

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*)
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

Articles scientifiques / Scientific papers

- Monoclonal antibodies based rapid immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus infection in *Bombyx mori* L.** 401
 Dosage immunologique rapide à l'aide d'anticorps monoclonaux pour la détection de l'infestation due au virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori* L. 407
 G. KALSI, M. SHAMIM, B. NATARAJU, R.K. DATTA & S.K. GUPTA

- Subcellular localisation of trehalase in different tissues of the silkworm, *Bombyx mori* L.: demonstration of the highest activity in mitochondria** 411
 Localisation subcellulaire de la tréhalase dans différents tissus du ver à soie *Bombyx mori* L.: preuve de l'activité la plus élevée dans les mitochondries 419
 B. KESHAN & A. K. RAY

- Combining ability and heritability estimation for Sri Lankan stocks of mulberry silkworm, *Bombyx mori*** 425
 Aptitude à la combinaison et estimation de l'hérabilité de souches Sri Lankaises du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* 433
 H. Z. LEA

- Polymorphisms of genomic DNA in parents and their resulting hybrids in mulberry *Morus*** 437
 Polymorphismes de l'ADN génomique des parents et de leurs hybrides chez le mûrier . . . 447
 C.-F. LOU, Y.-Z. ZHANG, J.-M. ZHOU

Rapports techniques / Technical reports

- Seasonal studies on the performance of the new multivoltine breed MU953 in the tropics** 451
 Performances saisonnières de la nouvelle lignée polyvoltine MU953 en région tropicale . . 459
 G. V. KALPANA & G. SREERAMA REDDY

- Studies on certain aspects of wild eri silkworm (*Philosamia cynthia drury*) with special reference to its rearing performance** 463
 Etude de certains aspects du ver à soie sauvage eri (*Philosamia cynthia drury*) en particulier sa performance d'élevage 469
 B. GOGOI & B.C. GOSWAMI

- Essential oil composition of *Cinnamomum bejolghota* (Buch-Ham.) Sweet - a secondary muga (*Antheraea assama* Ww) food plant from Assam, India** 473
 Composition de l'huile essentielle de *Cinnamomum bejolghota* (Buch-Ham) Sweet - une plante hôte secondaire du muga (*Antheraea assama* Ww) dans l'Assam en Inde 479
 S.N. CHOUDHURY, R.Z. AHMED, A. BARTHEL & P.A. LECLERCQ

Consumption and utilisation of <i>Terminalia arjuna</i> leaves in different instars of tropical tasar silkworm <i>Antheraea mylitta</i> drury	483
Consommation et utilisation des feuilles de <i>Terminalia arjuna</i> par le ver à soie tasar tropical <i>Antheraea mylitta</i> drury à différents âges	489
U.S.P. SINHA, C.M. BAJPAI, B.N. BRAHMACHARI, B.R.R.P SINHA & S.S. SINHA	

Changes in the biochemical contents of castor leaves affected by fungal diseases	493
Changements biochimiques dans les feuilles de ricin atteintes par des maladies fongiques	505
M.P. SHREE, CHANDRAMMA & C.M. VENKATESH	

Notes brèves / Brief notes

Studies on rearing performance of muga silkworm (<i>Antheraea assama</i> Westwood) on dighloti (<i>Litsaea salicifolia</i> Roxb.)	511
Etudes de la performance d'élevage du ver à soie (<i>Antheraea assama</i> Westwood) sur dighloti (<i>Litsaea salicifolia</i> Roxb.)	515
B. GOGOI & B.C. GOSWAMI	

<i>Xanthonomas campestris</i> Pv. mori, a new bacterial pathogen of mulberry	519
<i>Xanthonomas campestris</i> Pv. mori, un nouveau pathogène bactérien du mûrier	523
M.D. MAJI, S.M.H. QADRI & S.C. PAL	

Studies on seed longevity and germination in <i>Heteropanax fragrans</i>	527
Etudes sur la longévité et la germination chez <i>Heteropanax fragrans</i>	531
R. KUMAR & GARGI	

Bibliographie / Bibliography	533
Sériciculture générale / General sericulture	535
Mûrier / Mulberry	539
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	545
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	549
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	553
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	557
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	563
Glandes séricigènes / Silk glands	565
Soie / Silk	567

MONOCLONAL ANTIBODIES BASED RAPID IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS INFECTION IN *BOMBYX MORI* L.

GURPREET KALSI¹, M. SHAMIM¹, B. NATARAJU², R. K. DATTA² & S. K. GUPTA^{1*}

1. Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg,
New- Delhi-110 067, India.

2. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 608, India

*A rapid, sensitive and specific antibody capture assay (a colour immunochromatographic assay) using a nitro-cellulose strip dotted with murine monoclonal antibody, MA-319 raised against nuclear polyhedra and MA-377 against BmN cell derived virions of BmNPV coupled to colloidal gold for detection of nuclear polyhedra infection in *Bombyx mori* L. is described. The lower detection limit of this assay is equivalent to ten nuclear polyhedra/test. The assay is specific for BmNPV and failed to recognise *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* and *Nosema bombycis*. Hemolymph samples collected on various days from II instar larvae fed with infected mulberry leaves in the laboratory revealed that the antibody capture assay could detect infection as early as 2 days after infection. The results obtained by antibody capture assay on hemolymph samples of infected as well as normal larvae collected from the field revealed 100% correlation with the results by microscopic examination. The present assay could be useful for the detection of nuclear polyhedra infection at the field level.*

Keywords: *Bombyx mori* L., nuclear polyhedra, monoclonal antibodies, rapid immunoassay.

INTRODUCTION

The infection by nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of *Bombyx mori* leads to substantial damage to the silk industry in India. At early stages of BmNPV infection, morphological symptoms are atypical and discernible symptoms develop at later stages of the infection of larvae, leading to improper diagnosis and poor yield with sericulturists. To overcome the improper and delayed diagnosis of the disease by physical examination, immunological techniques can provide an alternative for early and definitive diagnosis of this viral disease. Various immunodiagnostic methods like the latex agglutination assay (Shimizu and Arakawa, 1986; Shamim *et al.*, 1995) and enzyme-linked immunosorbent assays, ELISAs, (Ito *et al.*, 1985; Sharnim *et al.*, 1994) have been developed for the detection of the BmNPV infection at an early stage. Latex agglutination assays though users friendly at the field level, however, are less sensitive. On the other hand, ELISAs are sensitive but not easy to use at the field level. In the present study, we report the development of a monoclonal antibodies (MCAs) based sensitive, specific and rapid antibody capture assay (a colour immunochromatographic assay) for the early detection of BmNPV and amenable for use at the field level.

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

Monoclonal antibodies:

The development and purification of murine MCAs, MA-319 (IgG₁) raised against nuclear polyhedra and MA-377 (IgG₁) against BmN cell derived virions of BmNPV have been described previously (Shamim *et al.*, 1994, 1996). MA-319 reacted with nucleopolyhedroviruses of the Baculoviridae family, namely *Bombyx mori*, *Amsacta olbistriga*, *Heliothis armigera*, and *Spodoptera litura* but not with normal hemolymph proteins, *Serratia marcescens*, *Nosema bombycis*, group-A streptococci, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in ELISA (Shamim *et al.*, 1994). MA-377 also reacted with BmNPV and was devoid of reactivity with *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens* and group-A streptococci (Shamim *et al.*, 1996). In Western blot, both MA-319 and MA-377 reacted with 29 kDa antigen, suggesting their likely recognition of polyhedrin (Shamim *et al.*, 1994 and 1996).

Antibody capture assay:

The general principle of the assay is outlined in Figure 1. To prepare a colloidal gold solution, 50 ml of 0.02% gold chloride (HAuCl₃; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was boiled in water. As soon as it began to boil, 1.2 ml of 1% sodium citrate was added with constant stirring. Colour changed from grey to blue and purple violet within 45-60 seconds. After the colour change, the heat was turned off, the solution stirred for 2-3 min, and allowed to cool at room temperature. The gold solution was kept at 4° C until used. MA-377 was coupled to colloidal gold as described earlier (Gupta *et al.*, 1992). In brief, to 1.0 ml of colloidal gold solution (0.02%), 10-15 µl of 1.0% K₂CO₃ (to adjust the pH of gold sol to 6.5) was added followed by 6 µg of MA-377 (1 mg/ml) and vortexed. It was incubated for 2-5 min at room temperature followed by addition of 6 µl of 20% BSA (final concentration approximately 0.12%) and centrifuged for 10 min at 5000 rpm. The supernatant was decanted slowly from the top leaving the 50 µl in which the pellet was resuspended and was used in the assay.

