux ensembles différents. Vingt-deux génotypes se trouvent dans l'ensemble I, onze dans l'ensemble II, trois dans l'ensemble IV, trois dans l'ensemble IX et un dans les autres ensembles comme indiqué dans le tableau II.

La divergence génétique maximale est observée entre les génotypes des groupes I et XVII (69,1) suivis par les ensembles XVII et IX (Tableau III) et la divergence génétique la plus faible se trouve entre les groupes III et V (12,0). La divergence intragroupe va de 0,0 (la plus faible) dans les ensembles V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XXI, XXII et XXIII à 18,7 (la plus élevée) dans l'ensemble II (Tableau III). Le groupe IV a une valeur moyenne élevée pour la longueur totale des pousses, la hauteur de la plante, la distance internodale, le groupe VI pour le rendement en feuilles, le groupe XVI pour le racinement et le nombre de pousses par plante, le groupe XIX pour le rapport pétiole / feuille ; le groupe XXII pour la surface de la feuille et le poids de 100 feuilles ; l'ensemble XXIII pour le nombre de feuilles par mètre de pousses. Le tableau III montre qu'il existe une grande amplitude de variation dans les moyennes des ensembles pour les caractères. L'ensemble X a la valeur minimale pour le nombre de pousses par plantes et le racinement, l'ensemble XII pour la longueur totale des pousses, la hauteur de la plante, la distance internodale ; l'ensemble XVI pour le nombre de feuilles par mètre ; l'ensemble XXIII pour le poids de 100 feuilles et la distance internodale ; l'ensemble XII pour la distance internodale ; l'ensemble XV pour la surface de la feuille et l'ensemble X pour le rendement en feuilles (Tableau IV). L'amplitude de variation dans les différents groupes en ce qui concerne le nombre de pousses par plante, la longueur totale des pousses, le nombre de feuilles par mètre de pousses, la hauteur de la plante, la distance internodale, le poids de 100 feuilles, le rendement en feuilles et le racinement est décrite dans le tableau V. La variation maximale est enregistrée pour le racinement dans l'ensemble I jusqu'à concurrence de 0,50 à 62,33 (12366 %) suivi par 407,1 à 2492,4 (512 %) pour la longueur totale des pousses dans l'ensemble II. La variation dans les autres ensembles est négligeable (Tableau V).

L'analyse consistant à estimer la contribution des divers caractères dans la manifestation de la divergence génétique indique que la longueur des pousses (11,87 %), le poids de 100 feuilles (21,36 %), la surface de la feuille (20,94 %), le racinement (13,49 %), la hauteur de la plante (8,94 %) le nombre de feuilles par mètre de pousses (5,94 %) et le nombre de pousses par plante (5,76) contribuent le plus à la divergence génétique du matériel (Tableau VI).

Le tableau III révèle que plus de génotypes divergents sont inclus dans les ensembles IV et XVII et également dans les ensembles XVII et XIX. De tels génotypes peuvent être inclus dans un programme d'hybridation.

DISCUSSION

Le profil de groupage montre que les génotypes se groupent selon leur origine géographique. L'ensemble I comprend 22 génotypes qui sont tous d'origine japonaise et l'ensemble II comprend 11 génotypes qui sont tous d'origine indienne (Sud de l'Inde et Ouest Bengale). Les autres ensembles sont composés seulement d'un génotype chacun qui sont d'origine différente excepté les ensembles IV et IX qui comprennent trois génotypes à la fois tropicaux et tempérés et d'origine chinoise / indienne et japonaise / indienne respectivement. Cela peut être dû aux constellations de caractères qui pourraient être associées à une région particulière et perdre leur individualité sous l'influence du climat local (Kartiyar et Singh, 1989). Sindhu (1985) a aussi découvert un parallèle avec le haricot faba. Les résultats obtenus par Varalakshmi et Babu (1991) indiquent une relation forte entre la diversité génétique et la distance géographique chez le piment. Panwar (1970) a suggéré que, selon

la pensée vaviolviennne la diversité génétique est largement due à la diversité géographique. La variation maximale à l'intérieur des ensembles est enregistrée pour le racinement et la longueur totale des pousses dans les ensembles I et II respectivement. La grande amplitude de variation enregistrée dans l'ensemble I pour ce qui est du racinement est due à la faible réaction de racinement par bouturage des tiges des génotypes japonais excepté Chinese white (Fotadar, 1996) car la plupart d'entre eux se trouvent dans l'ensemble I.

L'analyse consistant à estimer la contribution de divers caractères à la manifestation de la divergence génétique indique que la longueur totale des pousses, le poids de 100 feuilles, la surface de la feuille, le racinement, la hauteur de la plante, le nombre de feuilles par mètre de pousses, le nombre de pousses par plante contribuent le plus (88,3 %) à la divergence génétique chez le matériel étudié (Tableau VI). Par conséquent, il est évident qu'il existe des attributs principaux de la composition génétique du mûrier auxquels une grande attention doit être portée lors de la sélection.

Le choix des caractères pour de telles études est assez important comme l'ont signalé Sokal et Daley (1961). Ils énoncent que le but premier de la recherche ne peut pas être atteint à moins que les caractères de composition du rendement soient pris en compte pour l'amélioration de la récolte vu leur importance économique.

Le tableau III montre qu'il existe une grande amplitude de variation dans les moyennes des ensembles pour les caractères. La grande variabilité rencontrée parmi les caractères peut être due à la nature fortement hétérozygote du genre. La fécondation libre pourrait avoir contribué à cette grande variabilité, ce qui expliquerait grand nombre d'ensembles enregistré dans la présente étude.

Le deuxième critère de sélection des génotypes en tant que parents en vue d'une hybridation en utilisant l'analyse D^2 concerne les distances intragroupes. Les distances intragroupes sont des génotypes manifestement plus divergents comme ceux compris dans le groupe I et XVII suivis par ceux entre XVII et IX. Par conséquent, il serait logique d'inclure de tels génotypes dans le futur programme de sélection.

RHIZOSPHERE MICROFLORA OF MULBERRY GENOTYPES GROWN IN THE COASTAL SALINE SOIL

AGASTIAN S. T. P. & VIVEKANANDAN M.

Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli 620 024, India.

Screening of beneficial microbes in the rhizosphere soils of selected mulberry genotypes in the coastal saline area of Vedarannyam, Tamilnadu, India was carried out. VAMF spores were isolated and identified. Glomus spp were dominant. Species of Acaulospora and Gigaspora were also present. Rhizosphere soil harboured more N_2 - fixing bacteria with lesser fungal colonies than the bulk soil. MPN colonies of Azotobacter, Azospirillum, phosphobacterium and total fungi were estimated in rhizosphere and bulk soils and compared. Further exploitation of the beneficial microbes depends on the use of efficient strains to improve the quality of mulberry leaves with little input of fertilisers under coastal salinity.

INTRODUCTION

Mulberry is one of the major food plants of the silkworm, *Bombyx mori* and also being a cash crop, it holds a lot of promise in developing countries. Increasing mulberry leaf yield without any extra cost is essential for making the sericulture industry viable and more profitable. Production of high quality leaves is important, besides leaf yield.

The beneficial effects of *Azotobacter* and *Azospirillum* as biofertilizers in mulberry plants have been reported by several workers (Das *et al.*, 1994 ; Yadav and Kumar, 1993). The importance of VAMF application in mulberry has also been emphasised by Ambika *et al.* (1994), Kumutha *et al.* (1993) and Thiripurasundari and Vivekanandan (1994). Certain mulberry genotypes are reported to be associated with VAMF in nature (Kandasamy *et al.*, 1986 ; Katiyar *et al.*, 1989 ; Agastian and Vivekanandan, 1994).

Soil is a complex abode of interactive community of microorganisms whose activities largely determine the growth of the plant. Rhizosphere is defined as the zone around root in which microbial growth is stimulated by the release of nutrients. In the present study, an attempt has been made to study interactions among beneficial soil microbes which are of great significance for growth and yield of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted during the months of December-January 94 in an established mulberry plantation garden on the coastal saline area of Vedarannyam, QM district, Tamilnadu, India. The soil was sandy with a pH of 8.18 ± 0.17 and an EC value of 1.26 ± 0.51 . The NPK content of the soil was 0.35 ± 0.12 mg/g - N ; 1.02 ± 0.47 mg/g - P ; 2.84 ± 0.87 mg/g - K. 1 kg of rhizosphere soil was collected from mulberry genotypes like M-5, BC2-59, S-30 and Tr-8. Bulk soil devoid of roots was also collected for the estimation of beneficial microbes by serial dilution technique using specified media for *Azotobacter* (modified Burk's medium-Rennie, 1981), *Azospirillum* (NFb medium - Dobereiner, 1980), phosphobacterium (Pikovskayas medium - Sundara Rao and Sinha, 1963) and total fungi (Czapek's agar medium - Balasubramanian and Kumar, 1989). Culture plates were kept

in an incubator for 24h at 30° C. After incubation, the colonies were counted. For isolation of VA mycorrhizal spores, the rhizosphere soil was collected and analysed by the wet-sieving and decanting method (Gerdeman and Nicolson, 1963). The spores were counted and identified (Schenck and Perez, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Nitrogen and phosphorous are the two major nutrients being supplied by biofertilisers like *Azospirillum*, *Azotobacter*, phosphobacterium and VAM fungi. The present study investigates the effects of high pH and salinity prevailing in the coastal environment on the composition of beneficial rhizosphere microflora of mulberry which in turn would reflect the quality of mulberry leaf production. The MPN counts made from the rhizosphere soils of mulberry genotypes like M-5, BC2-59, S-30, Tr-8 and bulk soil revealed that phosphobacterial colonies were higher in number followed by *Azotobacter* and *Azospirillum*. Significant increase in the colony numbers of all the beneficial microbes was observed in the rhizosphere of BC2-59. Marginal decrease in colony numbers was observed in M-5 mulberry (Table I). Bulk soil also contained beneficial microbes but poorer in number.

Saxon and Tilak (1994) reported that the vast majority of plant-associated soil organisms inhabitate the rhizosphere region in which bacterial growth is stimulated by the release of nutrients. However, Pavlovich (1959) reported beneficial effects of *Bacillus megaterium* and adverse effect of *B. subtilis* and *B. mesentericus* on *Azotobacter* growth. Baltensperger et al. (1978) recorded the beneficial effect of mixed culture inoculation of *Azospirillum* and *Azotobacter* in selected bermuda grass under green house conditions. All the microbes identified in the rhizosphere region lived in perfect harmony in the nature's mixed culture environment.

Table 1. Comparative assay of microbial population associated with different mulberry genotypes in the coastal saline region of Vedaranniyam.

Tableau 1. Essai comparatif sur la population microbienne associée à différents génotypes de mûriers dans la région saline côtière du Vedaranniyam.

Mulberry genotypes	MPN colonies ($\text{g}^{-1} \times 10^5$)			Total fungus	VAMF spores (100 g^{-1} soil)
	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Phosphobacterium</i>		
Génotypes de mûriers	Colonies MPN ($\text{g}^{-1} \times 10^5$)			Champignons totaux	Spores mycorrhizes (100 g^{-1} de sol)
	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Phosphobacterium</i>		
M-5	$385 \pm 49 \times 10^5$	$326 \pm 43 \times 10^5$	$489 \pm 35 \times 10^5$	$110 \pm 12 \times 10^3$	75 ± 12
BC2-59	$640 \pm 38 \times 10^5$	$392 \pm 27 \times 10^5$	$733 \pm 56 \times 10^5$	$80 \pm 8 \times 10^3$	80 ± 13
S-30	$420 \pm 31 \times 10^5$	$345 \pm 34 \times 10^5$	$612 \pm 36 \times 10^5$	$95 \pm 7 \times 10^3$	86 ± 80
Tr-8	$412 \pm 38 \times 10^5$	$320 \pm 25 \times 10^5$	$589 \pm 33 \times 10^5$	$110 \pm 10 \times 10^3$	80 ± 11
Bulk soil	$360 \pm 28 \times 10^5$	$270 \pm 23 \times 10^5$	$392 \pm 45 \times 10^5$	$125 \pm 11 \times 10^3$	30 ± 70
Sol					

The values are mean of five different experiments $\pm$ SD. / Les valeurs sont des moyennes de cinq expériences différentes $\pm$ SD.

VAMF is considered as an obligate symbiont to crop plants for better utilization of phosphorous and other essential elements (Sukhada, 1988), biological control of root pathogens (Dehne and Schonbeck, 1979), drought resistance (Powell and Bagyaraj, 1984) and protect the plants from salt stress (Rosendahl and Rosendahl, 1991). VAMF has been reported to universally adapt to different agro-climatic conditions causing increased growth of crop plants (Mehrotra *et al.*, 1995). The spore counts of VAMF in the rhizosphere soils of different mulberry genotypes grown in the coastal saline area of Vedaranniyam revealed that there was no significant difference in spore numbers (75-86 / 100 g soil) among the mulberry genotypes. Generally, VAMF are not host specific, although they exhibit some host preferences (Hetrick *et al.*, 1985). However, host morphotypes, chemo-attractants of the host plants and edaphic conditions may influence the colonization of VAMF with mulberry under coastal salinity.

Among VAM fungal spores identified, *Glomus* was found to be dominant. Species of *Gigaspora* and *Acaulospora* were also present. *G. mosseae* spores were higher in number followed by *G. aggregatum*, *G. microcarpum*, *G. deserticola* and *G. geosporum*. *Glomus* type of spores are generally thin walled, globose and smooth with single subtending hypha. Brownlee *et al.* (1983) reported that fungal spores with relatively thick and well-developed cell walls were highly sensitive to salts and the isolates with relatively thin cell walls were generally tolerant to salt stress. Spores of *Gigaspora decipiens* and *Gigas albida* were also found in the rhizosphere soils of mulberry genotypes which showed spore wall continuous, thin, smooth and readily cracking under light pressure with bulbous suspensor attached to septate hyphal branches. Spores of *Acaulospora spinosa* found to be sparse, had characteristic features like azygospores sessile, thin walled, hyaline and globose with spore surface evenly pitted, the mouths of the depressions being circular to elliptical. Spore wall is rigid consisting of four layers.

Regarding total fungus, bulk soil had more number of colonies, followed by M-5 and Tr-8 mulberry rhizosphere soil. Species of *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* and *Fusarium* were present. Rhizosphere of BC2-59 had poor number of fungal colonies, which may be due to production of antifungal compounds by the host plant (Schreiner and Koide, 1993) that hinder the colonization of pathogenic fungus. In general, the minimum population of fungus during winter in the coastal saline area of Vedaranniyam may be due to excess of moisture, a negative factor for proliferation of fungi (Adikari *et al.*, 1987).

From the overall perusal of Table I, BC2-59 harboured a large number of *Azotobacter*, *Azospirillum*, and phosphobacterium which may be helpful in fixing N₂ and mobilizing P to the host plant resulting in quality leaf production and increased growth. The counts of total fungi are reduced in BC2-59. Occurrence of abundant thin walled *Glomus* spores is promising for improvement of crop plants under coastal salinity. Though mulberry plants are intimately associated with VA mycorrhizae (Thiripurasundari and Vivekanandan), the effective strains should be identified, isolated and mass-multiplied for inoculation. The occurrence of VAMF and biofertilizer microbes in the rhizosphere zone indicates a close harmony. This is a clear indication that these microbes could be applied as dual inoculation for better quality leaf production in the vast stretch of coastal saline land.

List of VAMF spores in the saline soil of Vedaranniyam

1. *Glomus microcarpum*
2. *G. aggregatum*
3. *G. mosseae*
4. *G. geosporum*
5. *G. albidum*
6. *G. deserticola*
7. *Acaulospora scrabiculata*
8. *Gigaspora decipiens*
9. *G. albida*

List of other fungi identified in the bulk soil in the coastal saline soil of Vedaranniyam

1. *Aspergillus* sp

2. *Alternaria* sp
3. *Penicillium* sp
4. *Fusarium* sp
5. *Mucor* sp
6. *Rhizopus* sp

REFERENCES

- ADIKARI M., CHAKRABORTY P. P., GHOSH D. & DEY K. (1987) Physico-chemical properties of coastal saline soils of Sunderban, West Bengal. I. Seasonal effects on physico-chemical properties and microbial population.
- AMBIKA P. K., KATIHAR R. S. & CHOUDHURY P. C. (1994) The influence of vesicular arbuscular mycorrhizal association on growth, yield and nutrient uptake in some mulberry genotypes (*Morus* sp). Indian J. Seric. 33(2), 166-169.
- AGASTIAN SIMIYON THEODER P. & VIVEKANANDAN M. (1994) Occurrence of saline tolerant VAMF in mulberry varieties planted in the coastal regions of Tamilnadu. Mycorrhiza News, 6(2) 5-6.
- BALASUBRAMANIAN A. & KUMAR K. (1989) Practical manual on soil microbiology. AGM 607 (2 + 1) for M. Sc. Agril. Department of Agricultural Microbiology, 58-60.
- BALTEMBERGER A. A., SCHANK S. C., SMITH R. L., LITTEL R. C., BOUTON J.H. & DUDECK A. E. (1978) Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Azotobacter* on turf type bermuda genotypes. Crop Sci. 18, 1043-1045.
- BROWNLEE C., DUDDRIDGE J. A., MALIBARI A. & READ D. J. (1983) The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. Plant and Soil 71, 433-443.
- DEHNE H. W., SCHONBECK F. (1975) The influence of the endophytic mycorrhiza on the fusarial wilt of tomato. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 82, 630-639.
- DOBEREINER J. (1990) In methods for evaluating biological nitrogen fixation. FJ. Bergersen ed, John Wiley and Inc. New York.
- GERDEMAN J. W. & NICOLSON T. H. (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soils by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc., 46, 235-244.
- HETRICK, B. A. D., BLOOM J. & FEYERHEIM S. M. (1985) Root colonization pattern of *Glomus epigaeum* in nine host species. Mycologia, 77, 825-35.
- KANDASAMY D., RADHA N. V. & OBLISAMY G. (1986) Responses of different mulberry varieties to the inoculation of VA mycorrhizal fungi. Indian J. Seric., 25(1), 36-39.
- KATIHAR R. S., DAS P. K., CHOUDHURY P. C., GHOSH A. & SENGUPTA K. (1989) Vesicular arbuscular mycorrhizal association in mulberry. Curr Sci. 58, 461-464.
- KUMUTHA K., KANDASAMY D. & RANGASAMY M. (1993) Influence of VA mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* on mulberry. Indian J. Seric 32(2), 238-241.
- MEHROTRA V. S., BAIJAL U., MISHRA S. D., PANDEY D. P. & MATHEWS T. (1995) Movement of ^{32}P in sunflower plants inoculated with single and dual inocula of VAM fungi. Curr Sci. 68 (7), 751-754.
- PAVLOVICH D. YA (1959) Inter-relations of *Azotobacter* with other groups of soil micro-organisms. Trudy Inst. microbiol. Acad. Nauk Latv. SSR 8, 127-143.
- POWELL C. L., BAGYARAJ D. J. (1984) Why all interest? In Va mycorrhiza C. L. Powell & D. J. Bagyaraj (Eds), Florida, CRC Press.
- ROSENDAHL C. N. & ROSENDAHL S. (1991) Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* sp) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. Environ and Expt. Botany 31, 313-318.
- RENNIE R. J. (1981) Can J. Microbiol. 27, 8.