MA-319 in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4 was dotted (5 µg/µl/dot) on the nitrocellulose strip 8 µm pore size, 3.5 cm × 5 mm (Schleicher and Schuell Co., Fed. Rep. of Germany) and air dried. Nuclear polyhedra (50 µl, 10⁷ polyhedra/ml) were solubilized using 50 µl of 0.1 M K₂CO₃ for 5-10 min at room temperature and pH neutralised by addition of 50 µl of 1.0 M phosphate buffer (pH 7.4). In a microtitration plate, 10 µl of MA-377 colloidal gold conjugate, 10 µl of 10% alkali treated casein and 50 µl of alkali treated nuclear polyhedra were added and the content mixed. Alkali treated casein was used as a carrier protein to reduce the non-specific binding of MA-377 colloidal gold conjugate to the MA-319 coated on the nitrocellulose strip and proper movement of the fluid through the membrane. MA-319 dotted nitrocellulose strips were placed in each well. Each assay included a known positive and negative controls. The solution was allowed to rise by capillary action and the results were read after 10 minutes. MA-319 coated on nitrocellulose strip will capture free antigen (polyhedrin) or antigen-MA-377 colloidal gold conjugate complex. The samples positive for the presence of BmNPV showed a purple dot as compared to its absence in the negative samples.

Detection of nuclear polyhedra in field samples by antibody capture assay:

Hemolymph from 33 larvae suspected to be infected with BmNPV and 5 apparently healthy larvae were collected from Mysore for evaluation in antibody capture assay. Hemolymph samples (0.5-1.5 ml) were passed through nylon mesh (200 µm pore size) to remove tissue debris, suspensions kept at room temperature for 30 min, and pellets resuspended in 100 µl of distilled water. 50 µl of suspension was treated with 100 µl of 0.1 M K₂CO₃ for 10 minutes at room temperature followed by addition of 100 µl of 1.0 M phosphate buffer.

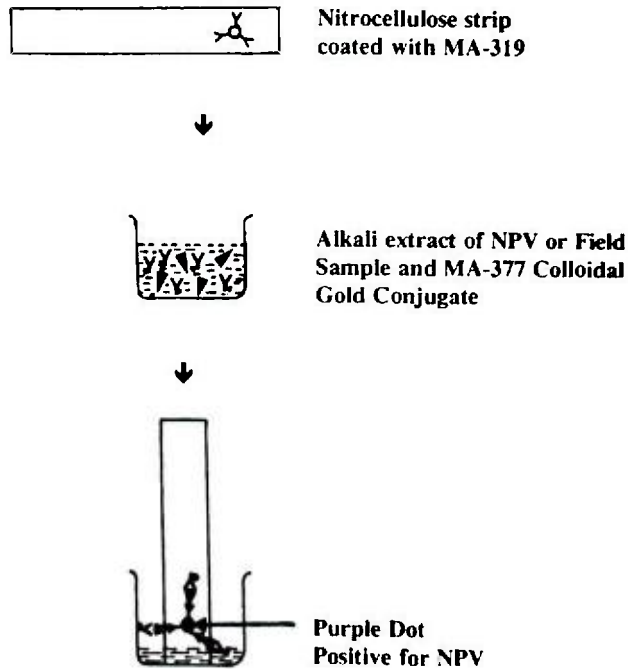


Figure 1. Schematic diagram to illustrate the principle of the antibody capture assay for the detection of BmNPV.

An appropriate amount of monoclonal antibody, MA-319 (Y), is deposited on the nitrocellulose strip (8 μm pore size) as described in Materials and Methods. Simultaneously in a microtitration plate alkali solubilized BmNPV or hemolymph samples collected from the test larva ($\blacktriangle$) are mixed with an appropriate concentration of second monoclonal antibody, MA-377 conjugated to colloidal gold (Y). Subsequently, the MA-319 coated nitrocellulose strip is dipped into the mixture of test antigen and MA-377 colloidal gold conjugate and solution allowed to rise by capillary action. The appearance of a purple dot indicates the presence of BmNPV and no colour its absence.

Figure 1. Diagramme schématique pour illustrer le principe du test de capture par anticorps pour la détection de BmNPV.

Une quantité appropriée d'anticorps monoclonal, MA-319 (Y) est déposée sur une bande de nitrocellulose (taille de pores de 8 μm) d'après la description dans Matériels et Méthodes. Simultanément, le BmNPV solubilisé à l'alcali ou des échantillons d'hémolymphe recueillis sur les larves test ($\blacktriangle$) sont mélangés sur une plaque de microtitration avec une concentration appropriée du second anticorps monoclonal, MA-377 conjugué à de l'or colloïdal (Y). Ensuite la bande de nitrocellulose recouverte de MA-319 est trempée dans le mélange d'antigène test et on laisse MA-377 conjugué à l'or colloïdal monter par action capillaire. L'apparition d'un point violet indique la présence de BmNPV et l'absence de couleur son absence.

To test how early the antibody capture assay can detect nuclear polyhedra infection, *B. mori* second instar larvae were fed mulberry leaves buttered with nuclear polyhedra (approximately 5×10^5 polyhedra/cm²). The larvae were sacrificed before infection (7 samples) and post-infection on days 1 (5 samples), 2 (5 samples), 3 (5 samples) and 4 (4 samples). Each sample contains the hemolymph from 2-3 larvae. Hemolymph samples were processed and tested as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Alkaline extract from as few as 10 nuclear polyhedra (2.4 ng protein) gave a distinct, visible purple dot as compared to the control (Figure 2, Panel I). The alkali extract prepared as described for BmNPV from 10^7 organisms of *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* and *Nosema bombycis* showed no purple dot (Figure 2, panel II). Out of 38 samples, 31 showed positive reactivity whereas 7 were found to be negative. Microscopic examination of the hemolymph samples revealed the presence of BmNPV infection in all the 31 samples found to be positive in the antibody capture assay. Out of 7 samples showing negative results in the assay, 5 samples had no infection visible by microscope, one showed bacterial infection and one Pebrine infection thereby suggesting the specificity of the test. Based on the number of nuclear polyhedra per field (400X), out of 31 hemolymph samples, 7 had low (1-5 polyhedra/field), 6 moderate (6-15 polyhedra/field) and 18 high (> 16 polyhedra/field) infection. The colour intensity of the purple dot was higher with hemolymph samples having high infection as compared to those with moderate infection, which in turn was higher than that observed with low infection. Hence, the intensity of the coloured purple dot was the indicator of the severity of the infection i.e., the density of the polyhedra load in the field samples.



Figure 2. Sensitivity (panel I) and specificity (panel II) of the antibody capture assay.

Nuclear polyhedra (10^7 /ml) were hydrolysed with 0.1 M K_2CO_3 as described in the text and various dilutions tested in the assay. Typical results are shown in Panel I; strip a, alkali extract equivalent to 1000 polyhedra/test; strip b, 100 polyhedra/test; strip c, 10 polyhedra/test and strip d, 50 mM PBS. Panel II shows the result with alkali extract prepared from 10^7 nuclear polyhedra/test (strip a); 10^7 *Bacillus thuringiensis*/test (strip b); 10^7 *Serratia marcescens*/test (strip c) and 10^7 *Nosema bombycis*/test (strip d).

Figure 2. Sensibilité (Planche I) et spécificité (Planche II) du test de capture par anticorps.

Les polyèdres nucléaires (10^7 /ml) sont hydrolysés avec 0.1 M K_2CO_3 d'après la description dans le texte et des dilutions variées testées dans l'analyse. Les résultats typiques sont montrés sur la planche I : bande a, extrait d'alkali équivalent à 1000 polyèdres/test ; bande b, 100 polyèdres/test ; bande c, 10 polyèdres/test et bande d, 50 mM PBS. La planche II montre le résultat avec l'extrait d'alkali préparé à partir de polyèdres nucléaires 10^7 /test (bande a) ; de *Bacillus thuringiensis* 10^7 /test (bande b) ; de *Serratia marcescens* 10^7 /test (bande c) et de *Nosema bombycis* 10^7 /test (bande d).

All samples collected on days 2, 3 and 4 post-infection were positive by the antibody capture assay. All samples collected before infection and on day 1 post-infection were negative by the test. On day 4 post-infection, none of the infected larvae had discernible morphological symptoms suggestive of nuclear polyhedrosis. Antibody capture assay will be useful for processing a large number of samples at the early development stages (second and third instars) when the total number of polyhedra per larvae is limited.

The antibody capture assay described in this report by virtue of its simplicity to perform and specificity, can prove to be an important diagnostic tool for the early detection of BmNPV infection in silkworm. The results can be obtained in less than 15 minutes after collecting the hemolymph and its processing. In contrast to ELISAs the present assay does not require separation of free antibody from antigen antibody complex and subsequent quantitation of enzyme activity by adding the appropriate substrate. The protein-A linked monoclonal antibody latex agglutination test for the diagnosis of BmNPV reported by us previously had a lower sensitivity limit of 1×10^5 nuclear polyhedra/test (Shamim *et al.*, 1995). In contrast, the present antibody capture assay can detect the equivalent of ten nuclear polyhedra per test and in addition offers the simplicity to perform as that of latex agglutination assay which will favour its use at the field level. This will help in initiating control measures or recommendations about the rejection of the rearing lot to save the crop loss at a later stage.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Department of Biotechnology and the Central silk Board, Government of India. The views expressed by the authors do not necessarily reflect the views of the funding agencies.

REFERENCES

- GUPTA R., TALWAR G. P., GUPTA S. K. (1992) Rapid antibody capture assay for detection of group-A streptococci using monoclonal antibody and colloidal gold-monospecific polyvalent antibody conjugate. *J. Immunoassay*, 13, 441-455.
- ITO T., HUKUHARA T., TAKAMI K. (1985) Improved method of detection of polyhedra of cytoplasmic polydrosis virus recovered from silkworm faeces. *J. Seri. Sci. Japan*, 54, 1-5.
- SHAMIM M., BAIG M., DATTA R. K., GUPTA S. K. (1994) Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the detection of nuclear polyhedra of nuclear polyhedrosis virus infection in *Bombyx mori* L. *J. Invertebr. Pathol.*, 63, 151-156.
- SHAMIM M., BAIG M., NATARAJU B., DATTA R. K., GUPTA S. K. (1995) Evaluation of protein-A linked monoclonal antibody latex agglutination test for diagnosis of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm *Bombyx mori* L. *J. Immunoassay*, 16, 155-166.
- SHAMIM M., BAIG M., NATARAJU B., DATTA R. K., GUPTA S. K. (1996) Use of monoclonal antibodies to BmNPV for early detection of the nuclear polyhedrosis disease in *Bombyx mori* L., *Sericultoria*, 36, 75-83.
- SHIMIZU S., ARAKAWA A. (1986) Latex agglutination test for the detection of the cytoplasmic polyhedrosis virus and the denonucleosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* L., *J. Seri. Sci. Japan*, 56, 169-170.

DOSAGE IMMUNOLOGIQUE RAPIDE A L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX POUR LA DETECTION DE L'INFESTATION DUE AU VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE CHEZ *BOMBYX MORI* L.

GULPREET KALSI¹, M. SHAMIM¹, B. NATARAJU², R.K. DATTA² & S.K. GUPTA^{1*}

1. Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New-Delhi-110 067, Inde

2. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 608, Inde.

Nous décrivons un dosage rapide, sensible et spécifique de capture par anticorps (dosage immunochromatographique coloré) en utilisant une bande de nitro-cellulose tachée avec un anticorps monoclonal murin, MA-319, produit contre les polyèdres nucléaires et MA-377 contre les virions de BmNPV dérivés des cellules BmN couplé à de l'or colloïdal pour la détection de l'infestation par les polyèdres nucléaires chez *Bombyx mori* L. La limite de détection inférieure de ce dosage est équivalente à 10 polyèdres/test. Le dosage est spécifique de BmNPV et ne croise pas avec *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* et *Nosema bombycis*. Les échantillons d'hémolymphe recueillis à des jours variés sur des larves du deuxième âge, nourries avec des feuilles de mûrier infestées en laboratoire, révèlent que le dosage par capture d'anticorps peut détecter l'infestation dès le 2ème jour après l'infestation. Les résultats obtenus par le dosage de capture d'anticorps sur des échantillons d'hémolymphe de larves infestées et normales, recueillies dans des conditions naturelles montrent une corrélation de 100 % avec les résultats par examen microscopique. Le dosage actuel pourrait être utile pour la détection de l'infestation par des polyèdres nucléaires sur le terrain.

INTRODUCTION

L'infestation de *Bombyx mori* par le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) entraîne des dégâts importants pour l'industrie de la soie en Inde. Aux premiers stades de l'infestation par BmNPV, les symptômes morphologiques sont atypiques et les symptômes discernables ne se développent qu'aux stades plus tardifs de l'infestation sur les larves, ce qui entraîne un diagnostic incorrect et un rendement faible pour les sériciculteurs. Pour éviter un diagnostic incorrect et retardé de la maladie par l'examen physique, les techniques immunologiques sont une alternative pour un diagnostic précoce et définitif de cette maladie virale. Des méthodes d'immunodiagnostic variées, comme le test d'agglutination au latex (Shimizu et Arakawa, 1986 ; Shamim et coll., 1995) et les tests immunoabsorbants liés aux enzymes, ELISA (Ito et coll., 1985 ; Shamim et coll., 1994), ont été mis au point pour la détection de l'infestation BmNPV aux premiers stades. Les tests d'agglutination au latex, bien que d'une utilisation pratique sur le terrain, sont cependant moins sensibles. D'autre part, les ELISA sont sensibles mais pas faciles à utiliser sur le terrain. Dans cette étude, nous décrivons la mise au point d'un dosage par capture d'anticorps rapide, spécifique, sensible, basé sur les anticorps monoclonaux (MCA) (dosage immunochromatographique coloré) pour la détection précoce de BmNPV, d'une utilisation pratique sur le terrain.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

Anticorps monoclonaux :

La mise au point et la purification de MCA murins, MA-319 (IgG₁) dirigé contre le polyèdre nucléaire et MA-377 (IgG₁) contre les virions de BmNPV dérivés de cellules BmN ont été décrits antérieurement (Shamim et coll., 1994, 1996). MA-319 réagit avec les virus de la polyédrose nucléaire de la famille des Baculoviridae, à savoir *Bombyx mori*, *Amsacta olbistriga*, *Heliothis armigera* et *Spodoptera litura* mais pas avec les protéines de l'hémolymphe normales, *Serratia marcescens*, *Nosema bombycis*, les streptocoques du groupe A, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans les ELISA (Shamim et coll., 1994). MA-377 réagit aussi avec BmNPV et est dépourvu de réactivité avec *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens* et les streptocoques du groupe A (Shamim et coll., 1996). Par immunoempreinte, MA-319 et MA-377 réagissent tous les deux avec un antigène 29 kDa, ce qui suggère qu'ils reconnaissent probablement la polyèdrine (Shamim et coll., 1994 et 1996).

Dosage de capture par anticorps :

Le principe général du dosage est souligné dans la figure 1. Pour préparer une solution d'or colloïdal, 50 ml de chlorure d'or à 0,02 % (HAuCl₃ Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) sont bouillis dans de l'eau. Dès l'ébullition, 1,2 ml de citrate de sodium à 1 % est ajouté en remuant constamment. La couleur passe de gris à bleu et à violet pourpre en 45-60 secondes. Après le changement de couleur, on éteint, la solution est mélangée pendant 2-3 minutes, et laissée refroidir à température ambiante. La solution d'or est gardée à 4 ° C jusqu'à utilisation. MA-377 est couplé à de l'or colloïdal d'après une description antérieure (Gupta et coll., 1992). En bref, on ajoute 10-15 µl de K₂CO₃ à 1 % (pour ajuster le pH de la solution d'or à 6,5) à 1 ml de solution d'or colloïdal (0,02 %), suivi par 6 µg de MA-377 (1 mg/ml) et on agite. On incube cette solution pendant 2-5 min. à température ambiante puis on ajoute 6 µl de BSA à 20 % (concentration finale d'environ 0,12 %) et on la centrifuge pendant 10 minutes à 5000 tpm. Le surnageant est décanté lentement à partir du haut en laissant 50 µl, dans lesquels le culot est resuspendu et utilisé pour le dosage.

MA-319 dans du tampon phosphate 100 mM, au pH de 7,4 est déposé (5 µg/µl/tâche) sur une bande de nitrocellulose de 8 µm de pore, 3,5 cm × 5 mm (Schleicher et Schuell Co., Rep. Fed. d'Allemagne) et séché à l'air. Les polyèdres nucléaires (50 µl, 10⁷ polyèdres/ml) sont solubilisés en utilisant 50 µl de K₂CO₃ à 0,1 M pendant 5-10 minutes, à température ambiante et le pH est neutralisé par l'ajout de 50 µl de tampon phosphate à 1,0 M (pH 7,4). Sur une plaque de microdosage, 10 µl de conjugué d'or colloïdal de MA-377, 10 µl de caséine traitée à l'alcali à 10 % et 50 µl de polyèdres nucléaires traités à l'alcali sont ajoutés et le tout est mélangé. La caséine traitée à l'alcali est utilisée comme protéine support pour réduire la liaison non spécifique du conjugué d'or colloïdal de MA-377 avec MA-319 étalé sur la bande de nitrocellulose et pour une circulation correcte du fluide à travers la membrane. Les bandes de nitrocellulose colorées à MA-319 sont placées dans chaque puits. Chaque dosage comprend des témoins positif et négatif connus. On laisse la solution monter par capillarité et les résultats sont lus après 10 minutes. MA-319 étalé sur la bande de nitrocellulose capturera l'antigène libre (la polyèdrine) ou le complexe de conjugué d'or colloïdal de l'antigène MA-377. Les échantillons positifs en BmNPV montrent un point violet tandis que rien n'apparaît pour les échantillons négatifs.