- SAXENA A. K. & TILAK K. V. B. R. (1994) Interaction among beneficial soil microorganisms. Indian J. Microbiol. 34(2), 91-106.
- SCHENCK, N. C. & PEREZ Y. (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Synergistic Publications, Gainesville, Florida, USA, p 286.
- SCHREINER R. P. & HOIDE R. T. (1993) Anti fungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. New Phytol 123, 99-105.
- SUKHADA K. (1998) First Asian Conference on mycorrhizae. Madras, p 34 (abst).
- SUNDARA RAO, W. V. B. & SINHA M. K. (1963) Phosphate dissolving organisms in the soil and rhizosphere. Indian J. Agric. Sci. 33, 272-278.
- THIRIPURASUNDARI M. & VIVEKANANDAN M. (1994) Mulberry mycorrhiza association. An effective tool to improve leaf nutrition. Sericologia 34(4) 685-689.
- YADAV D. B. R & KUMAR N. T. D. (1993) Response of mulberry (*Morus indica* var kanva-2) to inoculation with the nitrogen-fixing bacterium, *Azospirillum brasilense*. Sericol. 33(4), 635-640.

MICROFLORE DE LA RHIZOSPHERE DE GENOTYPES DE MURIERS CULTIVES EN SOL COTIER SALIN

AGASTIAN S. T. P. & VIVEKANANDAN M.

Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli 620 024 Inde.

Nous avons déterminé les microbes bénéfiques contenus dans le sol de la rhizosphère de la zone côtière saline du Vedaranniyam, au Tamilnadu en Inde. Les spores mycorhizes ont été isolées et identifiées. *Glomus* spp domine. Les genres *Acaulospora* et *Gigaspora* sont aussi présents. Le sol de la rhizosphère produit plus de bactéries fixatrices d'azote avec moins de colonies fongiques que le sol normal. Les colonies d'*Azotobacter*, d'*Azospirillum*, de phosphobactéries et de champignons totaux ont été estimées dans le sol de la rhizosphère et le sol normal et comparées. L'exploitation accrue des microbes bénéfiques dépend de l'utilisation de souches efficaces pour améliorer la qualité des feuilles de mûrier en ayant faiblement recours aux engrais dans les terrains salins côtiers.

INTRODUCTION

Le mûrier est l'une des principales plantes hôtes du ver à soie, *Bombyx mori*, et comme c'est une plante commerciale, il est très prometteur pour les pays en voie de développement. L'accroissement du rendement en feuilles du mûrier sans coût supplémentaire est essentiel pour la viabilité et l'augmentation du profit de l'industrie séricicole. La production de feuilles de qualité est importante, tout comme le rendement en feuilles.

Les effets bénéfiques d'*Azotobacter* et d'*Azospirillum* comme engrais biologiques chez les plants de mûriers ont été signalés par plusieurs chercheurs (Das et coll., 1994 ; Yadav et Kumar, 1993). L'importance des mycorhizes pour le mûrier a aussi été soulignée par Ambika et coll., (1994), Kumutha et coll. (1993) et Thiripurasundari et Vivekanandan (1994). Il a été observé que certains génotypes de mûrier sont associés aux mycorhizes dans la nature (Kandasamy et coll., 1986 ; Katiyar et coll., 1989 ; Agastian et Vivekanandan, 1994).

Le sol est l'emplacement complexe d'une communauté interactive de micro-organismes dont les activités déterminent en grande partie la croissance de la plante. La rhizosphère est par définition la zone autour des racines où la croissance microbienne est stimulée par la libération de nutriments. Dans l'étude actuelle, on s'est efforcé d'étudier les interactions entre les microbes bénéfiques au sol ayant une grande importance pour la croissance et le rendement du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée pendant les mois de Décembre-Janvier 1994 dans une mûraie établie dans la zone côtière saline du Vedaranniyam, région QM, Tamilnadu, Inde. Le sol est sablonneux avec un pH de 8.18 ± 0.17 et une valeur de conductivité de 1.26 ± 0.51 . Le contenu du sol en NPK est de 0.35 ± 0.12 mg/g - N ; 1.02 ± 0.47 mg/g - P ; 2.84 ± 0.87 mg/g - K. On a recueilli 1 kg du sol de la rhizosphère pour des génotypes de mûrier tels que M-5, BC2-59, S-30 et Tr-8. Le sol normal sans racines a aussi été recueilli afin de procéder à l'estimation en microbes bénéfiques par une technique de dilution en série en utilisant des supports spécifiques pour *Azotobacter* (support modifié de Burk,

Rennie 1981), *Azospirillum* (support NFb, Dobereiner 1980), les phosphobactéries (support Píkovskayas - Sundara Rao et Sinha, 1963) et l'ensemble des champignons (milieu gélosé de Czapek - Balasubramanian et Kumar, 1989). Les plaques de culture sont conservées dans un incubateur pendant 24 h à 30° C. Après l'incubation, les colonies sont comptées. Pour l'isolement des spores de la mycorhize vésiculaire arbusculaire, le sol de la rhizosphère est recueilli et analysé par la méthode de tamisage humide et de décantation (Gerdeman et Nicolson, 1963). Les spores sont comptées et identifiées (Schenck et Perez, 1987).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'azote et le phosphore sont les deux nutriments principaux fournis par les engrais biologiques tels qu'*Azospirillum*, *Azotobacter*, les phosphobactéries et les champignons VAM. L'étude actuelle observe les effets d'un pH élevé et de la salinité présente en zone côtière sur la composition de la microflore bénéfique de la rhizosphère du mûrier qui à son tour aura un effet sur la qualité de la production de feuilles de mûrier. Les comptages de MPN dans les sols de la rhizosphère de génotypes de mûrier tels que M-5, BC2-59, S-30, Tr-8 et dans le sol normal révèlent que les colonies phosphobactériennes sont plus élevées en nombre suivies par les *Azotobacter* et *Azospirillum*. On note une augmentation significative du nombre de colonies de tous les microbes bénéfiques dans la rhizosphère de BC2-59. On observe une baisse marginale du nombre de colonies pour le mûrier M-5 (Tableau I). Le sol normal contient aussi des microbes bénéfiques mais en nombre inférieur.

Saxon et Tilak (1994) ont signalé que la majorité des organismes du sol associés aux plantes sont localisés dans la zone rhizosphère où la croissance des bactéries est stimulée par la libération de nutriments. Toutefois, Pavlovich (1959) a signalé les effets bénéfiques de *Bacillus megaterium* et l'effet adverse de *B. subtilis* et de *B. mesentericus* sur la croissance d'*Azotobacter*. Baltensperger et coll., (1978) ont observé l'effet bénéfique de l'inoculation d'une culture mixte d'*Azospirillum* et d'*Azotobacter* chez du cynodon sélectionné en serre. Tous les microbes identifiés dans la rhizosphère vivent en harmonie parfaite dans l'environnement de culture mixte de la nature.

On considère que la mycorhize est un symbiote essentiel aux plantes de culture permettant une meilleure utilisation du phosphore et d'autres éléments essentiels (Sukhada, 1988), un contrôle biologique des pathogènes de la racine (Dehne et Schonbeck, 1979), une résistance à la sécheresse (Powell et Bagyaraj, 1984) et qui protège les plantes contre la salinité (Rosendhal et Rosendhal, 1991). On a signalé que les mycorhizes s'adaptent de manière universelle à différentes conditions agro-climatiques, et augmentent la croissance des plantes cultivées (Mehrotra et coll., 1995). Les comptages en spores de mycorhizes dans les sols de la rhizosphère de différents génotypes de mûrier, cultivés dans la zone côtière saline du Vedarannam, révèle qu'il n'y a pas de différence significative par rapport au nombre de spores (75-86 / 100 g de sol) parmi les génotypes de mûrier. En général, les mycorhizes n'ont pas de spécificité par rapport aux hôtes, bien qu'ils préfèrent certains hôtes (Hetrick et coll., 1985). Cependant, les morphotypes des hôtes, les attractifs chimiques des plantes hôtes et les conditions édaphiques peuvent influencer la colonisation en mycorhizes des mûriers face à une salinité côtière.

Parmi les spores fongiques mycorhizes arbusculaires vésiculaires identifiées, *Glomus* domine. Les espèces de *Gigaspora* et de *Acaulospora* sont aussi présentes. Les spores de *G. mosseae* sont plus élevées en nombre suivies par *G. aggregatum*, *G. microcarpum*, *G. deserticola*, et *G. geosporum*. Les spores de type *Glomus* ont des parois en général fines, globulaires et lisses avec une hyph unique support. Brownlee et coll., (1983) ont signalé que les spores fongiques aux parois cellulaires relativement épaisses et bien développées sont hautement sensibles aux sels et les isolats aux parois cellulaires relativement fines tolèrent l'exposition au sel. On trouve aussi des spores de *Gigaspora decipiens* et *Gigaspora albida* dans les sols de la rhizosphère de génotypes de mûrier présentant une paroi de spore continue, fine, lisse et craquant aisément sous la pression lumineuse avec un suspenseur bulbeux attaché aux branches hyphales cloisonnées. On remarque que les spores de *Acaulospora spinosa* qui sont rares, ont les traits caractéristiques suivants : azygospores sessiles, parois fines,

hyalines et globulaires avec une surface de spore uniformément trouée, les ouvertures des dépressions étant de circulaires à elliptiques. La paroi de la spore est rigide et constituée de quatre couches.

En ce qui concerne l'ensemble des champignons, le sol normal contient plus de colonies, suivi par le sol de la rhizosphère des mûriers M-5 et Tr-8. Les espèces de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Fusarium* sont présentes. La rhizosphère de BC2-59 a un nombre peu élevé de colonies fongiques, ce qui est peut-être dû à la production de composés antifongiques par la plante hôte (Schreiner et Koide, 1993) qui empêche la colonisation par le champignon pathogène. En général, la population minimale de champignons pendant l'hiver dans la zone côtière saline du Vedarannyam est due à une humidité excessive, facteur négatif pour la prolifération des champignons (Adikari et coll., 1987).

D'après l'observation globale du Tableau I, BC2-59 produit un grand nombre d'*Azotobacter*, d'*Azospirillum* et de phosphobactéries qui sont peut-être utiles à la fixation de N_2 et à la mobilisation de P pour la plante hôte, ce qui permet d'obtenir la production d'une feuille de qualité et une croissance accrue. On compte peu de champignons pour BC2-59. La présence et l'abondance de spores de *Glomus* à parois fines est prometteuse pour l'amélioration des plantes cultivées en terrain salin côtier. Bien que les plants de mûriers soient étroitement associés aux mycorhizes VA (Thiripurasundari et Vivekanandan), il faudrait identifier, isoler et multiplier en masse les souches efficaces. La présence de mycorhizes arbusculaires vésiculaires et de microbes fertilisants dans la zone de la rhizosphère indique une harmonie étroite. Cela indique clairement que ces microbes pourraient être utilisés en inoculation couplée pour une production de feuilles de meilleure qualité dans la vaste étendue de terre côtière saline.

La liste des spores mycorhizes arbusculaires vésiculaires dans le sol salin du Vedarannyam est la suivante :

1. *Glomus microcarpum*
2. *G. aggregatum*
3. *G. mosseae*
4. *G. geosporum*
5. *G. albidum*
6. *G. deserticola*
7. *Acaulospora scrabieulata*
8. *Gigaspora decipens*
9. *G. albida*

La liste des spores d'autres champignons identifiés dans le sol du terrain côtier salin dans le Vedarannyam est la suivante :

1. *Aspergillus* sp
2. *Alternaria* sp
3. *Penicillium* sp
4. *Fusarium* sp
5. *Mucor* sp
6. *Rhizopus* sp

STUDIES ON THE VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL ASSOCIATION IN DIFFERENT VARIETIES OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

M. CHARITHA DEVI, A. RAJASEKHAR* & M. N. REDDY**

Department of Applied Microbiology S. P. Mahila Visvavidyalayam,
Tirupati - 517 502, Andhra Pradesh, India.

*The roots and rhizosphere soil of twenty four mulberry genotypes were studied for Vesicular arbuscular mycorrhizal development and their spore population. Root samples of all the genotypes showed the association of arbuscules and vesicles. Percentage of infection, number of arbuscules, vesicles and spores were highly variable in different genotypes. Species of **Glomus**, **Gigaspora**, **Sclerocystis** were detected in the rhizosphere soil of different genotypes studied.*

Keywords: Mulberry genotypes, root colonization, vesicular - arbuscular mycorrhizae.

INTRODUCTION

Vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi are ubiquitous in their distribution and occurrence. It has been reported that 90 % of the vascular plants normally establish mutualistic relationship with VA Mycorrhizae. The association of VAM fungi have been reported in several crop plants and ornamental plants. The importance of VAM fungal association in many agricultural and horticultural crops have been well documented (Mosse, 1977; Bagyaraj and Manjunath, 1980; Sieverding and Howeler, 1985; Faber *et al.*, 1990; Dhillon and Ampornpan, 1992; Ammani *et al.*, 1985; Dwivedi and Pathak, 1981). Very limited work has been carried out on the important cash crops like mulberry for VAM association and its impact on nutrient mobilization and uptake by plants (Kandaswamy *et al.*, 1986, Katiyar *et al.*, 1989). Hence an attempt has been made here for qualitative and quantitative analysis of the VAM association with different genotypes of mulberry.

MATERIALS ET METHODS

The study was conducted in the mulberry field of the University Campus in which different genotypes of mulberry are maintained. Twenty four genotypes which are being grown in different localities for their agronomic importance have been selected for study. The Physico-chemical characteristics of the rhizosphere soils in relation to number of propagules were also studied.

Fine roots of twenty four mulberry varieties were collected, cleared and stained according to the method of Phillips and Hayman (1970). Percent colonization, number of arbuscules and vesicles were determined. Rhizosphere soil of each genotype was processed for VAM spore population by wet sieving and decanting method (Gerdemann and Nicolson 1963). The spores were counted by observing under stereomicroscope.

* Department of Botany, S. V. University, Tirupati - 517 502, Andhra Pradesh, India.

** Corresponding author.

RESULTS AND DISCUSSION

The Physico-chemical status of the soil was found to be of pH: 7.8, percent of organic carbon: 1.5, nitrogen: 600 mg/kg, Phosphorous: 3.2 mg/kg and potassium: 220 mg/kg.

The results (Table - I) showed that a significant variation in percent of infection among different mulberry genotypes studied (Fig. 1). The percent of infection was maximum in OPH1, S 36, S 54, Shrim 5, RFS 135, Ber c776 and LF 1 (90-100%) followed by Sujanpuri, S 30, DD, Local, KNG and Jatinuni (70-80%). Least infection was observed in MS 8 and English black.

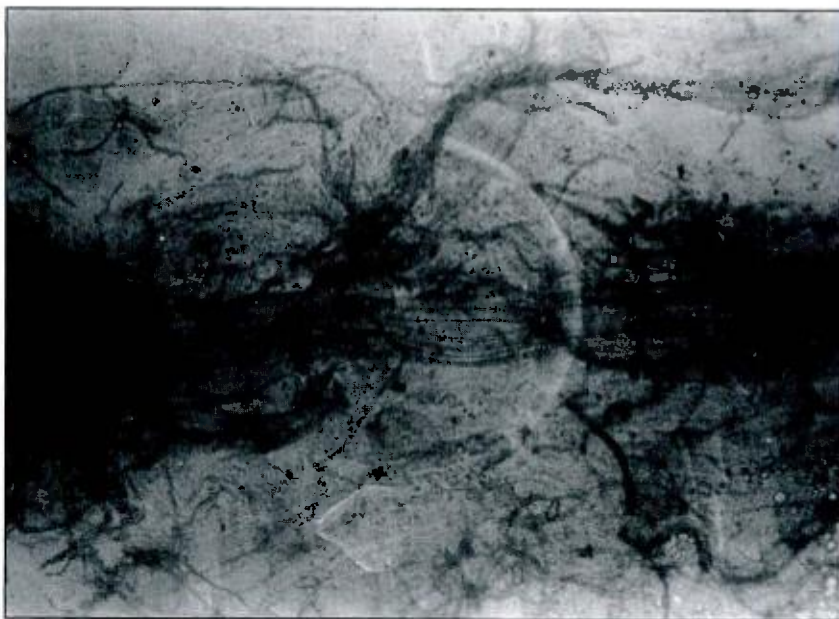


Fig 1. VA Mycorrhizal infection in the roots of mulberry (50 X).

Fig. 1. *Présence de mycorhize VA dans les racines du mûrier (50 X).*

The number of arbuscular structures was quite high in Sujanpuri and RFS 135 genotypes and least in MS 8 and English black (Fig. 2). The number of vesicles were very high in OPH 1, S 54 and RFS 135 genotypes and least in English black and K 2 genotypes (Fig. 3).

The spores in rhizospheric soil mostly appeared in clusters, ranged in colour from brown, dark brown to black and were also of different sizes. The spore numbers were highest in the rhizosphere soils of S 54, RFS 135 and in local varieties, least in Ber C779 and moderate in the rest of the genotypes. The dark brown spores were predominant than the rest of the two colours. Most of the genotypes were associated with VAM fungi belonging to the genera *Glomus*, *Gigaspora* and *Sclerocystis* Table-II, Fig. 4 & 5.

The study indicates significant variation in the association of VAM fungi among different mulberry genotypes in respect of percent of infection, arbuscules and vesicles in roots and spore population in the rhizosphere soils. It is not clearly known why in certain varieties the infection is so high while in others it is so low. The availability of basic nutrients may play a vital role in the roots on VAM colonization (Ambika, *et al.*, 1994). Enhanced nutrient uptake by VAM symbionts and subsequent higher growth rates of host plants have been reported by many workers (Safir, 1980) and this in turn has great potential for improving agriculture.

Table I. Mycorrhizal development in different Mulberry cultivars.

Tableau I. Développement de mycorhizes dans différents cultivars de mûrier.