Détection des polyèdres nucléaires dans les échantillons naturels par dosage de capture par anticorps :

L'hémolymphe de 33 larves suspectes d'être infestées par BmNPV et 5 larves apparemment saines sont recueillies à Mysore pour l'évaluation du dosage de capture par anticorps. Les échantillons d'hémolymphe (0,5-1,5 ml) sont passés dans un tamis en nylon (pore de 200 µm) pour enlever les débris de tissus, les suspensions sont conservées à température ambiante pendant 30 minutes et les culots sont resuspendus dans 100 µl d'eau distillée. Cinquante µl de la suspension sont traités avec

100 µl de K_2CO_3 à 0,1 M pendant 10 minutes à température ambiante, puis 100 µl de tampon phosphate à 1,0 M sont ajoutés.

Pour tester à quel stade le dosage par capture d'anticorps peut détecter l'infestation par les polyèdres nucléaires, des larves de *B. mori* au deuxième âge sont nourries avec des feuilles de mûrier enduites de polyèdres nucléaires (approximativement 5×10^5 polyèdres/cm²). Les larves sont sacrifiées avant l'infestation (7 échantillons) et après l'infestation les 1^{er} (5 échantillons), 2^{ème} (5 échantillons), 3^{ème} (5 échantillons) et 4^{ème} jours (4 échantillons). Chaque échantillon contient l'hémolymphe de 2-3 larves. Les échantillons d'hémolymphe sont traités et testés d'après la description plus haut.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'extrait alcalin de seulement 10 polyèdres nucléaires (2,4 ng de protéine) donne un point violet distinct, visible par rapport au témoin (Figure 2, Planche I). L'extrait alcalin préparé pour BmNPV d'après la description à partir de 10^7 cellules de *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* et de *Nosema bombycis* ne présente pas de point violet (Figure 2, planche II). Sur 38 échantillons, 31 montrent une réactivité positive tandis que 7 s'avèrent négatifs. L'examen microscopique des échantillons d'hémolymphe révèle la présence de l'infestation BmNPV dans les 31 échantillons s'avérant positifs avec le dosage de capture par anticorps. Sur 7 échantillons présentant des résultats négatifs avec le dosage, 5 échantillons n'avaient pas d'infestation visible au microscope, l'un présentait une infestation bactérienne et un autre une infestation Pebrine, ce qui prouve la spécificité du test. Sur la base du nombre de polyèdres par champ (400 X), sur 31 échantillons d'hémolymphe, 7 avaient une infestation faible (1-5 polyèdres/champ), 6 une infestation modérée (6-15 polyèdres/champ) et 18 une infestation élevée (> 16 polyèdres/champ). L'intensité de la couleur du point violet est plus forte pour les échantillons d'hémolymphe ayant une infestation élevée que pour ceux ayant une infestation modérée, qui à son tour est plus forte que celle que l'on observe pour une infestation faible. Ainsi, l'intensité du point coloré violet est l'indicateur de la gravité de l'infestation, c'est à dire de la densité de la charge en polyèdres pour les échantillons récoltés sur le terrain.

Tous les échantillons recueillis 2, 3 et 4 jours après l'infestation sont positifs par le dosage de capture par anticorps. Tous les échantillons recueillis avant l'infestation et le 1^{er} jour après l'infestation sont négatifs avec le test. Le 4^{ème} jour après l'infestation, aucune des larves infestées n'a de symptômes morphologiques discernables de la polyédrose nucléaire. Le dosage de capture par anticorps sera utile pour traiter un grand nombre d'échantillons aux premiers stades de développement (deuxième et troisième âges), quand le nombre total de polyèdres par larve est limité.

Le dosage de capture par anticorps décrit dans ce rapport, en vertu de sa simplicité de réalisation et de sa spécificité, peut s'avérer être un outil de diagnostic important pour la détection précoce de l'infestation BmNPV chez le ver à soie. Les résultats peuvent être obtenus en moins de 15 minutes après le recueil et le traitement de l'hémolymphe. A la différence d'ELISA, le dosage actuel ne nécessite pas la séparation de l'anticorps libre du complexe anticorps antigène et la quantification ultérieure de l'activité de l'enzyme par ajout de substrat approprié. Le test d'agglutination au latex par anticorps monoclonal lié à la protéine A, que nous avons décrit précédemment pour le diagnostic de BmNPV avait une limite de sensibilité inférieure de 1×10^5 polyèdres/test (Shamim et coll., 1995). Par opposition, le dosage actuel de capture par anticorps peut détecter l'équivalent de dix polyèdres nucléaires par test et de plus présente la même simplicité d'utilisation que le test d'agglutination au latex, ce qui favorisera son utilisation dans les conditions réelles. Il permettra de mettre au point des mesures de lutte ou des recommandations sur le rejet du lot d'élevage, pour sauver la récolte plus tard.

SUBCELLULAR LOCALISATION OF TREHALASE IN DIFFERENT TISSUES OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.: DEMONSTRATION OF THE HIGHEST ACTIVITY IN MITOCHONDRIA

BELA KESHAN & ARUN K. RAY

Department of Animal Physiology, Bose Institute, P-1/12 CIT Scheme VIIM, Calcutta 700054, India.

*In order to understand the subcellular localisation of the trehalase activity in different organs of *Bombyx mori* L. (Nistari race) the enzyme assay was undertaken in extracts from the midgut of 5th instar larvae on the 4th day and in extracts from the fat body and ovary of pupae on the 3rd day. All the organs showed the highest trehalase specific activity in the mitochondrial fraction. Further, the cytosolic fractions were found to contain higher trehalase activities than the microsomal fractions in the fat body and midgut only. In the ovary, the microsomal fraction demonstrated a higher trehalase activity than the cytosolic fraction. In the midgut tissues the highest substrate affinity constant (K_m) of 2.1 ± 0.10 mM was obtained in the microsomal fraction, in comparison to a K_m value of 0.88 ± 0.06 mM and 0.94 ± 0.05 mM for trehalase in the mitochondrial and cytosolic fraction respectively. In the ovary and the fat body, the post-mitochondrial fraction trehalase had a K_m value of 5.8 ± 0.14 mM and 4.5 ± 0.22 mM respectively for trehalase. The present work thus shows appreciable activities of trehalase in mitochondrial fractions in different tissues of *B. mori*.*

Keywords: Trehalase, fat body, ovary, midgut, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

Trehalase (1-0, alpha-D glucopyranosyl-alpha-D glucopyranoside 1-glucosylhydrolase; E.C.3.2.1.28) is an important glycosidase that catalyses a specific irreversible hydrolysis of trehalose, the prime blood sugar of insects and a very important available carbohydrate reserve for energy metabolism. In insects, there is a homeostatic mechanism for regulation of the level of trehalose in the blood and this could be the results of the controlled degradation or synthesis of trehalose (Murphy and Wyatt, 1965).

To understand the homeostatic regulation of blood trehalose in insects, one of the important pre-requisites is to know the precise subcellular localisation of trehalase. Trehalase has been isolated in a membrane-bound or soluble form from different insect species but very little is known about its mitochondrial origin. However, it has been found in the inner mitochondrial membrane in the flight muscle of higher Diptera and Hymenoptera (Reed and Sacktor, 1971; Brandt and Huber, 1979), suggesting it as an important flux regulating enzyme (Friedman, 1985). Much of the study on trehalase localisation was done in flight muscles of various insect species, but very few studies have been made in *B. mori*.

The present study has been pursued to understand the subcellular distribution and nature of such a metabolically important enzyme in the fat body, ovary and midgut in *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

The larvae and pupae of *Bombyx mori* L. race Nistari, reared in our own laboratory were used in the experiments. The insects were kept on mulberry leaves at $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ with 12 hr light / 12 hr dark condition.

Preparation of cell fractions:

For midgut subcellular fractionation, 5th instar larvae on the 4th day and for fat body and ovary, 3rd day pupae of silkworms were used. The tissues were dissected in cold insect saline and homogenised in GP buffer (25 mM phosphate buffer pH 6.0, containing 5% glycerol) as described by Su *et al.* (1993). The homogenate was centrifuged at 1000 Xg for 10 minutes to remove nuclei and cell debris. The supernatant was again centrifuged at 10,000 Xg for 15 minutes. The pellet thus obtained was used as a mitochondrial fraction which was suspended in GP buffer. The supernatant, i.e., the post-mitochondrial portion was again centrifuged at 105,000 Xg for 1 hour to obtain the cytosolic (supernatant) and microsomal fractions (as the pellet).