S. No.	Name of the genotype	% of root Length infection	Arbuscules	Vesicles	Spores / 50 g Soil
	Nom du génotype	% d'infection de longueur de racine	Arbuscules	Vésicules	Spores / 50 g de terre
1.	OPH 1	100.00	20.86 ±7.37	81.33 ±8.85	230
2.	TR 8	63.3	9.46 ±2.68	13.56 ±3.68	190
3.	DD	76.6	9.06 ±3.13	23.53 ±3.90	210
4.	Local	73.3	16.93 ±4.72	15.66 ±5.60	290
5.	S 36	93.3	11.20 ±4.20	8.2 ±2.88	208
6.	KNG	73.3	14.33 ±3.89	9.63 ±2.73	203
7.	MS 8	43.3	6.5 ±2.33	3.0 ±1.27	251
8.	RFS 175	63.3	26.56 ±6.32	-	206
9.	S 54	100.0	17.4 ±1.80	69.9 ±18.37	306
10.	Shrim 5	96.6	30.43 ±12.62	42.93 13.69	267
11.	Sujanpuri 5	80.0	117.93 ±12.00	2.23 ±0.87	218
12.	TG	50.0	20.76 ±6.51	4.73 ±1.33	199
13.	TR 10	53.3	30.0 ±7.07	6.96 ±3.18	213
14.	MR 2	63.3	38.73 ±7.57	11.13 ±2.53	227
15.	RFS 135	93.0	61.43 ±12.49	63.03 ±9.46	303
16.	Ber S1	53.3	55.43 ±10.55	11.3 ±3.96	215
17.	Ber C776	93.3	14.0 ±3.49	10.2 ±2.93	240
18.	Ber C779	50.0	13.06 ±4.12	9.26 ±2.80	183
19.	Jatinuni	70.0	10.33 ±3.29	5.63 ±2.01	227

Table I. (Continued)

Tableau I. (Suite)

S. No.	Name of the genotype	% of root Length infection	Arbuscules	Vesicles	Spores / 50 g Soil
	<i>Nom du génotype</i>	<i>% d'infection de longueur de racine</i>	<i>Arbuscules</i>	<i>Vésicules</i>	<i>Spores / 50 g de terre</i>
20.	English black	40.0	8.26 ±3.88	2.20 ±1.43	259
21.	K 2	46.6	32.4 ±8.04	1.04 ±0.59	240
22.	TR 4	63.3	12.96 ±1.15	13.1 ±3.62	194
23.	S 30	80.0	10.16 ±4.40	13.86 ±4.46	218
24.	LF 1	93.3	11.03 ±4.46	7.03 ±1.82	203

Mean of 30 root segments of 1 cm length; ± Standard Error.

Moyenne de 30 segments de racines de 1 cm de long; ± Ecart.



Fig. 2. Arbuscular Cells in the roots of mulberry (50 X).

Fig. 2. Les cellules arbusculaires dans les racines du mûrier (50 X).

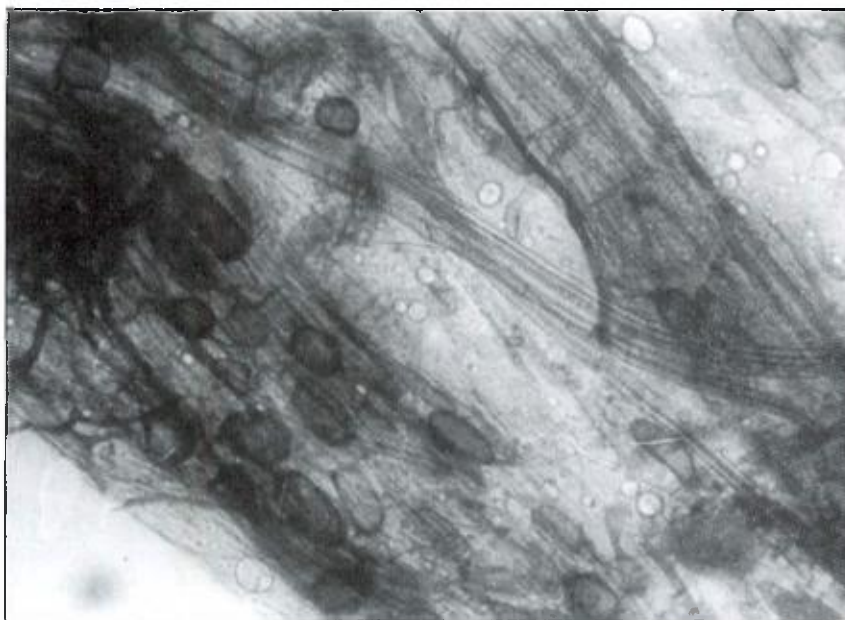


Fig 3. Vesicles in the roots of mulberry (50 X).
Fig 3. Vésicules dans les racines de mûrier (50 X).

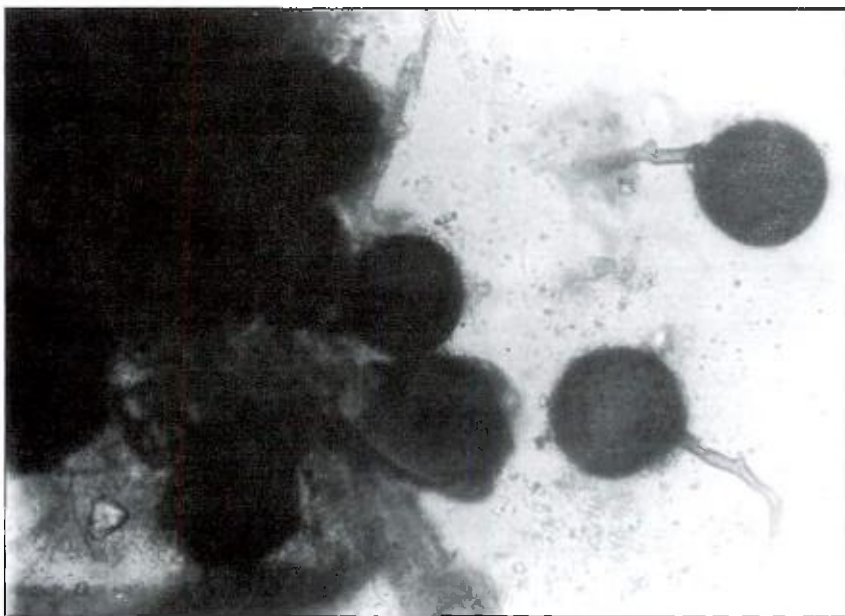


Fig 4. *Glomus aggregatum* spores (112 ×).
Fig 4. Spores de Glomus aggregatum (112 ×).

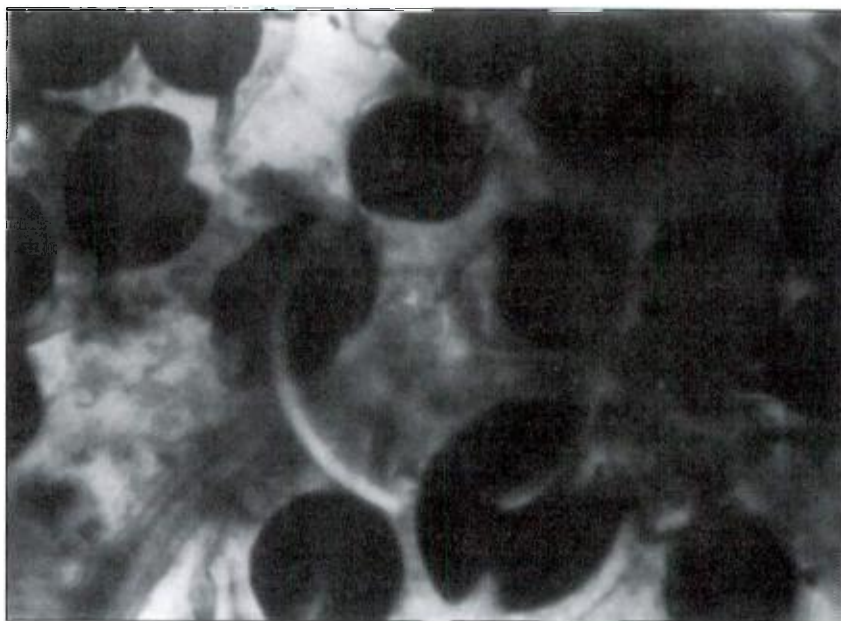


Fig. 5. *Gigaspora margarita* spores (112 X).

Fig 5. Les spores *Gigaspora margarita* (112 X).

Cultivation of high quality mulberry is a significant aspect of silk production and it is estimated that 60 % of the cost of silk is due to mulberry cultivation (Ambika *et al.*, 1994). The association of VAM with different mulberry genotypes shows considerable promise for the selection of suitable endomycorrhizas for improving the productivity of varieties.

Several workers have observed that inoculation of mulberry with VAM significantly increased the growth and leaf yield in comparison to inoculated control (Katiyar *et al.*, 1989, Ambika *et al.*, 1994). It is also possible to use this beneficial effect of symbiotic association to reduce the phosphatic fertilization to a great extent in mulberry cultivation by introducing an efficient strain of local endophytes. VAM association has also an advantage for control of some of the soil-borne pathogens as also reported by many workers in other VAM - host interactions. (Schoenbeck and Dehne, 1979).

Studies on the effects of VAM association in relation to productivity features, effect on soil-borne pathogens and nutrition of the plant are in progress. Exploitation of mycorrhizal association in mulberry should be considered extremely important because this interaction determines the quantity and quality of leaf production in mulberry with reduced fertilizer inputs.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Ms P. Sujathamma, Dept. of Sericulture for providing the cultivars used in the study. Thanks are also due to Prof. T. K. K. Reddy, Dept. of Botany, S. V. University, for constructive criticism and encouragement.

REFERENCES

- AMMANI K., VENKATESWARULU K., RAO A. S. (1985) Development of Vesicular mycorrhizal fungi on an upland rice variety, Curr. Sci., 54, 1120.

- AMBIKA P. K., DAS P. K., KATIYAR R. S., CHOWDHERY P. C. (1994) The influence of vesicular arbuscular mycorrhizal association on growth yield and nutrient uptake in some mulberry genotypes (*Morus* sp.). Indian J. Seric., 33, 166-169.
- BAGYARAJ D. J., MANJUNATH A. (1980) Response of crop plants to VAM inoculation in an unsterile Indian soil. New phytol., 85 (1), 33-36.
- DWIVEDI R. S., PATHAK S. P. (1981) Occurrence of Vesicular arbuscular mycorrhizal infection in an ornamental plant. Indian Phytopathol., 34, 524.
- FABER B. A., ZASOSK R. J., BURAU R. G., URIUK. (1990) Zinc uptake by corn as affected by Vesicular Arbuscular Mycorrhizae. Plant Soil, 129, 121-130.
- GERDEMANN J. W. (1968) Vesicular arbuscular mycorrhizal and plant growth. Ann. Rev. Phytopathol., 6, 397-418.
- GERDEMANN J. W., NICOLSON T. H. (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Tran. Br. Mycol. Soc., 46, 235-244.
- KANDASWSAMY D., RADHA N. V., OBLISAMI G. (1986) Response of different mulberry varieties to the inoculation of VAM fungi. Indian J. Seric., 25(1), 36-39.
- KATIYAR R. S., DAS P. K., CHOWDHARY P. C., GHOSH A., SENUGUPTA K. (1989) Vesicular Arbuscular Mycorrhizal association in mulberry Curr. Sci., 58 (8), 461-464.
- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in south India Bulletin No. 1, Central sericultural Research and Training Institute.
- MOSSE B. (1977) In: exploiting the legume Rhizobium Symbiosis in tropical agriculture. J. M. Vincent, A. S. Whitney and E. Boose (eds), University of Hawaii, Honolulu, pp. 175-292.
- NIBHA GUPTA., SALI S. (1993) Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Association of the members of the family cyperacea. Indian J. Microbiol., 33 (3), 219-221.
- PHILLIPS J. W., HAYMAN D. S. (1970) Improved procedure for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Bri. Mycol. Soc., 55, 158-161.
- RAJAGOPAL D., MADHAVENDRA S. S., KAISER JAMIL. (1989) Occurrence of Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in roots of *Morus alba* L. Curr. Sci., 58, 687-689.
- SAFIR G. R. (1980) In :Vesicular Mycorrhizal and crop productivity, Academic press, New York p. 231.
- SCHOENBECK F., DEHNE H. W. (1979) The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. IV. Fungi parasitism on aerial plant parts. Z. pflkranth. pflpath. pflschutz., 86, 103-112.
- SIEVERDING E., HOWELER R. J. (1985) Influence of species of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal fungi on *cassava* yield response to phosphorus fertilization. Plant Soil., 88, 213-220.
- THRIPURASUNDARI M., VIVEKANANDAN. M. (1994) Mulberry Mycorrhizal association - An effective tool to improve Leaf Nutrition. Sericologia, 34, 685-689.
- TABER R. A., STRONG M. E. (1982) Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in roots and xylem of *Tradescantia*. Mycologia, 74, 152.

ETUDES SUR LA MYCORHIZE ARBUSCULAIRE VESICULAIRE CHEZ DIFFERENTES VARIETES DE MURIER (*MORUS ALBA* L.)

M. CHARITHA DEVI, A. RAJASEKHAR* & M. N. REDDY**

Department of Applied Microbiology S. P. Mahila Visvavidyalayam,
Tirupati - 517 502, Andhra Pradesh, Inde.

*Les racines et le sol de la rhizosphère de vingt quatre génotypes de mûriers ont été étudiés par rapport au développement de mycorhizes arbusculaires vésiculaires et à leur population en spores. Les échantillons de racines de tous les génotypes présentent une association d'arbuscules et de vésicules. Le pourcentage d'infestation, le nombre d'arbuscules, de vésicules et de spores sont hautement variables en fonction des génotypes. Les espèces *Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* apparaissent dans le sol de la rhizosphère des différents génotypes étudiés.*

INTRODUCTION

Les champignons de la mycorhize arbusculaire vésiculaire (VAM) sont distribués et sont présents partout. On a observé que 90 % des plantes vasculaires ont normalement des relations de réciprocité avec les mycorhizes VA. L'association à des champignons VAM a été signalée pour plusieurs plantes de culture et d'ornement. L'importance de l'association fongique VAM pour de nombreuses cultures agricoles et horticoles est bien documentée (Mosse, 1977 ; Bagyaraj et Manjunath, 1980 ; Sieverding et Howeler, 1985 ; Faber et coll., 1990 ; Dhillon et Ampornpan, 1992 ; Ammani et coll., 1985 ; Dwivedi et Pathak, 1981). Très peu de recherches ont été entreprises sur les cultures commerciales telles que le mûrier en ce qui concerne l'association aux VAM et leur impact sur la mobilisation et l'absorption des nutriments par les plantes (Kandaswamy et coll., 1986, Katiyar et coll., 1989). Ainsi, on s'est efforcé ici de procéder à une analyse qualitative et quantitative de l'association VAM à différents génotypes de mûriers.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée dans la mûraie du campus de l'Université où différents génotypes de mûrier sont conservés. Vingt quatre génotypes cultivés dans diverses localités en raison de leur importance agronomique ont été choisis pour cette étude. Les caractéristiques physico-chimiques des sols de la rhizosphère ont aussi été étudiées par rapport au nombre de propagules.

Des racines fines de vingt quatre variétés de mûrier ont été recueillies, nettoyées et colorées selon les méthodes de Phillips et Hayman (1970). Le pourcentage de colonisation, le nombre d'arbuscules et de vésicules ont été déterminés. On a analysé le sol de la rhizosphère de chaque génotype par rapport à la population en spores VAM en utilisant la méthode de tamisage humide et de décantation (Gerdemann et Nicolson 1963). Les spores sont comptées par observation sous un microscope binoculaire.

* Department of Botany, S. V. University, Tirupati - 517 502, Andhra Pradesh, Inde.

**Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'état physico-chimique du sol est le suivant : pH 7,8 ; 1,5 pour-cent de carbone organique ; azote : 600mg/kg, phosphore : 3,2 mg/kg et potassium : 220 mg/kg.

Les résultats (Tableau I) montrent une variation significative du pourcentage d'infestation parmi les différents génotypes de mûrier étudiés (Fig. 1). Le pourcentage d'infestation est maximum pour OPH1, S36, S54, Shrim 5, RFS 135, Ber C776 et LF1 (90-100 %) suivis par Sujanpuri, S30, DD, local, KNG et Jatinuni (70-80 %). L'infestation la plus faible est observée chez MS8 et English black.

Le nombre de structures arbusculaires est assez élevé chez les génotypes Sujanpuri et RFS 135 et plus faible chez MS8 et English black (Fig 2). Le nombre de vésicules est très élevé chez les génotypes OPH 1, S54 et RFS 135 et moindre chez les génotypes English black et K2 (Fig. 3).

Les spores dans le sol de la rhizosphère apparaissent en groupe et leur couleur va de marron, marron foncé à noir ; elles sont également de taille différente. Le nombre de spores est plus élevé dans les sols de la rhizosphère de S54, RFS135 et des variétés locales, plus faible chez Ber C779 et modéré pour le reste des génotypes. Les spores marron foncé dominant par rapport aux deux autres couleurs. La plupart des génotypes sont associés aux champignons VAM appartenant au genre *Glomus*, *Gigaspora* et *Sclerocystis*, Tableau II, Figs. 4 et 5.

L'étude indique une variation significative concernant l'association aux champignons VAM pour ce qui est du pourcentage d'infestation, d'arbuscules et de vésicules dans les racines et la population en spores dans les sols de la rhizosphère pour les différents génotypes de mûrier. On ne sait pas clairement pourquoi l'infestation est si élevée chez certaines variétés et si faible chez d'autres. La présence des nutriments de base joue peut-être un rôle vital par rapport à la colonisation VAM dans les racines (Ambika et coll., 1994). De nombreux chercheurs ont signalé une assimilation accrue des nutriments par les symbiotes VAM et les taux de croissance des plantes hôtes qui s'ensuivent sont plus élevés (Safir, 1980) ; ceci renferme un très grand potentiel pour l'amélioration de l'agriculture.

La culture de mûrier de qualité est un des aspects significatifs de la production de soie et l'on estime que 60 % du coût de la soie provient de la culture du mûrier (Ambika et coll., 1994). L'association des VAM à différents génotypes de mûriers renferme des promesses considérables pour la sélection d'endomycorhizes en vue de l'amélioration de la productivité des variétés.

Plusieurs chercheurs ont observé que l'inoculation du mûrier avec des VAM augmente la croissance et le rendement en feuilles de manière significative par rapport au témoin non inoculé (Katiyar et coll., 1989, Ambika et coll., 1994). Il est aussi possible d'utiliser cet effet bénéfique de l'association symbiotique pour réduire considérablement la fertilisation au phosphate dans la culture du mûrier en introduisant une souche efficace d'endophytes locales. L'association à des VAM présente aussi un avantage pour lutter contre certains pathogènes contenus dans le sol comme l'ont rapporté de nombreux chercheurs concernant d'autres interactions VAM/hôte (Schoenbeck et Dehne, 1979).

Des études sur les effets de l'association à des VAM par rapport à la productivité, à l'effet sur les pathogènes contenus dans le sol et à la nutrition de la plante progressent. L'exploitation de l'association mycorhizale chez le mûrier devrait être considérée comme extrêmement importante car cette interaction détermine la quantité et la qualité de la production de feuilles chez le mûrier avec une utilisation d'engrais inférieure.