Purification of mitochondria:

The mitochondrial pellet thus obtained was suspended in 0.32 M sucrose solution. 2 ml of this fraction was layered over 6 ml of 1.2 M sucrose solution and was centrifuged at 50,000 Xg for 20 min. The pellet was washed and suspended in 25 mM GP buffer.

Assay of trehalase activity :

The trehalase activity was assayed by the method of Dahlqvist (1964) with some modifications. Briefly, the incubation mixture contained 25 mM trehalose in 25 mM GP buffer at pH 6.0 and an appropriate amount of enzyme preparation. For the midgut, 50 to 100 μg of enzyme protein (tissue fraction) were added to the reaction mixture and incubated for 10 minutes. For the fat body and the ovary 30 to 100 μg of enzyme protein (tissue fraction) were incubated with the reaction mixture for 1 hour at 37°C . The reaction was stopped by the addition of 10% TCA. It was then centrifuged and from the supernatant the liberated glucose was measured by the *O*-toluidine method (Stroev and Makarova, 1989). The trehalase activity was expressed as nmoles of glucose released per min per mg protein.

Succinate dehydrogenase (SDH) enzyme assay:

SDH activity was determined by the method of Lee and Lardy (1965).

Determination of protein:

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

Statistical analysis:

Twelve pooled samples, each consisting of tissues from three individual insects were used for the enzyme assay. Student's 't'-test was performed for analysis of data, and $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

1. Magnitude of the trehalase activity in different subcellular fractions (Table I):

The trehalase activity, when expressed as the specific activity, was highest in the mitochondrial fraction of all the organs studied, in comparison to that in respective microsomal and cytosolic fractions. In the midgut and the fat body the enzyme activity was found to be greater in the cytosolic

fraction than in microsomes. The enzyme activity in the midgut cytosolic and microsomal fraction showed 77% and 38% of the enzyme activity found in mitochondrial fraction in this organ respectively. Similarly, in the fat body, the cytosolic fraction and the microsomal fraction demonstrated 48% and 32% of the mitochondrial trehalase activity.

Table I. Trehalase activity (nmoles glucose released/min/mg protein) in different fractions of different tissues of *B. mori*. The activity (Mean $\pm$ S. E.) of the enzyme was obtained from 12 pooled samples. Each pool consisted of tissues from 3 insects.

Tableau I. Activité tréhalase (nmoles de glucose libéré min/mg de protéines) dans différentes fractions de différents tissus de B. mori. On obtient l'activité (Moyenne $\pm$ E. T.) de l'enzyme à partir de 12 échantillons regroupés. Chaque regroupement comprend les tissus de 3 insectes.

	Mitochondrial trehalase activity	Cytosolic trehalase activity	Microsomal trehalase activity
	<i>Activité de la tréhalase mitochondriale</i>	<i>Activité de la tréhalase cytosolique</i>	<i>Activité de la tréhalase microsomique</i>
Midgut / Intestin moyen	109.0 $\pm$ 1.8 (A)	83.0 $\pm$ 4.3 (B)	41.7 $\pm$ 3.2 (C)
Fat body / Corps gras	21.6 $\pm$ 1.5 (D)	10.1 $\pm$ 1.2 (E)	6.69 $\pm$ 0.03 (F)
Ovary / Ovaire	23.09 $\pm$ 1.9 (G)	2.12 $\pm$ 0.46 (H)	5.2 $\pm$ 1.1 (I)

t-test probability differences / Différences de probabilité du test - t : Group A-B / Groupe A-B = P < 0.01, A-C = P < 0.001, B-C = P < 0.001, D-E = P < 0.001, D-F = P < 0.001, E-F = P < 0.02, G-H = P < 0.001, G-I = P < 0.001, H-I = P < 0.05

However, in the ovary the microsomal trehalase activity showed a higher magnitude of 23% than the 9% enzyme activity found in the cytosolic fraction, in comparison to the mitochondrial trehalase activity (100%).

2. Trehalase activities in crude and purified mitochondria in the midgut:

The trehalase activity of the purified mitochondrial fraction did not show significant changes in comparison to the crude mitochondrial fraction. The midgut purified mitochondrial fraction showed a trehalase activity of 114.0 $\pm$ 3.0 in comparison to the enzyme activity of 109.0 $\pm$ 1.8 nmoles of glucose released per minute per mg protein, in the crude mitochondrial fraction prepared from the same tissue.

3. Specificity of the purified mitochondria:

The activity of succinate dehydrogenase was determined as a marker enzyme for the presence of mitochondria in purified mitochondrial, microsomal and cytosolic fractions obtained from the midgut

tissues. While the microsomal and cytosolic fractions obtained from the midgut did not show any detectable SDH activity, the purified mitochondrial fractions from the midgut tissue showed an activity of 0.0748 ± 0.007 OD/min/mg protein.

4. Effect of pH on the trehalase activity (Fig. 1):

The pH optima for the trehalase activity was determined using the post-mitochondrial fractions of the fat body and ovary. Of the different pH tested, pH 6.0 was found to be optimum for the trehalase activity in the fat body and the ovary.

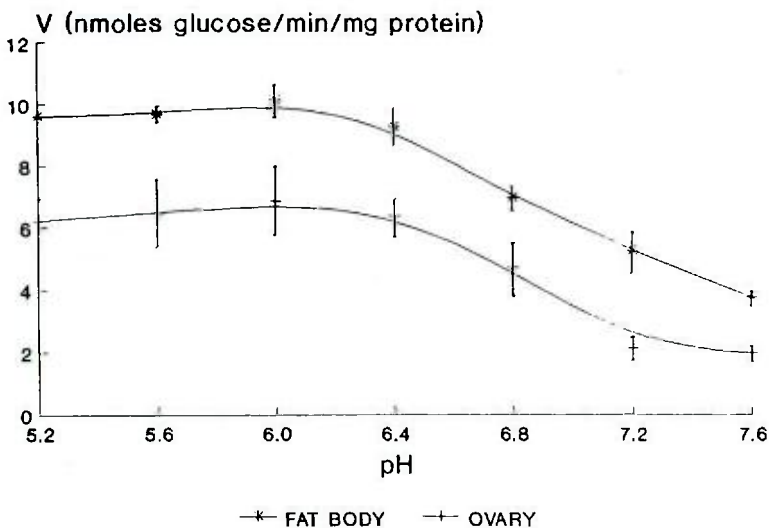


Fig. 1. Effect of pH on trehalase activity in fat body and ovary of *Bombyx mori*.

The vertical bars denote the activity (Mean $\pm$ S. E.) of the enzyme as obtained from 12 pooled samples. Each pool consisted of tissues from 3 insects.

Fig. 1. Effet du pH sur l'activité de la tréhalase dans le corps gras et l'ovaire de *Bombyx mori*.

Les colonnes montrent l'activité (Moyenne $\pm$ écart type) de l'enzyme obtenue d'après 12 échantillons regroupés. Chaque regroupement comprend les tissus de 3 insectes.

5. Determination of the K_m value for trehalose (Figs. 2-5):

In the midgut tissue the highest K_m value of 2.1 ± 0.10 mM was obtained in the microsomal fraction. The mitochondrial and cytosolic fractions of this tissue showed the K_m value of 0.88 ± 0.06 mM and 0.94 ± 0.05 mM respectively (Figs. 2 and 3).

The post-mitochondrial fractions of the ovary and the fat body showed K_m of 5.8 ± 0.14 mM and 4.5 ± 0.22 mM respectively (Figs. 4 and 5).

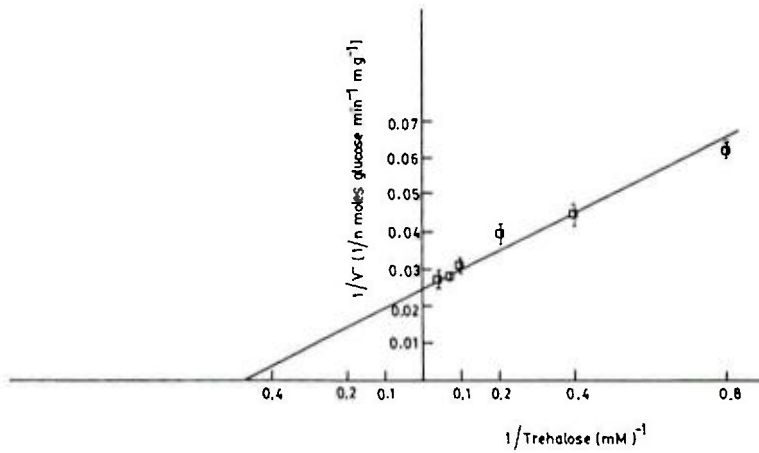


Fig. 2. Lineweaver - Burk plot of trehalase activity in microsomal fraction taken from midgut of *Bombyx mori*.