RESISTANCE ABILITY OF SOME MULTIVOLTINE SILKWORM RACES AGAINST FLUORINE TOXICANT (F)

HA VAN PHUC & NGUYEN THI DAM

Central Sericultural Research Center, Ministry of Agriculture and Rural Development,
Ngoc Thuy Gia Liam, Ha Noi, Vietnam.

Silkworm growth and its development relate closely with environmental conditions. Air composition, an environmental factor influences clearly the physiology and the function of silkworm besides temperature, humidity and sunlight. Since the recent development of the chemistry industry, poisonous gas from factories such as SO₂, F, Cl, in which fluorine (F) is a rather strong toxic gas, are responsible for reducing the economic efficiency of sericulture production. The efficient and economic measures lie in the selection of good resistance silkworm races against this poison.

Keywords: Fluorine gas, toxicant, poisoned, resistance, multivoltine races.

RESEARCH METHOD

We used NaF solution 200ppm to spray into mulberry leaves then fed silkworms three times per day in each instar. The experimentation comprises of three formulas as follows: using ten multivoltine silkworm races fed with mulberry leaves affected by NaF in the 3rd instar (formula one), in the 4th instar (formula two) and 5th instar (formula three).

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

After silkworm ate the mulberry leaves contaminated with fluorine poison, some black spots of difference size appeared in the silkworm body. The skin of the black spots became fragile and pus filled out make silkworm death. Thus, fluorine poison from bowel juice through digestive tract destroys silkworm skin organs (see Table I).

The influence to cocoon yield caused by fluorine depends on silkworm growth stage and silkworm races. In the third instar the silkworm is more sensitive to fluorine toxicant than other. Therefore, cocoons yield in this experimental formula is lower than that in the fourth instar and fifth instar.

Table I. Cocoon yield of silkworm effected by fluorine toxicant

Tableau I. Rendement du cocon du ver à soie atteint par un toxique à base de fluor.

Silkworm races	Third instar		Fourth instar		Fifth instar	
	Cocoon yield g/300 larvae	Compared to the control (%)	Cocoon yield g/300 larvae	Compared to the control (%)	Cocoon yield g/300 larvae	Compared to the control (%)
	<i>Troisième âge</i>		<i>Quatrième âge</i>		<i>Cinquième âge</i>	
<i>Variétés de vers à soie</i>	<i>Rendement en cocons g/300 larves</i>	<i>Par rapport au témoin (%)</i>	<i>Rendement en cocons g/300 larves</i>	<i>Par rapport au témoin (%)</i>	<i>Rendement en cocons g/300 larves</i>	<i>Par rapport au témoin (%)</i>
RVHT	189.88	67.81	204.28	72.28	226.01	80.72
DMS	147.72	52.19	177.86	62.85	219.46	80.72
S9	147.93	52.69	184.42	65.63	228.11	81.18
TM	120.68	43.68	151.41	55.06	206.93	75.25
RVTB	119.10	44.11	160.67	59.51	191.56	70.95
DSK	113.91	40.39	172.95	61.33	213.88	75.27
HLS	091.98	30.99	175.72	63.21	209.25	75.27
79	044.65	14.35	84.20	30.29	191.48	68.88
DHT	027.95	10.22	62.42	26.01	166.10	69.21
115N	0		34.17	13.78	133.09	53.66

Among 10 silkworm races, which were used as experimental materials, the resistance ability of silkworm races namely: No. 79, DHT and 115N is the weakest. Especially, silkworm race 115N poisoned with fluorine in the third instar which had a mortality rate of 100%. Cocoon yields of silkworm poisoned in the fourth instar and the fifth instar reached only 13,78 - 53,66% compared to the control.

CONCLUSION

1. Toxic symptoms of silkworm poisoned with fluorine are as follows: unequal growth, unequal moulting period and skin destruction.

2. Resistance ability of silkworms against fluorine depends on the instar periods and silkworm races. Young age silkworms suffered more damage than late age silkworms.

CAPACITE DE RESISTANCE DE QUELQUES RACES DE VERS A SOIE POLYVOLTINS A UN TOXIQUE FLUORE

HA VAN PHUC & NGUYEN THI DAM

Central Sericultural Research Center, Ministry of Agriculture and Rural Development,
Ngoc Thuy Gia Liam, Ha Noi, Vietnam.

La croissance du ver à soie et son développement sont étroitement liés à l'environnement. La composition de l'air, un facteur environnemental, influence clairement la physiologie et les fonctions du ver à soie en plus de la température, de l'humidité et de la lumière. Etant donné le récent développement de l'industrie chimique, des gaz toxiques provenant des usines tels que SO₂, F, Cl, parmi lesquels le fluor (F) est un gaz fortement toxique, réduit l'efficacité économique de la production séricicole. Le contrôle de l'efficacité et de l'économie passe par la sélection de races de vers à soie résistant à ce poison.

METHODE DE RECHERCHE

Nous avons coutume de vaporiser la solution NaF 200ppm sur les feuilles de mûriers puis de nourrir les vers à soie trois fois par jour à chaque âge. L'expérience comprend les trois formules suivantes : dix races de vers à soie polyvoltins qui se nourrissent de feuilles de mûriers traitées au NaF au troisième âge (première formule), au quatrième âge (deuxième formule) et au cinquième âge (troisième formule).

RESULTATS DES RECHERCHES ET DISCUSSION

Après que les vers à soie aient mangé les feuilles de mûriers contaminées avec le poison à base de fluor, quelques taches noires de tailles différentes apparaissent sur le corps. La peau recouverte de taches noires devient fragile et du pus surgit entraînant la mort des vers à soie. Ainsi, le poison à base de fluor provenant du liquide intestinal et pénétrant par système digestif détruit les cellules de la peau du ver à soie (voir Tableau I).

L'influence sur le rendement en cocons du fluor dépend de la phase de croissance du ver à soie et des races de vers à soie. Au troisième âge, le ver à soie est plus sensible au toxique à base de fluor qu'aux autres âges. Par conséquent, le rendement en cocons dans cette formule expérimentale est plus bas que celui du quatrième âge et du cinquième âge.

Parmi les 10 races de vers à soie qui sont utilisées comme matériel expérimental, les capacités de résistance des races de vers à soie : No. 79, DHT et 115N sont les plus faibles. En particulier, la race de vers à soie 115N traitée au fluor toxique meurt inéluctablement au troisième âge. Les rendements en cocons de vers à soie empoisonnés au quatrième âge et au cinquième âge atteignent seulement 13,78 - 53,66 % par comparaison avec le témoin.

CONCLUSION

1. Les symptômes toxiques du ver à soie traité par un toxique à base de fluor sont une croissance inégale chez les vers à soie, une période de mue inégale et une peau abîmée.

2. La capacité de résistance des vers à soie face au fluor dépend de l'âge et des races de vers à soie. Le ver à soie d'un jeune âge subit plus de dommages que le ver à soie d'un âge plus avancé.

STUDIES ON HYBRID VIGOUR IN DIFFERENT CROSSES OF THE SILKWORM *BOMBYX MORI*

RAVINDRA SINGH*, P. SUDHAKARA RAO, G. V. KALPANA, H. K. BASAVARAJA,
M. M. AHSAN & R. K. DATTA

Central sericultural Research & Training Institute, Mysore - 570 008, India.

Heterotic effects for several quantitative characters among F1 hybrids of 4 polyvoltine and 10 bivoltine strains were studied. Polyvoltine × bivoltine hybrids exhibited higher hybrid vigour as compared to bivoltine × bivoltine hybrids. Most of the hybrids revealed high heterosis for cocoon weight, cocoon shell weight and daily cocoon shell weight in V age. This study indicated the need for exploitation of hybrid vigour for quantitative characters in increase silk production and to select suitable parents for breeding.

Keywords: Hybrid vigour, breeding, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

Studies on hybrid vigour have been extensively carried out by plant (Marani, 1967; Kaushik *et al.*, 1984) and animal breeders (Chang *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1990) to select suitable parents and hybrids to assess the nature and magnitude of gene action involved in various characters. Recently, there appeared a few reports on heterotic effects of several quantitative characters in the silkworm, *Bombyx mori* (Singh *et al.*, 1992; 1994; Malik *et al.*, 1994; Banuprakash *et al.*, 1994). In most of the tropical countries like India, selection of suitable parents for the evolution of superior hybrids as well as designing of meaningful breeding programmes is necessitated. In order to formulate an efficient breeding plan for improvement of genetic make up of existing material, the present study has been undertaken by utilizing polyvoltine and bivoltine strains of the silkworm, *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Four polyvoltine strains viz. BL27, GNP (Chinese type) C. Nichi and B1A (Japanese type) and 10 bivoltine strains namely, CSR2; A, B, C3, HU204 (Chinese type) CSR4, CSR5, CSR6, NB4D2 and J2 (Japanese type) have been utilized in the present study. Crosses were planned on the basis of parental rearing performance, larval marking and cocoon shape. The hybrids were raised in randomized Block Design (RBD) with three replications each and 350 larvae in each replication. Data were recorded for cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight, single cocoon weight, single cocoon shell weight, cocoon shell ratio, and daily shell weight in V age larval duration.

Heterosis was estimated by using following formulae:

$$1) \text{ Heterosis over mid parent value (MPV)} = \frac{F1 - MPV \times 100}{MPV}$$

* For future correspondence

$$2) \text{ Heterosis over better parent value (BPV)} = \frac{F1 - BPV \times 100}{BPV}$$

RESULTS AND DISCUSSION

Manifestation of hybrid vigour in different crosses over mid parent and better parent values have been shown in Table I. In general, heterosis values were found higher in Japanese $\times$ Japanese type crosses as compared to Chinese $\times$ Chinese type. Very high heterosis was observed in cocoon yield / 10,000 larvae (57.59 %) in C. Nichi $\times$ NB4D2 followed by C. Nichi $\times$ J2 (46.09 %). Maximum hybrid vigour for single cocoon weight was noticed in GNP $\times$ CSR2 (51.42 %) followed by GNP $\times$ A (47.65 %) and C. Nichi $\times$ CSR5 (46.49 %) respectively. Heterotic effects were higher in Japanese $\times$ Japanese hybrids for single cocoon shell weight. Hybrid vigour for daily cocoon shell weight in V age was maximum (75.00 %) in C. Nichi $\times$ J2 followed by C. Nichi $\times$ CSR6 (62.06 %) and BL27 $\times$ CSR2 (58.82 %) respectively (Table-I).

High heterotic effects were observed for several quantitative characters and the degree of heterosis varied for different crosses and different characters. It was interesting to note that hybrid vigour was found higher in Japanese $\times$ Japanese hybrids when compared to Chinese $\times$ Chinese hybrids. Similar results have been reported by Sekido *et al.*, (1979). Also, heterosis was higher in polyvoltine $\times$ bivoltine as compared to bivoltine $\times$ bivoltine hybrids. These results are in agreement with those reported by Yucheng (1964).

The heterotic effects were very high in some characters like cocoon weight, cocoon shell weight and daily cocoon shell weight in V age, whereas they were low in cocoon yield / 10000 larvae by number and cocoon shell ratio. Subba Rao and Sahai (1989) have observed negative heterosis for cocoon shell ratio and filament length. In the present study, most of the hybrids have shown negative heterosis over better parent value for cocoon shell ratio. This study gives an indication for exploitation of hybrid vigour for quantitative characters to increase silk yield and to select superior parents / hybrids for breeding. Some of the characters like pupation rate can be exploited through heterosis breeding and recurrent selection.

REFERENCES

- BANUPRAKASHI, K. G.; GOVINDAN R., DEVAIAH M. C. (1994) Heterosis observed in the hybrids between some improved multivoltines and bivoltines of *Bombyx mori*. Insect Sci. Applic. 15(2) : 313-312.
- CHANG K. V.; HAN K. S., MIN B. Y. (1981) Genetic studies on silkworm characters by diallel cross. II. Analysis of heterosis and combining abilities. Seric. J. Korea 22 (2) : 127.
- KAUSHIK I. S., SINGH D. P., PARODA R. S. (1984) Line $\times$ tester analysis for fixed effect model in cotton (*Gossypium hirsutum*). Theor. Appl. Genet. 68 : 487-491.
- MALIK G. N., KAMILI A. S., TRAG A. R., LONE A. H. (1994) Heterobeltiotic analysis for six traits in some silkworm *Bombyx mori*. L. genotypes. Entomon 19 (3 & 4) : 105-108.
- MARANI A. (1967) Heterosis and combining ability in intra and interspecific crosses of cotton Crop. Sci. 7 : 519-522.
- SEKIDO K., TOTANI K., HORIUCHI T. (1979) Silkworm Breeding. Text II. (Eds) K. Takamiya; T. Machimura. Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries. Japan, p. 8-20.
- SINGH R.; NAGARAJU J.; RAO P. R. M.; PREMALATHA V.; VIJAYARAGHAVAN K.; SENGUPTA S. K. (1990) Heterosis analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. L. Sericologia 30 (3) : 293-300.
- SINGH R.; VIJAYARAGHAVAN K.; PREMALATHA V.; RAO P. R. M.; SENGUPTA S. K.; KANNANTHA V. (1992) Hybrid vigour in F1, F2 and backcrosses in silkworm, *Bombyx mori*. L. Mysore J. Agri. Sci. 26(1) : 76-81.

Table 1. Heterosis values in different crosses of the silkworm, *Bombyx mori* L.Tableau 1. Valeurs de l'hétérosis dans différents croisements du ver à soie, *Bombyx mori* L.

Sl. Combination No.	Yield/10,000 larvae By No.	By Wt.	Cocoon wt.	Cocoon shell wt.	SR%	Daily shell wt. in Vth age	Total Heterosis
Combinaison No.	Rendement / 10000 larves en nombre.	en poids	Poids du cocon	Poids de la coque	RS %	Poids quotidien de la coque au V ^e âge	Hétérosis totale
POLYVOLTINE × BIVOLTINE (JAPANESE TYPE) / <i>POLYVOLTIN</i> × <i>BIVOLTIN</i> (TYPE JAPONAIS)							
1. C. NICHII × CSR5	MPV + 5.33	+44.91	+46.49	+58.69	+12.23	+36.36	+204.21
	BPV + 1.01	+31.92	+32.45	+12.30	-15.08	+2.27	+64.87
2. C. NICHII × NB4D2	MPV + 3.69	+57.59	+40.52	46.85	+7.43	+22.24	+180.32
	BPV + 0.33	+46.78	+28.86	+06.19	-17.57	-6.81	+57.78
3. C. NICHII × CSR6	MPV + 1.44	+44.16	+41.28	+50.54	+9.39	+62.06	+205.99
	BPV + 3.47	+35.46	+29.76	+6.61	-17.85	+30.55	+81.06
4. C. NICHII × J2	MPV + 5.84	+46.09	+45.15	+59.47	+9.11	+75.00	+240.66
	BPV + 5.21	+39.39	+43.21	+22.61	+16.59	+55.55	+182.56
5. B1A × CSR4	MPV + 9.59	+5.24	+13.73	+26.31	+10.90	+36.84	+83.43
	BPV -15.17	-3.54	+12.68	+6.66	-7.08	+20.93	+14.48
BIVOLTINE × BIVOLTINE (JAPANESE TYPE) / <i>BIVOLTIN</i> × <i>BIVOLTIN</i> (DE TYPE JAPONAIS)							
6. J2 × CSR6	MPV - 2.73	+1.92	+12.16	+10.96	-0.79	+41.93	+63.45
	BPV - 4.19	+0.70	+1.76	-1.55	-3.30	+22.22	+15.64
7. J2 × NB4D2	MPV + 8.30	+38.50	+35.47	+38.63	+2.11	+51.42	+174.43
	BPV + 5.37	+35.04	+22.48	+26.03	+1.48	+20.45	+110.85
8. CSR4 × CSR5	MPV +16.32	+29.47	+18.89	+24.61	+2.82	+16.27	+108.38
	BPV + 11.56	+21.57	+14.94	+20.00	+1.29	+13.63	+82.99
POLYVOLTINE × BIVOLTINE (CHINESE TYPE) / <i>POLYVOLTIN</i> × <i>BIVOLTIN</i> (DE TYPE CHINOIS)							
9. BL27 × CSR2	MPV + 3.12	+30.02	+35.73	+46.21	+8.23	+58.82	+182.13
	BPV + 1.45	+18.73	+30.24	+22.96	-5.59	+38.46	+106.25
10. BL27 × B	MPV + 7.38	+18.99	+27.95	+36.96	+8.16	+44.44	+129.14
	BPV + 9.85	+10.64	+15.55	+9.66	-5.12	+20.93	+41.84
11. GNP × CSR2	MPV + 2.97	+37.35	+51.42	+42.08	-1.92	+48.48	+180.38
	BPV + 2.02	+16.79	+28.46	+1.41	-21.04	+25.64	+53.28
12. GNP × A	MPV + 9.64	+26.68	+47.65	+45.81	+3.01	+37.84	+151.39
	BPV + 13.26	+16.59	+25.58	+3.48	-17.57	+13.33	+27.83
BIVOLTINE × BIVOLTINE (CHINESE TYPE) / <i>BIVOLTIN</i> × <i>BIVOLTIN</i> (DE TYPE CHINOIS)							
13. A × CSR2	MPV + 8.09	+7.60	+21.68	+11.97	-8.11	+11.90	+53.13
	BPV +4.69	-2.03	-21.30	+11.18	-8.89	+4.44	-11.91
14. C3 × CSR2	MPV +1.93	+0.01	+3.14	+10.91	+3.56	+2.27	+21.82
	BPV + 0.89	-2.03	-2.62	+10.14	+1.82	-8.16	+0.04
15. HU204 × CSR2	MPV + 5.02	+5.52	+8.65	+7.28	-0.92	-2.56	+25.55
	BPV + 2.58	-5.29	+6.37	-6.36	-11.95	-5.00	-14.65

- SINGH R.; JAYASWAL K. P.; SARATCHANDRA B. (1994) Parthenogenetic development of ovarian eggs in some breeds of silkworm *Bombyx mori* L. *Entomon* 19 (1 & 2) : 57-62.
- SUBBA RAO G., SAHAI V. (1989) Combining ability and heterosis studies in bivoltine strains of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Uttar Pradesh J. Zool.* 9 (2) 150-164.
- YUCHENG W. (1964) Studies on heredity rules of cocoon quantitative characters of the silkworm, *Bombyx mori*. I. General hereditary rules of cocoon and cocoon shell weight. *Canye Kexue*: 1-9.

ETUDES SUR LA VIGUEUR HYBRIDE DANS DIFFERENTS CROISEMENTS CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI*

RAVINDRA SINGH*, P. SUDHAKARA RAO, G. V. KALPANA, H. K. BASAVARAJA,
M. M. AHSAN & R. K. DATTA

Central sericultural Research & Training Institute, Mysore - 570 008, Inde.