Fig. 2. Courbe de Lineweaver et Burk de l'activité de la tréhalase de la fraction microsomique prise dans l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

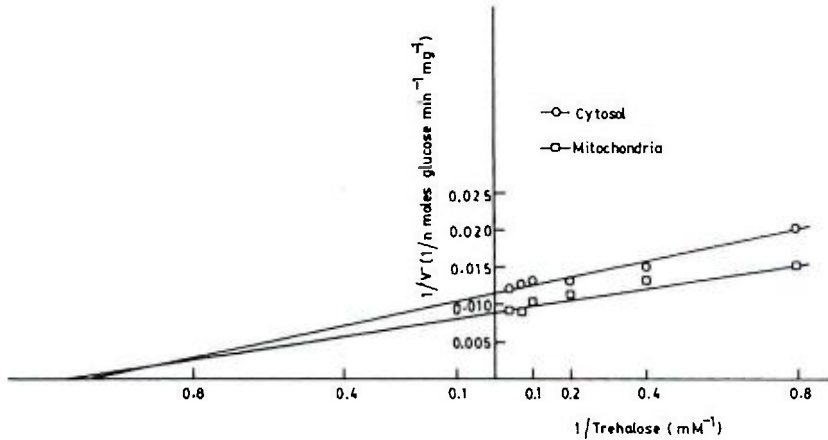


Fig. 3. Lineweaver - Burk plot of trehalase activity in cytosolic and mitochondrial fraction taken from midgut of *Bombyx mori*.

Fig. 3. Courbe de Lineweaver et Burk de l'activité de la tréhalase dans les fractions cytosolique et mitochondriale prises dans l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

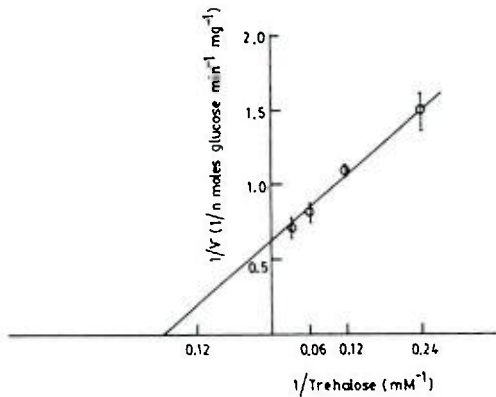


Fig. 4. Lineweaver - Burk plot of trehalase activity in ovary of *Bombyx mori*.

Fig. 4. Courbe de Lineweaver et Burk de l'activité de la tréhalase dans l'ovaire de *Bombyx mori*.

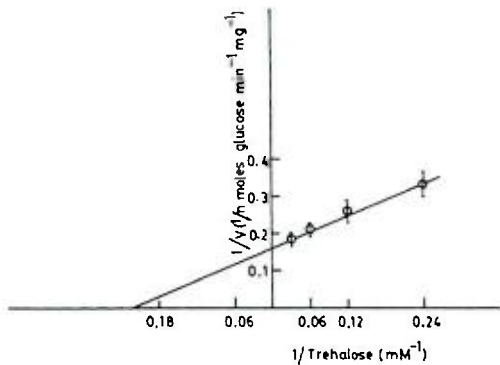


Fig. 5. Lineweaver - Burk plot of trehalase activity in the fat body of *Bombyx mori*.

Fig. 5. Traçé de Lineweaver et Burk de l'activité de la tréhalase dans le corps gras de *Bombyx mori*.

DISCUSSION

In insects, the phosphorylase and trehalase play an important role in the regulation of glycolysis as these are considered to be the flux generating enzymes of carbohydrate breakdown, regulating the flow of substrates through glycolysis and the TCA cycle (Candy, 1985). Although trehalase is a key enzyme of carbohydrate metabolism, the nature of the subcellular distribution of this enzyme is still unclear. Most of the previous studies were made using total homogenates of organs (Ikeda *et al.*, 1993) or taking the 20,000 Xg supernatant (Jahagirdar and Seligy, 1992). Very few attempts have been made to show the subcellular localisation of trehalase in *B. mori*. As the gut function appears to be very much important during larval development and, fat body and ovary attain their maximum functional state at the pupal life in *Bombyx mori*, the distribution of trehalase activity at the subcellular level was examined using larval midgut and pupal fat body and ovary.

An optimum pH of 6.0 was found to be necessary for the highest activity of trehalase in the fat body and ovary. We have used glycerol along with phosphate buffer during homogenisation as suggested by Su *et al.*, (1993) to prevent the transformation of membrane-bound trehalase to a soluble form and to prevent the loss of activity. The absence of SDH activity in cytosolic and microsomal fractions clearly showed that these fractions were free from mitochondrial contaminant. Thus our data revealed that the trehalase activity is localised in all the three fractions i.e., cytosol, microsome and mitochondria in cells of different tissues in *B. mori*.

In the silkworm, *B. mori*, larval midgut trehalase was found to be membrane-bound (Azuma and Yamashita, 1985) whereas it exists as a soluble form in pupal midgut (Sumida and Yamashita, 1977), but in our results, trehalase has been found to localise in all the three fractions i.e., mitochondrial, cytosolic and microsomal of larval midgut tissues. In honey-bee all the trehalase activity of flight muscle is bound to the mitochondria which together with hemolymph trehalose forms a system for the supply of glucose for glycolysis (Brandt and Huber, 1979). The mitochondrial form of trehalase has also been found in other insect species, for example, in *Sarcophaga barbata* (Clements *et al.*, 1970), in *Calliphora erythrocephala* (Duve, 1975) and in *Phormia regina* (Reed and Sacktor, 1971). Such a localisation would allow for absolute and immediate control over trehalose breakdown at the inception of flight, with a concomitant rapid increase in transmembrane movement of substrate (Candy, 1985). In our experiment, the mitochondria showed the highest trehalase activity when expressed as specific activity. It may be that it supplies glucose to the cytoplasm for entering into glycolytic pathway as it is inhibited by glucose (Mansura *et al.* 1992) and glucose-6-P (Araujo and Panek, 1993) as shown in *Rhodotorula rubra* and *Saccharomyces cerevisiae* respectively.

We did not get any significant difference in the K_m values of the trehalase in cytosolic and mitochondrial fractions of midgut tissues. However, the K_m values of the trehalase of these fractions showed a significant difference with that found in microsomal fraction ($P < 0.001$). Such differences in K_m values in the different cellular compartments may be due to the existence of two isoforms of this enzyme. An appreciable amount of trehalase activity has been shown by Azuma and Yamashita (1985) only in the microsomal membrane fraction of the midgut tissues of silkworm but not in the mitochondrial fraction. However, they demonstrated the mitochondrial trehalase activity only in presence of Mg^{++} . Such differences with our observations might be due to differences in the use of tissue homogenisation media containing EDTA in their experimental procedure (Azuma and Yamashita, 1985) or it might be due to race variation.

A tissue-specific variation in the K_m values of trehalase has been found in pupal fat body and ovarian tissue ($P < 0.01$) in this experiment. As the pupal stage is a non-feeding stage and as trehalose serves as an important substrate for energy production and biosynthesis of macromolecules, the variation in the specific activity and K_m value of the enzyme catabolising trehalose is naturally expected depending upon the metabolic status of the specific tissues at this stage of silkworm.

In the midgut, trehalase does not exist as a digestive enzyme, but it is related to provide metabolic energy to maintain active processes including absorption, osmotic and ion regulation during metamorphosis or at the period of starvation (Azuma and Yamashita, 1985). It also prevents the back diffusion of blood sugar and reduces the incipient loss of trehalose into the alimentary tract. Wyatt (1967) has proposed a scheme whereby the hydrolysis of trehalose by midgut trehalase and synthesis of trehalose by the fat body, using the glucose reabsorbed into the hemolymph, drives the cycle in the direction of retention of hemolymph carbohydrate with minimal loss in excreta. This clearly describes why trehalase, a key enzyme of carbohydrate metabolism, has been found in different cellular fractions in different tissues.

To understand the physiological significance of trehalase in different organs in insect in detail, application of specific inhibitors of trehalase appears as a useful tool. Thus specifically targeting the inactivation of trehalase may prove valuable for development of new insect control strategies in near future (Valaitis and Bowers, 1993). Alternatively, understanding the physiological significance of trehalase activities in different tissues of *B. mori* may prove valuable for better production of silk.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial assistance to Keshan, B. from the Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), Government of India, is gratefully acknowledged.