Les effets de l'hétérosis pour plusieurs caractères quantitatifs parmi les hybrides F1 entre 4 variétés polyvoltines et 10 bivoltines ont été étudiés. Les hybrides polyvoltins × bivoltins présentent une vigueur hybride plus élevée que les hybrides bivoltins × bivoltins. La plupart des hybrides révèlent une hétérosis élevée pour le poids du cocon, le poids de la coque et le poids quotidien de la coque au cinquième âge. Cette étude indique qu'il est nécessaire d'exploiter la vigueur hybride pour des caractères quantitatifs dans la production croissante de soie et de sélectionner des parents appropriés pour l'élevage.

INTRODUCTION

Des études sur la vigueur hybride ont été effectuées de façon considérable par des phytogénéticiens (Marani, 1967; Kaushik et coll., 1984) et par des éleveurs (Chang. et coll., 1981; Singh et coll., 1990) pour sélectionner des parents appropriés et des hybrides afin d'évaluer la nature et l'étendue de l'action des gènes impliqués dans différents caractères. Récemment, quelques rapports sur les effets de l'hétérosis pour plusieurs caractères quantitatifs chez le ver à soie, *Bombyx mori* (Singh et coll., 1992; 1994, Malik et coll., 1994; Banuprakash et coll., 1994) ont été publiés. Dans la plupart des pays tropicaux comme l'Inde, la sélection de parents appropriés pour l'évolution des hybrides supérieurs aussi bien que pour la désignation de parents appropriés pour l'évolution des hybrides supérieurs est rendue nécessaire. Afin d'élaborer un plan efficace pour l'amélioration de la composition génétique du matériel existant, la présente étude a été entreprise en utilisant des souches polyvoltines et bivoltines du ver à soie, *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Quatre souches polyvoltines c'est-à-dire BL27, GNP (type chinois) C. Nichi et B1A (type japonais) et 10 souches bivoltines à savoir, CSR2, A, B, C3, HU204 (type chinois), CSR4, CSR5, CSR6, NB4D2 et J2 (type japonais) ont été utilisées dans cette étude. Des croisements ont été planifiés sur la base des performances d'élevage parental, des marquages larvaires et de la forme du cocon. Les hybrides ont été élevés selon un plan de blocs aléatoires avec trois répétitions pour chacun et 350 larves dans chaque répétition. Les données ont été enregistrées pour le rendement en cocons / 10000 larves à la fois en nombre et en poids, pour le poids du cocon individuel, pour le poids de la coque, pour la richesse soyeuse, et pour le poids quotidien de la coque pendant le cinquième âge. L'hétérosis est évaluée en utilisant les formules suivantes :

* Pour toute correspondance ultérieure.

$$1) \text{ L'hétérosis au-dessus de la valeur parentale médiane (MPV)} = \frac{F1 - MPV \times 100}{MPV}$$

$$2) \text{ L'hétérosis au-dessus de la valeur parentale supérieure (BPV)} = \frac{F1 - BPV \times 100}{BPV}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

La manifestation de la vigueur hybride dans différents croisements au-dessus des valeurs parentales moyennes et supérieures est présentée dans le tableau I. En général, les valeurs de l'hétérosis sont plus élevées dans les croisements de type Japonais $\times$ Japonais que dans les croisements Chinois $\times$ Chinois. On observe une hétérosis très élevée pour le rendement du cocon / 10000 larves (57,59 %) dans C. Nichi $\times$ NB4D2 suivi par C. Nichi $\times$ J2 (46,09 %). La vigueur hybride maximale pour le poids du cocon est respectivement chez GNP $\times$ CSR2 (51,42 %) suivi par GNP $\times$ A (47,65 %) et C. Nichi $\times$ CSR5 (46,49 %). Les effets de l'hétérosis sont plus forts chez les hybrides Japonais $\times$ Japonais pour le poids de la coque. La vigueur hybride pour le poids quotidien de la coque au cinquième âge est maximal (75,00 %) chez C. Nichi $\times$ J2 suivi par C. Nichi $\times$ CSR6 (62,06 %) et BL27 $\times$ CSR2 (58,82 %) (tableau I).

Les effets élevés de l'hétérosis sont observés pour plusieurs caractères quantitatifs et le degré de l'hétérosis varie pour différents croisements et différents caractères. Il est intéressant de remarquer que la vigueur hybride est plus forte chez les hybrides Japonais $\times$ Japonais que chez les hybrides Chinois $\times$ Chinois. Sekido et coll., (1979) ont rapporté des résultats similaires. Aussi, l'hétérosis est plus élevée chez les polyvoltins $\times$ bivoltins que chez les hybrides bivoltins $\times$ bivoltins. Ces résultats correspondent à ceux obtenus par Yucheng (1964).

Les effets de l'hétérosis sont très élevés pour certains caractères tels que le poids du cocon, le poids de la coque et le poids quotidien de la coque au cinquième âge, alors qu'ils sont bas pour le rendement du cocon / 10000 larves en nombre et pour la richesse soyeuse du cocon. Subba Rao et Sahai (1989) ont observé une hétérosis négative pour la richesse soyeuse et pour la longueur du filament. Dans la présente étude, la plupart des hybrides montrent une hétérosis négative au-dessus de la valeur parentale supérieure pour la richesse soyeuse du cocon. Cette étude apporte une indication pour l'exploitation de la vigueur hybride pour les caractères quantitatifs afin d'accroître le rendement de la soie et de sélectionner des parents / hybrides supérieurs pour l'élevage. Certains des caractères tels que le taux de pupation peuvent être exploités par l'hétérosis, la sélection récurrente.

REDUCTION OF MORTALITY BY SOME ANTIBIOTICS IN NUCLEAR POLYHEDROSIS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

J. BHATTACHARYA, N. KRISHNAN, A. K. CHANDRA, N. K. DAS & S. K. SEN

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

Efficacy of three antibiotics viz. Rifampicin, Chloramphenicol and Cifran at 0.05 % concentrations was tested against nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection in silkworm. Rifampicin proved to be significantly effective in reducing mortality of NPV infected worms, followed by Chloramphenicol. Cifran was not found to be as effective, increasing the survival of worms significantly only during a single rearing season. The treatments had no significant effect in increasing the survival of healthy worms.

Keywords: Nuclear polyhedrosis (Grasserie), antibiotics.

INTRODUCTION

Oral administration of antibiotics along with mulberry leaves to healthy silkworms boosts the growth, fecundity and silk content (Murthy *et al.*, 1951; Tayade *et al.*, 1988) as well as reduces incidence of diseases (Manchev *et al.*, 1984; Rai and Devaiah, 1988). However, scant information is available regarding efficacy of antibiotics as chemotherapeutic agents in controlling silkworm diseases except the work of Ueda *et al.* (1955) who noted that Grasseriomycin, produced by a strain of *Streptomyces lavendulae*, as effective against nuclear polyhedrosis of silkworm. Recently, Sivaprakasam and Rabindra (1995) also reported Tetracycline and Gentamycin to be effective in reducing mortality in silkworm against this disease.

In the present investigation three antibiotics were tried against NPV infection in silkworm for reducing mortality.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in three rearing seasons on a multivoltine hybrid (N×G) of silkworm, with three replications each consisting of 40 worms during April and 30 worms during June and July-August 1995. Occlusion bodies (OBs) were collected from the haemolymph of the NPV infected silkworm larvae and purified by centrifugation using Percoll (colloidal PVP coated silica for cell separation, Sigma Chemical Co., USA). Third instar larvae, just after ecdysis, were fed occlusion bodies (OBs) of *Bombyx mori* NPV (8×10^8 OBs/ml) by smearing the suspension uniformly on mulberry leaves. Three antibiotics viz. Rifampicin (a DNA polymerase inhibitor), Chloramphenicol (a broad spectrum antibiotic) and Cifran (a DNA gyrase inhibitor) were dissolved in distilled water at 0.05 % concentration independently. Mulberry leaves were dipped in freshly prepared solutions, air dried and fed to silkworms once daily. The antibiotics were administered from the next day of inoculation and continued up to spinning. Untreated control lots were fed with leaves dipped in distilled water. Non-inoculated control lots were also treated with these antibiotics to observe the effect of the said antibiotics on healthy worms. The dead larvae were examined individually to ascertain the cause of mortality.

RESULTS AND DISCUSSION

It was observed that treatment of Rifampicin, Chloramphenicol and Cifran increased survival of NPV infected silkworms by 9.24, 7.05 and 5.05 % in average over infected control (Table I).

Table I. Survival (%) of NPV infected silkworms treated with antibiotics.

Tableau I. Survie (%) des vers à soie infestés par NPV traités aux antibiotiques.

Lot	Treatment	Apr 95	Jun 95	Jul-Aug 95	Mean	Gain over control (%)
<i>Lot</i>	<i>Traitement</i>	<i>Avr 95</i>	<i>Juin 95</i>	<i>Juil-Août 95</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Gain par rapport au témoin (%)</i>
NPV infected worms <i>Vers à soie infectés de NPV</i>	Rifampicin (0.05%) <i>Rifampicine (0.05%)</i>	33.30 (35.24)	51.11 (45.64)	7.71 (16.12)	30.71 (32.33)	9.24
	Chloramphenicol (0.05%)	41.43 (40.06)	41.94 (40.36)	2.18 (8.49)	28.52 (29.64)	7.05
	Cifran (0.05%)	31.46 (34.12)	47.73 (43.70)	0.37 (3.51)	26.52 (27.11)	5.05
	Control (untreated) <i>Témoin (non traité)</i>	30.81 (33.71)	33.22 (35.20)	0.37 (3.51)	21.47 (24.14)	
Healthy worms <i>Vers à soie sains</i>	Rifampicin (0.05%) <i>Rifampicin (0.05%)</i>	80.16 (63.55)	94.56 (76.52)	80.24 (63.60)	84.99 (67.89)	
	Chloramphenicol (0.05%)	65.93 (54.29)	85.59 (67.69)	92.59 (74.20)	81.37 (65.39)	
	Cifran (0.05%)	70.88 (57.34)	95.68 (78.00)	88.94 (70.57)	85.17 (68.64)	
	Control (untreated) <i>Témoin (non traité)</i>	68.02 (55.56)	86.67 (68.58)	94.02 (75.85)	82.90 (66.66)	
CD at P=0.05 Treatment / <i>Traitement</i>			4.60			
DC at P=0.05						
Season / <i>Saison</i>			2.82			
Treatment × season / <i>Traitement × saison</i>			7.97			

Figures in parentheses indicate arcsins transformed values. / *Les figures entre parenthèses indiquent les valeurs transformées.*

Out of three antibiotics, Rifampicin was found to be most effective that significantly increased the survival of infected worms all along except in April 1995 when the increase in survival was statistically insignificant. Rifampicin, a semi-synthetic derivative of Rifamycin which is isolated from *Streptomyces mediterraneus*, is a clinically useful antibiotic and is best known for its activity against *Mycobacterium tuberculosis*. The drug interferes with RNA synthesis by becoming bound to DNA dependent RNA polymerase (Torchini-Valentini *et al.*, 1968). Inhibition of poxvirus replication (Heller *et al.*, 1969; Subak-Sharpe *et al.*, 1969) by Rifampicin and other Rifamycin derivatives suggested that the hydrazone side chain of Rifampicin was responsible for its antiviral activity (Ben-Ishai *et al.*, 1969). The present observations also corroborate the findings of Dougherty *et al.*, (1982) who reported the specific activity of Rifampicin on occluded virus forms of NPV which blocks occlusion until late in the replication cycle (14-16 hrs.) in *Trichoplusia ni* T-368 cells. The inhibitory effect of Rifampicin in checking the multiplication of NPV in *B. mori* is thus substantiated.

Chloramphenicol, a broad spectrum antibiotic, significantly increased the average survival percent of infected worms albeit the increase was not significant in some specific seasons. This minor difference in survival percent may either be due to considering less number of replications or interaction of other seasonal factors. Manchev *et al.* (1984) also made similar observations and noted that Chloramphenicol and certain other antibiotics could control spontaneous outbreak of nuclear polyhedrosis and flacherie in silkworm. Rai and Devaiah (1988), on the other hand, observed that Chloramphenicol had no effect on the incidence of diseases like NPV and CPV in silkworm, but reduced the incidence of flacherie.

Cifran was observed to be not quite effective because it caused a significant increase in survival only during a single rearing season i. e. June 1995. Cifran is a fluoroquinolone antimicrobial agent with potent activity against a broad spectrum of gram-positive and gram-negative bacteria. The unique mode of action of Cifran involves blocking of DNA gyrase and disruption of DNA functions. The non-effectiveness of this particular drug in controlling polyhedrosis infection in silkworm may be attributed to the highly specific nature of its activity unlike Rifampicin and Chloramphenicol.

Survival percentage of antibiotic treated healthy worms was on par with control except that it was significantly more in Rifampicin and Cifran treated lots in April 1995 and June 1995 seasons. As a whole, no significant difference between the treated and control lots was observed. Therefore, the antibiotics seemed to have neither favourable nor adverse effect on survival percent of healthy worms.

Microscopic examination of dead larvae collected from control and treated lots of infected or healthy worms revealed that the cause of mortality was solely due to NPV.

Though it was reported that feeding of antibiotics viz. Chloramphenicol to healthy silkworms increased survival and growth of worms (Samokhvalova, 1981, 1982.), treatment of Rifampicin, Chloramphenicol or Cifran used in the present investigation could not cause a significant increase in the survival of healthy worms except on one or two occasions. However, based on these observations it is difficult to arrive at a definite conclusion. Dose dependent studies with antibiotics like Rifampicin would probably be helpful in establishing their favourable or adverse effects on healthy silkworm populations. Treatment of the same to the infected worms, on the other hand, was able to reduce their mortality due to NPV. Similarly, Sivaprakasam and Rabindra (1995) reported antibiotics like Tetracycline and Gentamycin to be effective in reducing mortality of NPV infected worms. At this juncture, the mode of action of the antibiotics in combating viral infections is not properly understood, except in the case of specific antibiotics like rifampicin which do have an inhibitory effect on virus replication by blocking the occlusion process, though, the exact mechanisms of inhibiting inclusion body production are not known.

REFERENCES

- BEN-ISHAÏ Z., HELLER E., GOLDBLUM N., BECKER Y. (1969) Rifampicin poxvirus and trachoma agent. *Nature*, 224, 29.
- DOUGHERTY E. M., WEINER R. M., VAUGHN J. L., REICHELDERFER C. F. (1982) Rifampin inhibition of the occluded virus form of a nuclear polyhedrosis virus. *Antimicrob. agents & Chemother.*, 22(3) 527-530.
- HELLER E., ARGAMAN M., LEVY H., GOLDBLUM N. (1969) Selective inhibition of the vaccinia virus by the antibiotic Rifampicin. *Nature*, 222, 273.
- MANCHEV M., DONEVA M., DONEV B. (1984) Attempts to use therapeutic agents against diseases in the silkworm moth (*Bombyx mori*) *Vet. Med. Nauki.*, 21 (3), 91-95.
- MURTHY M. R. V., SHANKARAPPA B. S., SREENIVASAYYA M. (1951) Influence of antibiotics on the growth of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Curr. Sci.*, 20, 269-270.
- RAI B. R., DEVAIAH M. C. (1988) Effect of antibiotics on the incidence of diseases in silkworm *Bombyx mori* L. *International Congress on Tropical Sericultural Practices*, Bangalore.
- SAMOKHVALOVA G. V. (1981) Effect of chloramphenicol on the survival and development rate of the silkworm *Bombyx mori* when it is fed with dandelion *Taraxacum officinale*. *Vestn. Mosk. Univ. Ser. XVI Biol.*, 0 (1), 24-27.
- SAMOKHVALOVA G. V. (1982) Effect of levomycetin on viability and growth of the silkworm *Bombyx mori* fed on *Scorzonera hispanica*. *Zh. Obshch. Biol.*, 43 (5), 676-681.
- SUBAK-SHARPE J. H., TIMBURY M. C., WILLIAMS J. F. (1969) Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses. *Nature*, 222, 341.
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R. J. (1995) Efficacy of certain antibiotics against grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. *In Proc. Training Course in sericulture*, Vol. III - Reading material Part 2, Agrawal H. O. and Seth M. K. (Eds), H. P. U., Simla, India, pp. 500-507.
- TAYADE D. S., JAWALE M. D., UNCHEGAONKAR P. K. (1988) Effect of antibiotics on the growth of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 27 (2), 69-72.
- TOCCHINI-VALENTINI G. P., MARINO P., COLVILL A. J. (1968) Mutant of *E. coli* containing an altered DNA dependent RNA polymerase. *Nature*, 220, 275.
- UEDA K., OKIMOTO Y., SAKAI H., ARIMA K., YONEHARA H., SAKAGAMI Y. (1955) An antibiotic against silkworm jaundice virus, grasseriomycin, produced by *Streptomyces* species. *Jour. Antibiotics*, 8 (3), 91-95.

REDUCTION DE LA MORTALITE DUE A LA POLYEDROSE NUCLEAIRE CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L. PAR QUELQUES ANTIBIOTIQUES

J. BHATTACHARYA, N. KRISHNAN, A. K. CHANDRA, N. K. DAS & S. K. SEN

Central Sericultural Research and Training Institute Berhampore 742101, West Bengal, Inde.

L'efficacité de trois antibiotiques, la rifampicine, le chloramphénicol et le cifran à des concentrations de 0,05 % a été analysée contre l'infection par le virus de la polyédrose nucléaire (NPV) chez le ver à soie. La rifampicine s'avère être efficace pour réduire la mortalité de vers infestés par le NPV, suivi par le chloramphénicol. Le cifran n'apparaît pas aussi efficace, il n'a augmenté la survie des vers de manière significative que pendant une unique saison d'élevage. Les traitements n'ont pas d'effet significatif sur la survie des vers sains.

INTRODUCTION

L'administration orale d'antibiotiques avec les feuilles de mûrier augmente la croissance, la fécondité et la teneur en soie chez les vers à soie sains (Murthy et coll., 1951 ; Tayade et coll., 1958) et réduit l'incidence des maladies (Manchev et coll., 1984, Rai et Devaiah, 1988). Cependant, l'information concernant l'efficacité des antibiotiques comme agents chimiothérapeutiques pour le contrôle des maladies du ver à soie est rare, excepté le travail d'Ueda et coll., (1955) qui a observé que la grasseriomycine produite par une souche de *Streptomyces lavendulae*, est efficace contre la polyédrose nucléaire du ver à soie. Récemment, Sivaprakasam et Rabindra (1995) ont aussi rapporté que la tétracycline et la gentamycine sont efficaces pour baisser la mortalité du ver à soie face à cette maladie.