Thanks are due to the Superintendent, Ranaghat Sericulture Nursery, West Bengal for kindly supplying us with the silkworm eggs. Thanks are also due to the Director, CSRTI, Berhampore for allowing us to collect silkworm eggs from SRA (I/C), F.L., Mohanpur, W. B. from time to time.

REFERENCES

- ARAUJO, P.S. -de., PANEK-A. U (1993) The interaction of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase with membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1148(2), 303-307.
- AZUMA M., YAMASHITA O. (1985) Cellular localisation and proposed function of midgut trehalase in the silkworm larva, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell*, 17(4), 539-551.
- BRANDT N. R., HUBER R. E. (1979) The localisation of honey-bee thorax trehalase. *Can. J. Biochem.* 57, 145-154.
- CANDY D. J. (1985) Intermediary metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 10, Biochemistry (Eds. Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), Pergamon Press, Oxford, pp.1-41.
- CLEMENTS A. N., PAGE J., BORCK K. & VAN OUYEN J. J. (1970) Trehalases of the flesh fly, *Sarcophaga barbata*. *J. Insect Physiol.* 16, 1389-1404.
- DAHLQVIST A. (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 7, 18-25.
- DUVE H. (1975) Intracellular localisation of trehalase in thoracic muscle of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochem.* 5, 299-311.
- FRIEDMAN S. (1985) Carbohydrate metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 10, Biochemistry (Eds. Kerkut G. A. and Gilbert L. I.) pp 44-76, Pergamon Press, Oxford.
- IKEDA M., SU Z.-H., SAITO H., IMAI K., SATO Y., ISOBE M., YAMASHITA O. (1993) Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone. *J. Insect Physiol.* 39(10), 889-895.
- JAHAGIRDAR A. P. & SELIGY V. L. (1992) A transfer membrane method for *in situ* detection and quantification of trehalase. *Anal. Biochem.* 202, 96-99.
- LEE Y. P., LARDY H. A. (1965) Influence of thyroid hormones on L-alpha-glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.* 240(3), 1427-1436.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MANSURA J. J., SILVA J. L., PANEK A. U. (1992) Characterisation of trehalase in *Rhodotorula rubra*. *Biochem. Int.* 28(4), 693-700.
- MURPHY, THOMAS A. & WYATT G. R. (1965) The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in silkworm fat body. *J. Biol. Chem.* 240(4), 1500-1508.
- REED W. D. & SACKTOR B. (1971) Localisation of trehalase in the flight muscle of the blowfly, *Phormia regina*. *Archs. Biochem. Biophys.* 145, 392-401.
- STROEV E. A., MAKAROVA V. G. (1989) ed. Determination of glucose concentration in blood by O-toluidine method' In 'Laboratory Manual in Biochemistry' pp143-144, Mir Publishers, Moscow.
- SU Z.-H., SATO Y., YAMASHITA O. (1993) Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1173(2), 217-224.
- SUMIDA, M., YAMASHITA O. (1977) Trehalase transformation in silkworm midgut during metamorphosis. *J. Comp. Physiol.* 115B, 241-253.
- VALAITIS A. P., BOWERS D. F. (1993) Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the Gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23(5), 599-606.
- WYATT G. R. (1967) The biochemistry of sugar and polysaccharides in insects. *Adv. Insect. Physiol.* 4, 287-360.

LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA TREHALASE DANS DIFFERENTS TISSUS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. : PREUVE DE L'ACTIVITE LA PLUS ELEVEE DANS LES MITOCHONDRIES

BELA KESHAN & ARUN K. RAY

Department of Animal Physiology, Bose Institute, P-1/12 CIT Scheme VIIM,
Calcutta 700054, Inde.

Pour comprendre la localisation subcellulaire de l'activité de la tréhalase dans différents organes de Bombyx mori L. (race Nistari), un dosage de l'enzyme a été réalisé dans des extraits de l'intestin moyen de larves du cinquième âge au quatrième jour et dans des extraits du corps gras et de l'ovaire de chrysalides au troisième jour. Tous les organes présentent une activité tréhalase spécifique plus élevée dans la fraction mitochondriale. De plus, on observe que les fractions cytosoliques ont des activités tréhalase plus élevées que les fractions microsomales seulement dans le corps gras et l'intestin moyen. Dans l'ovaire, la fraction microsomale présente une activité tréhalase plus élevée que la fraction cytosolique. Dans les tissus de l'intestin moyen la constante d'affinité du substrat la plus élevée (Km) de $2,1 \pm 0,10$ mM apparaît dans la fraction microsomale, par comparaison à une valeur Km respectivement de $0,88 \pm 0,06$ mM et de $0,94 \pm 0,05$ pour le tréhalose dans les fractions mitochondriale et cytosolique. Dans l'ovaire et le corps gras, la tréhalase de la fraction post-mitochondriale a respectivement une valeur Km de $5,8 \pm 0,14$ mM et de $4,5 \pm 0,22$ mM pour le tréhalose. Le travail actuel montre ainsi que des activités tréhalase importantes existent dans les fractions mitochondriales dans différents tissus de B. mori.

INTRODUCTION

La tréhalase (1-0, alpha-D glucopyranosyl alpha-D glucopyranoside 1 glucosylhydrolase: E.C.3.2.1.28) est une glycosidase importante qui catalyse une hydrolyse irréversible spécifique du tréhalose, le principal sucre dans le sang des insectes qui représente une réserve disponible très importante en hydrates de carbone pour le métabolisme énergétique. Chez les insectes, il existe un mécanisme homéostatique pour la régulation du niveau de tréhalose dans le sang qui pourrait résulter de la dégradation contrôlée de la synthèse du tréhalose (Murphy et Wyatt, 1965).

Pour comprendre la régulation homéostatique du tréhalose dans le sang des insectes, l'une des conditions nécessaires très importantes est de connaître la localisation subcellulaire précise de la tréhalase. La tréhalase a été isolée sous forme liée aux membranes ou sous forme soluble chez différentes espèces d'insectes mais on en sait très peu sur son origine mitochondriale. Cependant, on l'a trouvée dans la membrane mitochondriale intérieure du muscle de vol des diptères et des hyménoptères (Reed et Sacktor, 1971 ; Brandt et Huber, 1979), ce qui suggère que c'est une enzyme importante de la régulation du flux (Friedman, 1985). La plupart des études sur la localisation de la tréhalase ont été faites sur les muscles de vol de diverses espèces d'insectes, mais très peu d'études ont été faites chez *B. mori*.

L'étude actuelle a été entreprise pour connaître la distribution subcellulaire et la nature d'une enzyme aussi importante pour le métabolisme, dans le corps gras, l'ovaire et l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

Les larves et les chrysalides de *Bombyx mori* L. de race Nistari, élevées dans notre propre laboratoire ont été utilisées dans les expériences. Les insectes sont conservés sur des feuilles de mûrier à $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ dans les conditions 12 heures de lumière / 12 heures d'obscurité.

Préparation des fractions sub-cellulaires :

Pour le fractionnement subcellulaire de l'intestin moyen, des larves du cinquième âge au quatrième jour et pour le corps gras et l'ovaire des chrysalides de vers à soie au 3ème jour ont été utilisées. Les tissus sont disséqués dans une solution saline froide et homogénéisés dans un tampon GP (tampon phosphate 25 mM pH 6,0, contenant 5 % de glycérol) d'après la description de Su et coll., (1993). L'homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes pour enlever les noyaux et les débris de cellules. Le surnageant est à nouveau centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes. Le culot ainsi obtenu est utilisé comme fraction mitochondriale et est suspendu dans du tampon GP. Le surnageant, c'est à dire la partie post-mitochondriale est à nouveau centrifugé à 105 000 g pendant 1 heure pour obtenir les fractions cytosolique (surnageant) et microsomale (comme culot).

Purification des mitochondries :

Le culot mitochondrial ainsi obtenu est suspendu dans une solution de sucrose à 0,32 M. Deux ml de cette fraction sont déposés sur 6 ml de solution de sucrose à 1,2 mM et centrifugés à 50 000 g pendant 20 minutes. Le culot est lavé et suspendu dans du tampon GP 25 mM.