Dans ce travail, nous avons essayé trois antibiotiques contre l'infestation par le NPV chez le ver à soie en vue de réduire la mortalité.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée sur trois saisons d'élevage avec un hybride de ver à soie polyvoltin (N × G) avec trois répétitions comprenant chacune 40 vers en Avril et 30 vers en Juin et Juillet-Août 1995. Les corps d'occlusion (OC) sont recueillis à partir de l'hémolymphe des larves de vers à soie infestées par le NPV et purifiés par centrifugation Percoll (silice recouverte de PVP colloïdale pour la séparation des cellules, Sigma Chemical Co., USA). Les larves au troisième âge, juste après l'ecdysis, sont nourries avec des corps d'occlusion (CO) de NPV de *Bombyx mori* à raison de 8×10^8 CO/ml en appliquant la suspension uniformément sur les feuilles de mûrier. Trois antibiotiques, la rifampicine (un inhibiteur de l'ADN polymérase), le chloramphénicol (un antibiotique de large portée) et le cifran (un inhibiteur de la gyrase de l'ADN) ont été indépendamment dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 0,05 %. Les feuilles de mûrier sont trempées dans des solutions fraîchement préparées, séchées à l'air et données aux vers à soie une fois par jour. Les antibiotiques sont administrés le jour après l'inoculation jusqu'au filage. Les lots témoins non traités sont nourris avec des feuilles trempées dans de l'eau distillée. Les lots témoins non inoculés sont également traités avec ces antibiotiques pour observer les effets des antibiotiques en question sur les vers sains. Les larves mortes sont examinées individuellement afin de s'assurer de la cause de la mortalité.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe que les traitements à la rifampicine, au chloramphénicol et au cifran augmentent la survie des vers à soie infestés par le NPV de 9,24, 7,05 et de 5,05 % en moyenne par rapport au témoin infesté (Tableau I).

Sur les trois antibiotiques, la rifampicine est la plus efficace pour augmenter la survie des vers infestés de manière significative pendant toute la durée excepté en Avril 1995 où l'augmentation de survie n'est pas significative sur le plan statistique. La rifampicine, un dérivé semi-synthétique de rifamycine isolé à partir de *Streptomyces mediterraneus*, est un antibiotique cliniquement utile, mieux connu pour son action contre *Mycobacterium tuberculosis*. L'antibiotique interfère avec la synthèse de l'ARN en se liant à l'ARN polymérase dépendant de l'ADN (Trochini-Valentini et coll., 1968). L'inhibition de la réplication du virus de la variole (Heller et coll., 1969 ; Subak-Sharpe et coll., 1969) par la rifampicine et d'autres dérivés de rifamycine suggère que la chaîne latérale d'hydrazone de la rifampicine est responsable de son activité antivirale (Ben-Ishai et coll., 1969). Ces observations corroborent les résultats de Dougherty et coll., (1982) qui ont fait part de l'activité spécifique de la rifampicine sur les formes occluses du virus NPV, en bloquant l'occlusion jusqu'à la fin du cycle de réplication (14-16 heures) chez les cellules T-368 de *Trichoplusia ni*. L'effet inhibiteur de la rifampicine, dans le cadre de l'observation de la multiplication de NPV chez *B. mori*, est donc prouvé.

Le chloramphénicol, un antibiotique à large portée, augmente le taux de survie moyen de manière significative des vers infestés bien que l'augmentation ne soit pas significative pendant certaines saisons. Cette différence mineure de taux de survie peut être soit due au nombre moindre de répétitions ou à l'interaction de facteurs saisonniers. Manchev et coll., (1984) ont également fait des observations similaires et remarqué que le chloramphénicol et certains autres antibiotiques peuvent maîtriser l'éruption spontanée de polyédrose nucléaire et de la flacherie chez le ver à soie. Rai et Devaiah (1988), d'autre part, ont observé que le chloramphénicol n'a pas d'effet sur l'incidence de maladies telles que le NPV et le CPV chez le ver à soie mais qu'il réduit l'incidence de la flacherie.

On observe que le cifran n'est pas aussi efficace parce qu'il n'a provoqué une augmentation significative de la survie que pendant une seule saison, en l'occurrence en Juin 1995. Le cifran est un agent antimicrobien de fluoroquinone à l'action puissante contre un large éventail de bactéries gram-positives et gram-négatives. Le mode d'action unique du cifran consiste à bloquer l'ADN gyrase et à désorganiser les fonctions de l'ADN. La non-efficacité de ce produit en particulier pour contrôler l'infestation par la polyédrose chez le ver à soie est peut-être due à la nature hautement spécifique de son action à la différence de la rifampicine et du chloramphénicol.

Le taux de survie des vers sains traités aux antibiotiques est égal à celui du témoin si ce n'est qu'il est plus fort pour les lots traités à la rifampicine et au cifran pour les saisons d'Avril et de Juin 1995. Dans l'ensemble, on n'observe pas de différence significative entre les lots traités et témoins. Ainsi, les antibiotiques semblent n'avoir ni un effet favorable ni un effet adverse sur le taux de survie des vers sains.

L'examen au microscope des larves mortes recueillies dans les lots de vers à soie infestés ou sains traités et témoins prouve que la cause de mortalité provient uniquement du NPV.

Bien que l'on ait signalé que l'administration d'antibiotiques en l'occurrence de chloramphénicol aux vers à soie sains augmente la survie et la croissance des vers (Samokhvalova, 1981, 1982), le traitement à la rifampicine, au chloramphénicol ou au cifran utilisé dans cette étude n'a pas permis une augmentation significative de la survie des vers sains à l'exception d'une ou deux occasions. Cependant, il est difficile d'arriver à une conclusion définitive à partir de ces observations. Des études d'effet de doses, avec des antibiotiques comme la rifampicine seraient sûrement utiles pour déterminer leurs effets favorables ou défavorables sur les populations de vers à soie sains. Le même traitement sur les vers infestés, par contre, a permis de réduire la mortalité provoquée par le NPV. De même Sivaprakasam et Rabindra (1995) ont signalé que les antibiotiques comme la tétracycline et la gentamycine sont efficaces pour réduire la mortalité de vers infestés par le NPV. A ce point là, on ne comprend pas complètement le mode d'action des antibiotiques dans la lutte contre les infections virales, excepté dans le cas d'antibiotiques spécifiques comme la rifampicine qui ont vraiment un effet inhibiteur sur la réplication du virus en bloquant l'opération d'occlusion, bien que les mécanismes exacts d'inhibition de la production de corps d'inclusion ne soient pas connus.

STUDIES ON THE SUITABILITY OF SOYBEAN (KHSB-2 VARIETY) AS AN INTERCROP IN MULBERRY (M-5 VARIETY) UNDER IRRIGATED CONDITIONS

U. D. BONGALE, R. M. SHIVAPRAKASH & M. VEERESH

Moriculture Division, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute,
Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, India.

*Information on legumes for intercropping in mulberry is extremely scanty. Suitability of KHSB-2 variety soybean *Glycine max* Merr., with one, two and three rows (at plant spacings of 30 × 60 cm) was studied under irrigated cultivation for two years with uniform inputs for all the treatments. Observations on 12 harvests of mulberry and four of soybean were recorded. Pooled data revealed that the treatments did not differ significantly with respect to the leaf yield and nitrogen and moisture contents of mulberry. Total nitrogen harvest through soybean seed differed significantly with maximum values of 2.36 kg / 100 sq.m / 4 harvests in case of 3 rows of soybean compared to 0.92 kg and 1.32 kg in case of 1 and 2 rows respectively. Lack of effective competition between mulberry and soybean, along with additional harvest of nitrogen and soybean seeds were of special significance.*

Keywords: *Glycine max* Merr., intercropping, mulberry, soybean.

INTRODUCTION

Cultivation of mulberry (*Morus* spp. - the food plant of silkworm *Bombyx mori* L.) requires high levels of nitrogen inputs. Attempts have accordingly been made to optimise the fertilizer dosages (Jolly 1987, Bongale 1995). A few studies have also been carried out towards supplementing the nitrogen requirements of mulberry through intercropping of legumes (Ahsan and Dhar, 1989). Importance of intercropping in bringing additional income to the farmer, nitrogen budgeting and related aspects of mulberry cultivation have also been recognised (Sinha et al., 1987, Saraswath and Gupta 1990). However, information on the suitability of different crop species, as intercrops between the rows of mulberry is extremely scanty.

MATERIALS AND METHODS

A field study was conducted at the main campus of the Institute during 1992-94 using eight year old mulberry (*Morus indica* L., variety M-5) plantation with a row and plant spacing of 120 cm × 60 cm under irrigated condition. Mulberry: Soybean population of 1 : 1, 1 : 2 and 1 : 3 rows was used (with one, two and three rows respectively of soybean variety KHSB-2 between two rows of mulberry). Soybean seeds were sown (at an interval of every three harvests of mulberry) after digging at a plant spacing of 30 × 10 cm. Cultural practices for mulberry were attended as per recommended package of practices (Krishnaswami 1978) without additional fertilizer application for soybean.

The experiment was laid out in a Randomised Complete Block Design (RCBD) with three replications each of the following treatments:

- T1 - Mulberry sole crop,
 T2 - Mulberry + 1 row of soybean,
 T3 - Mulberry + 2 rows of soybean, and
 T4 - Mulberry + 3 rows of soybean.

The replicate plot size was 6.0 m × 4.3 m. The soil was of red loam type with pH of 6.8 and organic matter content of 0.5 %. A total of twelve harvests of mulberry and four harvests of soybean were taken during two years of the study. Observations were recorded at 55 days after the basal pruning of mulberry for every harvest and nitrogen (Micro-Kjeldhal method) and moisture contents. Data on the yield of stem and leaf in case of mulberry and grain yield and nitrogen contents in case of soybean (harvested at growth stage of 110-120 days after sowing) were recorded and statistically computed as mean of twelve harvests of mulberry and four harvests of soybean.

RESULTS

The four treatments under study did not differ significantly with respect to mulberry leaf moisture, stem moisture, leaf nitrogen, stem nitrogen, leaf yield, stem yield and shoot yield (Tables I and II) possibly indicating that there was no effective competition between mulberry and soybean. Leaf moisture contents varied from 74.45 % (T2) to 75.07 % (T3), leaf nitrogen contents varied from 3.88 % (T4) to 4.02 % (T1). Stem nitrogen contents varied from 1.70 % (T1) to 1.74 % (T3), leaf yield varied from 600 kg / 100 sq.m / 2 yr (T4) to 696 kg / 100 sq.m / 2 yr (T3), shoot yield (per 100 sq.m / 2 yr) varied from 1,043 kg to 1,235 kg in T4 and T3 respectively (Table I).

Table I. Effect of Intercrop on mulberry (Mean of 12 harvests).

Tableau I. Effet de la culture intercalée sur le mûrier (Moyenne de 12 récoltes).

Treatments	Leaf Moisture (%)	Stem Moisture (%)	Leaf Nitrogen (%)	Stem Nitrogen (%)	Total Leaf Yield (kg/100 sq. m/2 yr)	Total Stem yield (kg/100 sq. m/2 yr)	Total Shoot Yield (kg/100 sq. m/2 yr)
Traitements	Humidité de la feuille (%)	Humidité de la tige (%)	Azote de la feuille (%)	Azote de la tige (%)	Rendement total en feuilles (kg/ 100 m ² /2 années)	Rendement total en tiges (kg/100 m ² /2 années)	Rendement total en pousses (kg/100 m ² /2 années)
T1	74.30	78.81	4.02	1.70	675	503	1178
T2	74.45	78.53	3.94	1.72	643	456	1107
T3	75.07	78.55	3.93	1.74	696	539	1235
T4	74.60	78.52	3.88	1.72	600	440	1043
F-Test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS - Non significant / Non significatif.

Table II. Effect of Soybean as intercrop on Nitrogen harvest (pooled data of 12 harvests of mulberry and 4 harvests of soybean).

Tableau II. Effet du soja en tant que culture intercalée sur la récolte d'azote (données rassemblées de 12 récoltes de mûriers et de 4 récoltes de soja).

Treatment	Total Nitrogen harvest/100 sq. m/2 yr through Mulberry leaf + Stem (kg)	Total Nitrogen harvest through Soybean seeds/100 sq. m/2 yr (kg)	Total Nitrogen harvest through Mulberry + Soybean/100 sq. m/2 yr (kg)
Traitement	Récolte totale d'azote 100m ² /2 années par les feuilles de mûrier+ la tige (kg)	Récolte totale d'azote par les graines de soja/ 100 m ² /2 années (kg)	Récolte totale d'azote par le mûrier + le soja /100 m ² /yr (kg)
T1	8.20	-	8.20
T2	7.88	0.92	8.80
T3	8.67	1.32	9.99
T4	7.42	2.36	9.78
F Test	NS	HS	-
CD 5 %	-	0.802	-
CD 1 %	-	1.216	-

NS: Non significant/ *Non significatif*.

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

Total nitrogen harvest / 100 sq. m / 2 yr through mulberry leaf and stem ranged from 7.42 kg (T4) to 8.67 kg (in T3) and the treatment differences were non-significant. Total nitrogen harvests through soybean seeds recorded significant differences among the treatments with maximum of 2.36 kg (T4) and minimum value of 0.92 kg N / 100 sq. m / 2 yr in T2.

DISCUSSION

Sinha et al., (1987) while examining the suitability of intercrops in mulberry inferred that inclusion of legume in mulberry had beneficial effect on the leaf yield. However, there appears to have been no reports on optimizing the nitrogen budgeting for mulberry cultivation through legume intercropping. Studies on these lines need to emphasize on the introduction of crop combinations without much affecting the yield and quality of mulberry leaf. Findings of the present study are interesting from this angle. Intercropping of soybean between the rows of mulberry did not influence mulberry leaf yields and nitrogen contents, in addition to improving the nitrogen harvest of the cropping system and providing additional income through the yield of soybean. Treatment (T3) with two rows of soybean between the rows of mulberry which recorded higher values of leaf yields and total nitrogen harvest could be considered as optimum.

It could be concluded that intercropping of soybean in between the mulberry rows did not adversely affect the yield and quality of mulberry and could improve the biomass and nitrogen harvest from the crop system.

ACKNOWLEDGEMENT

We are thankful to the Director KSSRDI for the facilities and to the Statistical Officer for analysis of the data.

REFERENCES

- AHSAN, M. M. AND K. L. DHAR (1989). Studies on intercropping of short duration crops with mulberry. *Indian J. seric.* 28 (2), 194-199.
- BONGALE, U. D. (1995). Fertilizers in Mulberry Cultivation. Publ. Pushpaseri Publications, Thalaghattapura, Bangalore-62, India, pp. 134.
- JOLLY, M. S. (1987). Appropriate Sericulture Techniques. Publ. CSR&TI, Mysore-8, India, pp. 175.
- KRISHNASWAMI, S. (1978). Package of practices for mulberry cultivation in South India. CSR&TI, Mysore. pp. 19.
- SARASWATH, S. B. AND Y. K. GUPTA (1990). Tomato as an intercrop in mulberry garden. *Indian Silk*, 28, 28-29 (Publ. Central Silk Board, Bangalore, India).
- SINHA, A. C., A. SARKAR AND A. C. DAS (1987). Technology for intercropping in mulberry. *Indian Farming*, 36 (11), 11-12.

ETUDES SUR L'INTERET DU SOJA (VARIETE KHSB-2) COMME CULTURE INTERCALEE AU MURIER (VARIETE M-5) EN CONDITIONS D'IRRIGATION

U. D. BONGALE, R. M. SHIVAPRAKASH & M. VEERESH

Moriculture Division, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute,
Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Inde.

*L'information sur les légumineuses utilisées en culture intercalée au mûrier est extrêmement limitée. La variété de soja **Glycine max** Merr., KHSB-2 en culture irriguée de une, deux et trois rangées (à des espacements de plants de 30 × 60 cm) a été étudiée pendant deux ans avec des apports uniformes pour toutes les combinaisons afin de juger de son utilité. Les observations sur 12 récoltes de mûrier et quatre récoltes de soja ont été enregistrées. Les données regroupées montrent que les traitements n'entraînent pas de différences significatives en ce qui concerne le rendement en feuilles et les teneurs en azote et en humidité du mûrier. L'azote total recueilli dans les graines de soja diffère de manière significative avec des valeurs maximales de 2,36 kg/100 m²/ 4 récoltes pour 3 rangées de soja comparée à 0,92 kg et 1,32 kg pour respectivement 1 et 2 rangées. L'absence de concurrence réelle entre le mûrier et le soja, tout comme l'obtention supplémentaire d'azote et de graines de soja ont un intérêt certain.*

INTRODUCTION

La culture du mûrier (*Morus* spp., plante nourricière du ver à soie *Bombyx mori* L.) demande des apports élevés en azote. Des essais ont donc été entrepris pour optimiser les dosages d'engrais (Jolly, 1987, Bongale 1965). Quelques études ont aussi été entreprises pour répondre aux besoins du mûrier en azote par le recours à la culture intercalée de légumineuses (Ahsan et Dhar, 1989). L'importance de la culture intercalée sur l'apport de revenus supplémentaires pour le cultivateur, le bilan azoté et les aspects concernant la culture du mûrier a été reconnue (Sinha et coll., 1987, Saraswath et Gupta 1990). Cependant, l'information sur les différentes espèces de cultures convenant à la culture intercalée aux mûriers est extrêmement limitée.

MATERIELS ET METHODES

Une étude sur le terrain a été réalisée sur le campus principal de l'Institut en 1992-94 en utilisant une plantation de mûrier âgée de 8 ans irriguée (*Morus indica* L., variété M-5), avec un espacement entre les rangées et les plants de 120 cm × 60 cm. Une population de mûrier et de soja dans un rapport de 1 : 1, 1 : 2 et de 1 : 3 rangées a été utilisée (avec respectivement une, deux et trois rangées de la variété de soja KHSB-2 entre deux rangées de mûrier). Les graines de soja sont semées (toutes les trois récoltes de mûrier) en profondeur à un espacement de plant de 30 × 10 cm. Les techniques de culture du mûrier sont celles recommandées (Krishnaswami 1978) sans ajout d'engrais pour le soja.

L'expérience est réalisée d'après la méthode en blocs aléatoires (RCBD) avec trois répétitions pour chacune des combinaisons suivantes :

- T1 - Culture unique de mûrier
- T2 - Mûrier + 1 rangée de soja
- T3 - Mûrier + 2 rangées de soja et
- T4 - Mûrier + 3 rangées de soja.

La taille de chaque répétition est de 6 m × 4,3 m. Le sol est de l'argile de type rouge au pH de 6,8 contenant 0,5 % de matières organiques. Douze récoltes de mûrier et quatre récoltes de soja ont été obtenues au total pendant les deux années d'étude. Les observations concernant l'azote (méthode Micro-Kjeldhal) et les teneurs en humidité sont enregistrées 55 jours après la taille basse du mûrier pour chaque récolte. Les données sur le rendement de la tige et de la feuille pour le mûrier et sur le rendement en graines et les teneurs en azote pour le soja (recueillies 110-120 jours après l'ensemencement) sont enregistrées et analysées de manière statistique sur ordinateur en tant que moyenne de douze récoltes pour le mûrier et de quatre récoltes pour le soja.

RESULTATS

Les quatre combinaisons étudiées ne donnent pas de valeurs significativement différentes en ce qui concerne la teneur en humidité de la feuille et de la tige, la teneur en azote de la feuille et de la tige, le rendement en feuilles, le rendement en tiges et en pousses (Tableaux I et II) ce qui indique qu'il n'y a probablement pas de compétition réelle entre le mûrier et le soja. Les teneurs en humidité de la feuille varient de 74,45 % (T2) à 75,07 % (T3), les teneurs en azote de la feuille varient de 3,88 % (T4) à 4,02 % (T1). Les teneurs en azote de la tige varient de 1,70 % (T1) à 1,74 % (T3), le rendement en feuilles varie de 600 kg/100 m²/2 années (T4) à 696 kg/100 m²/2 années (T3), le rendement en pousses (pour 100 m²/2 années) varie de 1,043 kg à 1,235 kg pour T4 et T3 respectivement (Tableau I).

L'azote totale recueilli pour 100 m²/2 années dans la feuille et la tige de mûrier est comprise entre 7,42 kg (T4) et 8,67 kg (T3) et les différences entre les combinaisons ne sont pas significatives. L'azote total recueilli dans les graines de soja varie de manière significative pour les combinaisons avec un maximum de 2,36 kg (T4) et une valeur minimum de 0,92 kg N/100m²/2 années pour T2.

DISCUSSION

Sinha et coll., (1987) pendant leur étude sur les cultures intercalées convenables pour le mûrier ont déduit que l'inclusion de légumineuses au mûrier a des effets bénéfiques sur le rendement en feuilles. Cependant, il semble qu'il n'existe apparemment pas d'études sur l'optimisation du bilan azoté dans la culture de mûrier par le recours à la culture intercalée de légumineuses. Les études sur ce sujet doivent mettre l'accent sur l'introduction de combinaisons de culture n'affectant pas le rendement et la qualité de la feuille de mûrier. Les observations de cette étude sont intéressantes sous cet angle. La culture intercalée de soja entre les rangs de mûrier n'influence pas les rendements en feuilles du mûrier et les teneurs en azote, de plus elle permet l'amélioration de la performance en azote du système de culture et l'apport de revenus supplémentaires par la production de soja. La combinaison (T3) avec deux rangées de soja entre les rangs de mûrier, qui enregistre les valeurs les plus élevées de rendement en feuilles et recueille le plus d'azote, peut être considérée comme optimale. On peut conclure que la culture intercalée de soja entre les rangs de mûrier n'affecte pas le rendement et la qualité du mûrier de manière négative et peut améliorer la performance en azote et la biomasse du système de culture.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	175
General sericulture	
Mûrier	177
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	179
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	183
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	185
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	187
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	191
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	193
Silkworms: silk glands	
Soie	195
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portuguais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Physicochemical evaluation with socioeconomic benefits of mulberry produced in northern areas of Pakistan.

Evaluation physico-chimique avec les bénéfices socio-économiques des mûriers produits dans les régions du nord du Pakistan.

ALIZAI M.N., FAZALUR-REHMAN A.Z.

1996 Sci. Int. (Lahore), Vol. 8(3), 265-266. (E)

Utilisation of mulberry crop residue as fuel wood.

Utilisation des résidus de la culture des mûriers comme combustible.

CHINNASWAMY K.P., HARIPRASAD K.B.

University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(1), 17-18. (E).

Mulberry a versatile biosource in the service of mankind.

Le mûrier, une ressource biologique au service de l'humanité.

DANDIN S.B.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1998 Canye Kexue, Vol. 24(2), 109-113. (E,c)

Fluctuation in cocoon price and its management.

Fluctuation du prix du cocon et sa gestion.

LI R.

Sericulture College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1998 Canye Kexue, Vol. 24(2), 104-108. (C,e)

Analysis of consumer attitude for men's silk socks.

Analyse de l'attitude des consommateurs pour les chaussettes en soie pour hommes.

MIURA M., MORIKAWA H., SHO K., IWASA M., TOFUKUJI N.

1998 J. Seric. Sci. Jpn. Vol. 67(2), 155-158. (J)

Golden yellow culture of Assam.

Culture jaune d'or en Assam.

PHUKAN R.

Gargaon College, Sibsagar, Assam, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(2), 14. (E)

Regeneration of silk fibroin from silk waste and its application.

Régénération de la fibroïne de soie provenant des déchets de soie et son application.

RAJE S.S., REKHA V.D., MATHUR M.R.

1998 Indian Silk, Vol. 37(2), 19-24. (E)

Sericulture development in Uttar Pradesh.

Développement de la sériciculture en Uttar Pradesh.

THOMAS J.

1998 Indian Silk, Vol. 37(1), 5-9. (E)

Insect pests of mulberry and their management in China.

Les insectes parasites du mûrier et leur contrôle en Chine.

VEERANNA G.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(2), 5-9. (E)

Mûrier

Mulberry

Morphological systematic-numerical taxonomy of mulberry, *Morus* L.

Taxonomie numérique systématique morphologique du mûrier *Morus* L.

BAI S., KE Y., YU M.

Institute of Sericulture, Si Chuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 63-66. (C,e)

A study of the chemical constituents of the total root bark of *Morus cathayana* Hemsl.

Etude des constituants chimiques de l'écorce des racines de *Morus cathayana* Hemsl.

JIA L., WU L., XU C., CHEN Y., CHEN M., DUAN R., YANG W.

1996 *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*, Vol. 13(3), 192-195. (C)

Producing condition of the toxic components from *Myrothecium roridum* and it's toxicity to various plants.

Condition de production des composants toxiques de *Myrothecium roridum* et sa toxicité sur divers végétaux.

MURAKAMI R., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohawashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 135-142. (J,e)

Studies of mulberry propagation and of the production of mulberry cultivar planting material.

Etudes sur la propagation du mûrier et sur la production du matériel de plantation du mûrier.

PETKOV Z.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov St. No 24, Vratza 3000, Bulgaria.

1998 *Agricultural Science*, Vol. 36(1), 10-13. (Bg,r,e)

A novel stilbene glucoside, oxyresveratrol 3'-O- β -glucopyranoside, from the root bark of *Morus alba*.

Un nouveau glucoside de l'écorce des racines de *Morus alba*, l'oxyresveratrol 3'-O- β -glucopyranoside.

QIU F., KOMATSU K., KAWASAKI K., SAITO K., YAO X., KANO Y.

1996 *Planta Med.*, Vol. 62(6), 559-561. (E)

Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants.

Régénération des plants issus des cultures de calles de *Morus indica* L. dérivées de semis et de plants adultes.

SAHOO Y., PATTNAIK S.K., CHAND P.K.

1997 *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, Vol. 69(1/2), 85-98. (E)

Evaluation of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) leaves in adult rabbits.

Évaluation des feuilles du mûrier papier (*Broussonetia papyrifera*) chez les lapins adultes.

SINGH R., BHATIA D.R., BHASIN V.

1997 *J. Animal Sci.*, Vol. 67(2), 170-171. (E)

Purification, pathogenicity and antiserum preparation of mycoplasma-like organism of mulberry dwarf disease.

Purification, pathogénicité et préparation d'antisérum de l'organisme analogue au mycoplasme de la maladie du nanisme du mûrier.

XIA Z., YAMASHITA S., DOI Y.

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 67-71. (C,e)

Probability grading studies of major quantitative characteristics of mulberry.

Études de classification par probabilité des caractéristiques quantitatives majeures du mûrier.

YANG J., et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 122-124. (C)

Chromosome numbers of wild species in *Morus cathayana* Hemsl and *Morus wittiorum* Handel-Mazett distributed in China.

Nombres de chromosomes des espèces sauvages chez *Morus cathayana* Hemsl et *Morus wittiorum* Handel-Mazett distribués en Chine.

YILE P., OSHIGANE K.*

* Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Soka University, 1-236, Tangitoyo, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 151-153. (E)

Appraisal and evaluation on resistance of mulberry germplasms to yellow dwarf disease.

Appréciation et évaluation de la résistance des germoplasmes du mûrier à la maladie du nanisme jaune.

ZHANG L. et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 114-115. (C)

Quick establishment of high-yield mulberry orchard through summer plantation.

Établissement rapide de mûraies à haut rendement au cours de la plantation estivale.

ZHANG Y. et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 116-117. (C)

Hybridizability between mulberry varieties Yin302 and Lun109 and reproductability of their hybrid.

Capacité d'hybridation entre les variétés de mûrier Yin302 et Lun109 et capacité de reproduction de leur hybride.

ZHENG X. et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 120-121. (C)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

The finest cocoon filament produced by insect hormone treatments and its application.

Le plus fin filament de cocon produit par traitements aux hormones d'insecte et son application.

AKAI H.

1996 *Kinoshi Kenkyu Kaishi*, Vol. 35, 24-30. (J)

Studies on individual difference of silkworm in feeding response.

Etudes de la différence individuelle des vers à soie dans la réponse au nourrissage.

CUI W., XU J., WU X.

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 75-80. (C,e)

Principles of silkworm pathology.

Les principes de la pathologie du ver à soie.

GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T.K., DEVAIAH M.C.

1998 *Seri Scientific Publishers*, No 138, 12th Main, Nagendra Block, Mysore Bank Colony, Bangalore 560 050, India. 420 p. (E)

The effect of the sex-linked lethals of balanced lethal line S-14 of *Bombyx mori* on the viability and cocoon weight.

Effet des létaux liés au sexe de la lignée S-14 létale balancée de *Bombyx mori* sur la viabilité et le poids des cocons.

HE K., ZHU X., XIA J., YE A.

Sericultural Research Inst., Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 23-25. (C,e)

Breeding of high-silk-amount and adversity-resistant silkworm races 871 and 872.

Sélection des races de ver à soie 871 et 872 résistantes à l'adversité et produisant de fortes quantités de soie.

HE S., YAN X., HE Y., ZHAO Y., WU Y., QIAN H., YANG R.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Zhenjiang 212018, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 86-90. (C,e)

Studies on the selection of fluoride-resistance of silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur la sélection de la résistance au fluorure chez le ver à soie *Bombyx mori*.

LIU Q. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 58-59. (C)

Effect of wood vinegar to fungus disease of silkworm, *Bombyx mori*.

Effet du vinaigre de bois sur la maladie fongique du ver à soie *Bombyx mori*.

MATSUKI N., MITAMURA T., DOI N.

Fukushima Sericultural Experiment Station, 21 Kitamotomachi, Yanagawa machi, Fukushima 9600781, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 143-145. (J,e)

Analysing dispersal of silkworm larvae as a random process.

L'analyse de la dispersion des larves de vers à soie comme procédé aléatoire.

NAGASAKA K., MASE K., OKADA E., YAMAMOTO T.

Research Team of Silworm Breeding, Department of Sericulture, NISES, 1-10-1 Agata, Matsumoto, Nagano 390-0812, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 101-107. (E,j)

Studies on cocoon characteristics of various silkworm races.

Etudes sur les caractéristiques des cocons de différentes races de ver à soie.

NISHIDE T.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 39-46. (J)

An approach to the method sex-discrimination by single cocoon scaling.

Une approche de la méthode de discrimination sexuelle par graduation des cocons.

PAN S., GUO L., LIU L., TIAN X., HE S., TAO M.

Biology Department, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 91-94. (C,e)

On the problem of cocoon evaluation methods in silkworm (*Bombyx mori* L.) breeding.

Le problème des méthodes d'évaluation des cocons dans le breeding du ver à soie (*Bombyx mori* L.).

PETKOV N., TZENOV P.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov St. No 24, Vratza 3000, Bulgaria.

1998 *Agricultural Science*, Vol. 36(1), 37-39. (Bg,r,e)

Cooling by evaporation: some multipurpose models for sericulture.

Refroidissement par évaporation : quelques modèles polyvalents pour la sériciculture.

PRASAD G.V., SURYANARAYANA RAO N., DATTA R.K.*

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(1), 10-13, 23. (E)

Fluoride-resistance of different silkworm varieties and its genetic analysis.

Résistance au fluorure de différentes variétés de ver à soie et son analyse génétique.

WANG Z. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 44-45. (C)

Studies on the monoclonal antibody based immunogold-silver staining method for detecting spores of *Nosema bombycis*.

Etudes sur l'anticorps monoclonal basé sur la méthode d'immunocoloration or et argent pour détecter les spores de *Nosema bombycis*.

XU X., SUN J., LU K.

Department of Sericulture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 11-14. (C,e)

Breeding of polyphagous silkworm races having high cocoon quality.

Breeding de races de ver à soie polyphages donnant des cocons de haute qualité.

YAMAMOTO T., MASE K., OKADA E., ISHIBASHI J., ITSUBO T., TANAKA Y., OOI H.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 47-58. (J,e)

The report of the newly improved silkworm race Fangcao × Chen.Xing for summer-autumn rearing.

Le rapport sur la nouvelle variété améliorée de ver à soie Fangcao × Chen.Xing pour l'élevage d'été automne.

YANG M.

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

1998 Canye Kexue, Vol. 24(1), 1-5. (C,e)

Breeding of the summer and autumn silkworm race Fengi × Furi.

La reproduction des vers à soie Fengi × Furi pour l'été et l'automne.

YAO Y., CHEN J., FENG J., JIN W., CHEN D., JIN Y.

Huzhou Institute of Sericulture of Zhejiang Province, Huzhou 313000, China.

1998 Canye Kexue, Vol. 24(1), 6-10. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Studies on cooking of tussah silk cocoon.

Etudes sur la cuisson des cocons de soie tussah.

GULRAJANI M.L., DAS S., CHATTOPADHYAY R., SEN K.

1997 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 22(1), 61-67. (E)

Microvoids in wild silk fibers.

Micro-vides dans les fibres de soie sauvage.

KAWAHARA Y., SHIOYA M.

1997 *Text. Res. J.*, Vol. 67(5), 385-386. (E)

Studies on techniques of rearing giant silkworm, *Antheraea yamamai*.

Etudes sur les techniques d'élevage du ver à soie géant *Antheraea yamamai*.

MA W. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 49-41. (C)

Integrated package for rearing of *A. mylitta* D.

Ensemble intégré pour l'élevage d'*A. mylitta* D.

MATHUR S.K., SINGH B.M.K., SINHA A.K., SINHA B.R.R.PD.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(2), 15-18. (E)

Tasar chawki rearing under nylon net: farmers' experience.

L'élevage du papillon à soie tasar sous filets de nylon : expérience des fermiers.

SUDHAKARA BABU C.H. *et al.*

REC, Hanamakonda, Andhra Pradesh, India.

1998 *India silk*, Vol. 37(1), 21-23. (E)

Selection and utilization of hybrid combinations of tussah silkworm, *Antheraea pernyi*.

Sélection et utilisation de combinaisons d'hybrides du ver à soie tussah, *Antheraea pernyi*.

WANG J. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 128-129. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Studies on linkage inheritance of a space-flight-induced mutant crayfish pupa (cf-h) gene of silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes de linkage du gène (cf-h) chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

GUI Z., ZHUANG D., QIN J., SHI Z., LIU Y., LI D.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 72-74. (C,e)

Identification and developmental expression of a *Bombyx mori* alpha-tubulin gene.

Identification et expression au cours du développement d'un gène de la tubuline alpha de *Bombyx mori*.

HACHOUF-GHERRAS S., BESSON M.T., BOSQUET G.

Centre de Génétique moléculaire et cellulaire, UMR CNRS 5534, Université Claude Bernard Lyon 1,
43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1998 *Gene*, Vol. 208, 89-94. (E)

Transcriptionnal activation through interaction of MBF2 with TFIIA.

Activation transcriptionnelle grâce à l'interaction de MBF2 avec TFIIA.

LI F., TAKEMARU K., GOTO M., UEDA H., HANDA H., HIROSE S.

1997 *Genes Cells*, Vol. 2(2), 143-153. (E)

Studies on inheritance of sex-linked temperature sensitivity of silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'hérédité de la sensibilité à la température liée au sexe chez le ver à soie *Bombyx mori*.

LIU J., HUANG Z., HUANG J.

Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 100-103. (C,e)

A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells.

Un élément répété de baculovirus (virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*) fonctionne comme un activateur constitutif puissant dans les cellules d'insectes transfectées.

LU M., FARRELL P.J., JOHNSON R., IATROU K.*

* Department of Medical Biochemistry, University of Calgary, 3330 Hospital Dr. N. W.,
Calgary AB T2N 4N1, Canada

1997 *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272(49), 30724-30728. (E)

Genetic variation within a parthenogenetic lineage.

Variation génétique à l'intérieur d'une lignée parthénogénétique.

LUSHAL G., DE BARRO P.J., DAVID O., SHERRATT T.N., MACLEAN N.

Biodiversity and Ecology Division, School of Biological Sciences, University of Southampton, Bassett Crescent East, Southampton SO16 7PX, United Kingdom.

1998 *Insect Molecular Biology*, Vol. 7(4), 337-344. (E)

Genetic studies of silkworm.

Etudes génétiques du ver à soie.

PETKOV N., NACHEVA Y., TZENOV P.

Sericultural Experiment Station, Mito Orozov St. No 24, Vratza 3000, Bulgaria.

1998 *Agricultural Science*, Vol. 36(1), 17-22. (Bg,r,e)

Studies on characteristics of genetical races of the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur les caractéristiques des races génétiques du ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMIZU K., KOSEGAWA E., KIKAWADA T., OKAJIMA T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Kobuchiwaza, Yamanashi 408-0000, Japan.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 7-18. (J,e)

Present state, development and trends of research work in the field of partheno- and androgenesis in silkworm (*Bombyx mori* L.) and the possibilities for their genetic and breeding application.

Situation actuelle, développement et tendances des travaux de recherche en parthéno- et androgénèse chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.) et les possibilités de leur application en génétique et en sélection.

VASSILEVA Y., TZENOV P., MLADENOV G.

Experiment Station of Sericulture, Mito Orozov St. No 24, Vratza 3000, Bulgaria.

1998 *Agricultural Science*, Vol. 36(1), 22-26. (Bg,e,r)

Chemical synthesis and cloning of the cecropin CMIV gene.

Synthèse chimique et clonage du gène de la cécropine CMIV.

XIE W., QIU Q., CHEN J., MA Z., XU X.

1996 *Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue*, Vol. 32(3), 474-479. (C)

Expression of cecropin CMIV fusion protein in *Escherichia coli* under T7 promoter.

Expression de la protéine de fusion cécropine CMIV chez *Escherichia coli* sous le promoteur T7.

XIE W., QIU Q., WU H., XU X.

1996 *Biochem. Mol. Biol. Int.*, Vol. 39(3), 487-492. (E)

Ribosomal protein L5 of *Bombyx mori*: cDNA sequence and tissue differences in the L5 mRNA content.

Protéine ribosomique L5 de *Bombyx mori*: séquence d'ADNc et différences de contenu en ARNm L5 dans les tissus.

YANG C., SEHNAL F.*

* Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.

1998 *Insect Molecular Biology*, Vol. 7(4), 301-306. (E)

Protein kinase gene of BmNPV and the phylogenetic tree for baculovirus protein kinase genes.

Gène de la protéine kinase de BmNPV et arbre phylogénétique des gènes de la protéine kinase des baculovirus.

ZHANG C., HU C., HE J., JI P., WU X.

Institute of Applied Entomology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1998 *Canyue Kexue*, Vol. 24(1), 26-34. (C,e)

Vers a soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkmoth, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first instar larvae.

Démonstration immunohistochimique des peptides analogues aux amides FMRF et mammifère dans l'innervation de l'intestin et les cellules endocrines d'*Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) pendant la diapause et l'après-diapause des larves embryonnaires.

AN Y., NAKAJIMA T., SUZUKI K.

Department of Applied Biology, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan.

1998 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 95(2), 185-196. (E)

Effect of temperature on the activity of amylase in silkworm, *Bombyx mori*.

Effet de la température sur l'activité de l'amylase du ver à soie *Bombyx mori*.

BASAVARAJU C.D., KUMARI B.L., ANANTHANARAYANA S.R.

1996 *Entomon*, Vol. 21(2), 171-176. (E)

Regularity of the content changes of testosterone and oestradiol in pupae of oak silkworm during temperature-sensing period.

Régularité des changements du titre en testostérone et en oestradiol chez les chrysalides du ver à soie du chêne au cours de la période sensible à la température.

CAI X. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 53-54. (C)

Exposure to diesel exhaust fume of untuned automobiles and age-related variation in body weight and total protein titer in the muga worm, *Antheraea assama* (Westwood).

Exposition aux gaz d'échappement du diesel des automobiles mal réglées et variations liées à l'âge du poids du corps et du titre total en protéines chez le ver muga *Antheraea assama* (Westwood).

CHETIA P., HANDIQUE R.

1997 *Pollut. Res.*, Vol. 16(1), 11-14. (E)

Techniques and factors affecting epoxidation of silkworm pupae oil.

Techniques et facteurs affectant l'époxydation de l'huile de chrysalide de ver à soie.

HANG X., DIAO H.

1996 *Zhongguo Liangyou Xuebao*, Vol. 11(1), 48-53. (C)

Reciprocal transplantation of wing discs between a wing deficient mutant (fl) and wild type of the silkworm, *Bombyx mori*.

Transplantation réciproque des disques alaires entre un mutant déficient en ailes et un type sauvage du ver à soie *Bombyx mori*.

HOJYO T., FUJIWARA H.*

* Department of Biological Sciences, Graduate School of Sciences, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1997 *Develop. Growth Differ. Vol. 39, 599-606. (E)*

Characterization of larval behavior and its genetic analysis in the silkworm, *Bombyx mori*.

Caractérisation du comportement larvaire et son analyse génétique chez le ver à soie *Bombyx mori*.

INOUE H.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 20, 1-5. (J,e)*

Studies on flat-way spinning of silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur le filage à plat du ver à soie *Bombyx mori*.

JIANG Y. *et al.*

1998 *Canye Kexue, Vol. 24(2), 125-127. (C)*

Repellent effect of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) essential oil against the silkworm, *Bombyx mori*, at the feeding stage.

Effet repoussant de l'huile essentielle d'hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) sur le ver à soie *Bombyx mori* au stade de nourrissage.

KAMIMURA M., KURIBAYASHI S., KIUCHI M.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 20, 19-24. (E,j)*

Effects of temperature on silkworm olfactory responses to pheromone can be simulated by modulation of resting cell membrane resistances.

Les effets de la température sur les réponses olfactives du papillon à la phéromone peuvent être simulés par modulation des résistances des membranes des cellules au repos.

KODADOVA B., KAIBLING K.F.

1996 *J. Comp. Physiol., Vol. 179(1), 15-27. (E)*

G-protein activation, identification and immunolocalization in pheromone sensitive sensilla trichodea of moths.

Immunolocalisation, identification et activation de la protéine G dans la trichode de la sensille sensible aux phéromones chez les papillons.

LAUE M., MAIDA R., REDKIZOBOV A.

1997 *Cell Tissue Res., Vol. 288(1), 149-158. (E)*

Effects of anti-juvenile and ecdysone hormone on the growth, development and the ultrastructure of corpora allata and prothoracic gland in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets de l'anti hormone juvénile et de l'ecdysone sur la croissance, le développement et l'ultrastructure du corpora allata et de la glande prothoracique chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MIAO Y., XU L., JIANG L.

Department of Sericultural Sciences, Zhejiang Agriculture University, Hangzhou 310029, China.

1998 *Canye Kexue, Vol. 24(1), 39-43. (C,e)*

Structural specificity of silkworm larvae plasma to (1-3)-beta-D-glucans.

Spécificité structurelle du plasma des larves de ver à soie pour les (1-3)-beta-D-glucanes.

MIURA N.N., OHNO N., ADACHI Y., YADOMAE T.

1996 *Pharm. Pharmacol. Lett., Vol. 6(3), 111-114. (E)*

Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus.

Changements dans le métabolisme des protéines de l'hémolymph et du corps adipeux du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) en réponse aux organophosphorés.

NATH B.S., SURESH A., VARMA B.M., KUMAR R.P.S.

1997 *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 36(2), 169-173. (E)

Behavioral characters of the mature silkworm, *Bombyx mori*, and mode of inheritance.

Caractères du comportement du ver à soie mature *Bombyx mori* et mode d'hérédité.

NINAGI O., MIKUNI T., MARUYAMA M., NAGAYASU K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305 8634, Japan.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 25-37. (J,e)

Induction of larval ecdysis by ecdysone in the non-molting glossy (nm-g) mutant larvae of *Bombyx mori*

Induction de l'ecdysis larvaire par l'ecdysone chez les larves du mutant (nm-g) luisant et non-muant de *Bombyx mori*.

TANAKA Y.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 109-115. (J,e)

Assimilation différentielle du L et du D-glucose par l'intestin moyen des insectes, *in vitro*.

Differential uptake of L and D glucose *in vitro* by the midgut of insects.

TRABELSI M., PEYPELUT L., LAVENSEAU L.

Laboratoire d'Histologie et Embryologie, Faculté de Médecine de Sousse, 4002 Sousse, Tunisie.

1998 *Bulletin de la Société zoologique de France*, Vol. 123(2), 173-180. (F,e)

Studies on the activity of peroxidase in haemolymph of silkworm, *Bombyx mori* L. and its affecting factors.

Etudes sur l'activité de la peroxydase dans l'hémolymph du ver à soie *Bombyx mori* L. et les facteurs de variation.

WU X., XU J., CUI W., XU J.

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 35-38. (C,e)

Studies on activation of diapausing pupa of tussah silkworm by insect hormone analogue.

Etudes sur l'activation des chrysalides diapausantes du ver à soie tussah par un analogue d'hormone d'insecte.

YU Z. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 60-61. (C)

Studies on changes of inorganic composition content in the skin of fluoride toxicosis silkworm.

Etudes sur les changements quantitatifs en composants inorganiques dans la peau du ver à soie intoxiqué au fluorure.

ZHOU C. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 52. (C)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Studies on the temperature sensivity of the chocolate mutant of *Bombyx mori* during incubation.

Etudes sur la sensibilité à la température du mutant chocolat de *Bombyx mori* au cours de l'incubation.

LU C. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 46-48. (C)

Oviposition device for muga silkmoth.

Mécanisme d'oviposition du papillon muga.

SAHU A.K., SINGHA B.B., BORA B.R.

Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(1), 19-20. (E)

Changes of esterase A4-activity and its relationship with diapause in acid-treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*.

Changements de l'activité de l'estérase A4 et sa relation avec la diapause chez des oeufs du ver à soie *Bombyx mori*, traités à l'acide.

XU S., SIMA Y., ZU J., ZE Y., ZHANG Y., KAI H., XU J.

Sericultural College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 95-99. (C,e)

Estimation of gene effect parameters for the amount of laid eggs in silkworm (*Bombyx mori* L.).

Estimation des effets des paramètres génétiques sur la quantité d'oeufs pondus des vers à soie (*Bombyx mori* L.).

ZHANG Z., LU C., LI F., XIANG Z.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 19-22. (C,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Amino acids and synthesis of silk

Acides aminés et synthèse de la soie.

GUPTA B.K., GUPTA Y.K.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(1), 14-16. (E)

Sericin protein contents in different larval developmental stages in some races of *Bombyx mori* L.

Contenus en séricine à différents stades du développement larvaire chez quelques races de *Bombyx mori* L.

ISLAM S., HAQUE T., QUADER M.A., KHAN A.R., HAQUE R.

1997 *Pak. J. Zool.*, Vol.29(1), 89-91. (E)

Effects of methoprene on silk protein synthesis in the posterior silk gland of *Antheraea yamamai*.

Effets du méthoprène sur la synthèse des protéines de soie dans la glande séricigène postérieure d'*Antheraea yamamai*.

LIN Y. et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 55-57. (C)

Determination of molecular weights of silk protein hydrolyzate by SDS-condensed gel electrophoresis.

Détermination des poids moléculaires de l'hydrolysat des protéines de soie par électrophorèse sur gel condensé au SDS.

WU D., LU S.

1997 *Jingxi Huagong*, Vol. 14(2), 42-44. (C)

Soie

Silk

Effect of degumming on the mechanical and dyeing behavior of silk.

Effet du décreusage sur le comportement tinctorial et mécanique de la soie.

ACHWAL W.B.

1997 *Colourage*, Vol. 44(3), 33-34, 36. (E)

Solubility of fluorescent cocoons.

Solubilité des cocons fluorescents.

AJISAWA A.

Ômiya Research Laboratory, Katakura Industry Co., Ltd., 4-237, Kishiki-cho, Ômiya, Saitama 330-0843, Japan

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(2), 95-99. (E,j)

Physical characteristics of the silk fabric woven by different types of cocoon filaments.

Caractéristiques physiques de pièces de soie tissées avec différents types de filaments de cocon.

AKAHANE T., TSUBOUCHI K., IMAI T.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 115-132. (J,e)

²H-labelling of silk fibroin fibers and their structural characterization by solid-state ²H NMR.

Marquage au ²H des fibres de la fibroïne de soie et caractérisation de leur structure par RMN au ²H à l'état solide.

ASAKURA T. et al.

1997 *Macromolecules*, Vol. 30, 2429-2435. (E)

Chemical and physical properties of old silk fabrics.

Propriétés physiques et chimiques des vieux tissus de soie.

BECKER M.A., MAGOSHI Y., SAKAI T., TUROSS N.C.

1997 *Stud. Conserv.*, Vol. 42(1), 27-37. (E)

A review on the chemical modification of silk fibers.

Revue sur la modification chimique des fibres de soie.

BENDAK A., EL-OLA S.A.

1996 *Bull. Natl Res. Cent. (Egypt)*, Vol. 21(4), 341-362. (E)

Hydrolysis of olive oil by immobilized lipase on silk.

Hydrolyse de l'huile d'olive par lipase immobilisée sur de la soie.

CAO G., LENG Y., SHENG M., GAO G.

1997 *Shiyou Huagong Gaodeng Xuexiao Xuebao*, Vol. 10(2), 35-37. (C)

Fitting for membrane potential and ion permeability coefficients of silk fibroin membrane.

Ajustement des coefficients de potentiel membranaire et de perméabilité des ions de la membrane de fibroïne de soie.

CHEN J.

1996 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 13(5), 1-6. (C)

Estimation of mechanical properties of aged silk with the aid of NMR relaxation time and fluctuation-dissipation theorem.

Estimation des propriétés mécaniques de la vieille soie à l'aide du temps de relâche de la RMN et du théorème de fluctuation-dissipation.

CHUJO R.

1997 *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, Vol. 38(1), 896-897. (E)

Structure and molecular conformation of tussah silk fibroin films: effect of heat treatment.

Conformation moléculaire et structurelle des films de fibroïne de la soie tussah : effet du traitement thermique.

FREDDI G., MONTI P., NAGURA M., GOTOH Y., TSUKADA M.

1997 *J. Polym. Sci., Part B Polym. Phys.*, Vol. 35, 841-845. (E)

Effect of turmeric dyes on eri fabric after mordanting.

Les effets des teintures au safran sur les tissus eri après mordantage.

GOGOI A.

Department of Clothing and Textiles, College of Home Science, Assam Agricultural University, Jorhat, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(1), 24-27. (E)

Fiber morphology of spider silk: the effects of tensile deformation.

Morphologie de la fibre de soie d'araignée : les effets de la déformation élastique.

GRUBB D.T., JELINSKI L.W.

1997 *Macromolecules*, Vol. 30, 2860-2867. (E)

Degumming and dyeing properties of cocoon filaments with a special feature differed from conventional silkworm races.

Les propriétés tinctoriales et de décreusage des filaments de cocons ayant un caractère spécial différent des races de vers à soie conventionnelles.

KATO H., HATA T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 101-114. (J,e)

Structure and deformation of dragline and capture thread of orb-web in *Nephila clavata*.

Structure et déformation des fils de capture et de la toile de l'araignée *Nephila clavata*.

KITAGAWA M., KATSUMI S., WAKOH Y., YAMAMOTO T., KIMIZU M.

1997 *Zuiryo*, Vol. 46(5), 470-474. (E)

Mechanical properties of dragline and capture thread for the spider, *Nephila clavata*.

Propriétés mécaniques des fils de capture et de la toile de l'araignée *Nephila clavata*.

KITAGAWA M., KITAYAMA T.

1997 *J. Mater. Sci.*, Vol. 32(8), 2005-2012. (E)

Sericin dissolubility of different silkworm varieties and correlative analysis.

Solubilité de la sérécine de différentes variétés de ver à soie et analyse de corrélation.

LIN C., YAO Q., CHEN K., WU D., WANG P., WEI Z.

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(2), 81-85. (C,e)

Structure and properties of porous composite membranes of regenerated silk fibroïne and poly(vinyl alcohol) and biosensing of glucose via Meldola blue dispersed in polyester ionomer as an electron transfer mediator.

Structure et propriétés des membranes poreuses et composites de fibroïne de soie régénérée et de polyvinyl alcool et bio-détection du glucose par le bleu de Meldola dispersé dans un ionomère de polyester comme transporteur d'électron.

LIU H., DENG H., SUN K., QI D., DENG J., LIU Y., YU T.
1997 *Fresenius' J. Anal. Chem.*, Vol. 357, 812-816. (E)

Amperometric methylene blue-mediated sensor highly sensitive to hydrogen peroxide based on a composite membrane of regenerated silk fibroin and poly-vinyl alcohol as immobilization matrix for horse radish peroxidase.

Détecteur au bleu de méthylène ampérométrique, hautement sensible au peroxyde d'hydrogène basé sur une membrane composite de fibroïne de soie régénérée et d'alcool polyvinyl utilisée comme matrice d'immobilisation pour la peroxydase du raifort.

LIU H., QIAN J., LIU Y., YU T., DENG J., QI D.
1997 *Fresenius' Anal. Chem.*, Vol. 357(3), 302-307. (E)

A phenazine methosulfate-mediated sensor sensitive to lactate based on entrapment of lactate oxidase and horseradish peroxidase in composite membrane of poly(vinylalcohol) and regenerated silk fibroin.

Un détecteur au méthosulfate de phénazine sensible au lactate basé sur le piégeage de la lactate oxydase et de la peroxydase de raifort dans la membrane composite de poly(vinylalcool) et de fibroïne de soie régénérée.

LIU H., ZHANG Z., ZHANG X., QI D., LIU Y., YU T., DENG J.
1997 *Electrochim. Acta*, Vol. 42(3), 349-355. (E)

Low energy and super spinning of silkworm (silk)-multiple spinning of *Bombyx mori*.

Faible énergie et superfilage du ver à soie *Bombyx mori*.

MAGOSHI J., MAGOSHI Y., NAKAMURA S.
1997 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 53(3), 87-97. (J)

Chemical and physical properties of cocoon filaments from various races.

Propriétés physiques et chimiques des filaments de cocons provenant de différentes races.

MAGOSHI Y., BECKER M.A., HAGA A., ICHIKAWA A.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 59-77. (J,e)

Chemical properties of shikonin from the view point of dyeing.

Propriétés chimiques de la shikonine du point de vue de la teinture.

NAGASHIMA N., SAKATA K., KATAYAMA A.
Faculty of Home Economics, Tokyo Kase Univ., 1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan.
1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 123-127. (J,e)

Structural studies of spider silk proteins in the fiber.

Etudes structurales des protéines de soie d'araignée dans la fibre.

PARKHE A.D., SEELEY S.K., GARDNER K., THOMSON L., LEWIS R.V.
1997 *J. Mol. Recognit.*, Vol. 10(1), 1-6. (E)

Chemical properties of carminic acid from the view point of dyeing.

Propriétés chimiques de l'acide carminique du point de vue de la teinture.

SAKATA K., NAGASHIMA N., KATAYAMA A.
Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama, Kyoto 605, Japan.
1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 117-122. (J,e)

Button diameter examination system by image processing unit.

Système d'analyse du diamètre du bouton par traitement d'image.

SHIMIZU S., OHURA M., MITSUISHI T.

Silk Science Research Institute, Shinjyuku, Tokyo 169-0073, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 147-150 (J)

Effect of acid dye processing on microstructural parameters in silk fibers.

Effet du procédé de teinture à l'acide sur les paramètres microstructuraux des fibres de soie.

SOMASHEKAR R., SOMASHEKARAPPA H., SUBRAMANAYAN G., PRAHALLAD U.D.

1997 *Eur. Polym. J.*, Vol. 33(6), 963-967. (E)

Dynamic FT-IR spectroscopic studies of silk fibroin films.

Etudes spectroscopiques dynamiques FT-IR des films de fibroïne de soie.

SONOYAMA M., MIYAZAWA M., KATAGIRI G., ISHIDA H.

1997 *Appl. Spectrosc.*, Vol. 51(4), 545-547. (E)

Cocoon cooking conditions and reeling performances of the characteristic silkworm race's cocoons.

Conditions d'étouffage des cocons et performances de dévidage des cocons de ver à soie.

TAKABAYASHI C. *et al.*

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Okaya, Nagano, 394-0021, Japan.

1998 *Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 20, 78-100. (J,e)

Natural silks: archetypal supramolecular assembly of polymer fibers.

Soies naturelles : assemblage supramoléculaire archétype des fibres polymères.

VINEY C.

1997 *Supramol. Sci.*, Vol. 4(1/2), 75-81. (E)

Structure and properties of natural and synthetic spider silk.

Structure et propriétés de la soie d'araignée synthétique et naturelle.

WARNER S.B., PAINDAVOINE M., JAIN M.

1996 *Book Pap. Int. Conf. Exhib., AATCC*, 454-460. (E)

Studies on the mechanism of cocoon reelability.

Etudes sur le mécanisme de dévidabilité des cocons.

ZHU L., YAO J.

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(1), 15-18. (C,e)

Relationship between the adhesive property of sericin protein and cocoon reelability.

Relation entre la propriété adhésive de la sérécine et la dévidabilité du cocon.

ZHU L.J., YAO J.M., HIRABAYASHI K.

Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(2), 129-133. (E)