Mesure de l'activité tréhalase :

L'activité tréhalase est mesurée par la méthode de Dahlqvist (1964) avec quelques modifications. Brièvement, le mélange d'incubation contient 25 mM de tréhalose dans un tampon GP 25 mM au pH de 6,0 et une quantité appropriée de préparation d'enzyme. Pour l'intestin moyen, 50 à 100 µg de protéines (fraction de tissu) sont ajoutés au mélange de réaction et incubés pendant 10 minutes. Pour le corps gras et l'ovaire 30 à 100 µg de protéines (fraction de tissu) sont incubés avec le mélange de réaction pendant 1 heure à 37°C . La réaction est arrêtée par l'ajout d'ATC (acide trichloracétique) 10 %. L'échantillon est ensuite centrifugé et le glucose libéré du surnageant est mesuré par la méthode à l'ortho-toluidine (Stroev et Makarova, 1989). L'activité tréhalase est exprimée en nmoles de glucose libéré par mg de protéines.

Mesure de l'activité succinate déshydrogénase (SDH) :

L'activité SDH est déterminée par la méthode de Lee et Lardy (1965).

Dosage des protéines :

La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry et coll., (1951) en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme étalon.

Analyse statistique :

Douze échantillons regroupés, chacun constitué des tissus de trois insectes sont utilisés pour la mesure de l'activité enzymatique. Un test « t »- de student est réalisé pour l'analyse des données et on a considéré que $P < 0,05$ était significatif.

RESULTATS

1. Importance de l'activité tréhalase dans différentes fractions subcellulaires (Tableau I) :

L'activité tréhalase, quand elle est exprimée en activité spécifique, est la plus élevée dans la fraction mitochondriale parmi tous les organes étudiés, par comparaison respectivement à celle des

fractions microsomique et cytosolique. Dans l'intestin moyen et dans le corps gras, on trouve que l'activité de l'enzyme est plus importante dans la fraction cytosolique que dans les microsomes. L'activité de l'enzyme dans les fractions cytosolique et microsomique de l'intestin moyen représente respectivement 77 % et 38 % de l'activité de l'enzyme de la fraction mitochondriale dans cet organe. De même, dans le corps gras, la fraction cytosolique et la fraction microsomale représentent 48 % et 32 % de l'activité de la tréhalase mitochondriale.

Cependant, dans l'ovaire, l'activité de la tréhalase microsomique est supérieure (23 %) à l'activité de l'enzyme que l'on trouve dans la fraction cytosolique (9 %), en comparaison avec l'activité de la tréhalase mitochondriale (100 %).

2. Activités de la tréhalase dans les mitochondries brutes et purifiées de l'intestin moyen :

L'activité tréhalase de la fraction mitochondriale purifiée ne présente pas de changements significatifs par comparaison à la fraction mitochondriale brute. La fraction mitochondriale purifiée de l'intestin moyen présente une activité de $114,0 \pm 3,0$ par comparaison à l'activité de l'enzyme dans la fraction mitochondriale brute préparée à partir du même tissu ($109,0 \pm 1,8$ nmoles de glucose libéré par minute par mg de protéine).

3. Spécificité des mitochondries purifiées :

L'activité succinate déhydrogénase a été déterminée pour marquer la présence des mitochondries dans les fractions mitochondriale, microsomique et cytosolique purifiées obtenues à partir des tissus de l'intestin moyen. Alors que les fractions microsomique et cytosolique obtenues pour l'intestin moyen ne présentent pas d'activité SDH détectable, les fractions mitochondriales purifiées de l'intestin moyen présentent une activité de $0,0748 \pm 0,007$ OD/min/mg protéine.

4. Effet du pH sur l'activité de la tréhalase (Fig. 1) :

Le pH optimum pour l'activité de la tréhalase a été déterminé en utilisant les fractions post-mitochondriales du corps gras et de l'ovaire. Parmi les différents pH testés, on trouve qu'un pH 6,0 est optimum pour l'activité de la tréhalase dans le corps gras et l'ovaire.

5. Détermination de la valeur K_m pour le tréhalose (Figs. 2-5) :

Dans le tissu de l'intestin moyen, la valeur K_m la plus élevée de $2,1 \pm 0,10$ mM est obtenue dans la fraction microsomique. Les fractions mitochondriale et cytosolique de ce tissu présentent une valeur K_m de $0,88 \pm 0,006$ mM et de $0,94 \pm 0,05$ mM respectivement (Figs. 2 et 3).

Les fractions post-mitochondriales de l'ovaire et du corps gras présentent un K_m de $5,8 \pm 0,14$ mM et de $4,5 \pm 0,22$ mM respectivement (Figs. 4 et 5).

DISCUSSION

Chez les insectes, la phosphorylase et la tréhalase jouent un rôle important dans la régulation de la glycolyse, car elles sont considérées comme les enzymes génératrices du flux de la dégradation des hydrates de carbone, régulant l'écoulement des substrats par la glycolyse et le cycle TCA (Candy, 1985). Bien que la tréhalase soit une enzyme clé du métabolisme des hydrates de carbone, la distribution subcellulaire de cette enzyme n'est toujours pas claire. La plupart des études précédentes ont été faites en utilisant des homogénats complets des organes (Ikeda et coll., 1993) ou en prenant le surnageant 20 000 g (Jahagirdar et Seligy, 1992). Très peu d'essais ont été faits pour montrer la localisation subcellulaire de la tréhalase chez *B. mori*. Comme la fonction de l'intestin apparaît être très importante pendant le développement larvaire et que le corps gras et l'ovaire atteignent leur état fonctionnel maximum pendant la vie pupale chez *Bombyx mori*, la distribution de l'activité de la tréhalase au niveau subcellulaire a été examinée en utilisant l'intestin moyen larvaire et le corps gras et l'ovaire des chrysalides.

On a trouvé qu'un pH optimum de 6,0 est nécessaire pour l'activité la plus élevée de la tréhalase dans le corps gras et l'ovaire. Nous avons utilisé du glycérol avec un tampon phosphate pendant l'homogénéisation d'après les suggestions de Su et coll., (1993) pour empêcher la transformation de la tréhalase liée aux membranes en forme soluble et pour empêcher la baisse d'activité. L'absence d'activité SDH dans les fractions cytosolique et microsomique montre clairement que ces fractions sont exemptes de contaminants mitochondriaux. Ainsi, nos données révèlent que l'activité de la tréhalase est localisée dans les trois fractions (cytosol, microsomes et mitochondries) dans les cellules de différents tissus de *B. mori*.

Chez le ver à soie *B. mori*, on observe que la tréhalase larvaire de l'intestin moyen est liée aux membranes (Azuma et Yamashita, 1985) tandis qu'elle existe sous forme soluble dans l'intestin moyen de la chrysalide (Sumida et Yamashita, 1977) mais dans nos résultats, on trouve que la tréhalase se localise dans les trois fractions, (mitochondriale, cytosolique et microsomique) des tissus de l'intestin moyen larvaire. Chez l'abeille, toute l'activité de la tréhalase du muscle de vol est liée aux mitochondries, qui avec le tréhalose de l'hémolymphe forment un système de fourniture de glucose pour la glycolyse (Brandt et Huber, 1979). La forme mitochondriale de la tréhalase a aussi été trouvée chez d'autres espèces d'insectes, par exemple, chez *Sarcophaga barbata* (Clements et coll., 1970), chez *Calliphora erythrocephala* (Duve, 1975) et chez *Phormia regina* (Reed et Sacktor, 1971). Une telle localisation permettrait un contrôle absolu et immédiat de la distribution du tréhalose au début du vol, avec une rapide augmentation concomitante du mouvement transmembranaire du substrat (Candy, 1985). Dans notre travail, les mitochondries montrent l'activité tréhalase la plus élevée quand elle est exprimée en tant qu'activité spécifique. Il se peut qu'elle fournisse du glucose au cytoplasme pour entrer dans le processus glycolytique alors qu'il est inhibé par le glucose (Mansura et coll., 1992) et le glucose-6-P (Araujo et Panek, 1993) comme il a été montré respectivement chez *Rhodotorula rubra* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous n'avons pas obtenu de différence significative des valeurs de Km de la tréhalase dans les fractions cytosolique et mitochondriale des tissus de l'intestin moyen. Cependant, les valeurs Km de la tréhalase de ces fractions montrent une différence significative par rapport à celles que l'on trouve dans la fraction microsomique ($P < 0,001$). De telles différences des valeurs Km dans les différents compartiments cellulaires sont peut-être dues à l'existence de deux isoformes de cette enzyme. Une quantité appréciable de l'activité tréhalase a été montrée par Azuma et Yamashita (1985) dans la fraction membranaire microsomique des tissus de l'intestin moyen du ver à soie mais pas dans la fraction mitochondriale. Cependant, ils ont prouvé l'activité de la tréhalase mitochondriale seulement en présence de Mg^{2+} . De telles différences avec nos observations sont peut-être dues à des différences d'utilisation des milieux d'homogénéisation des tissus contenant de l'EDTA dans leur procédure d'expérimentation (Azuma et Yamashita, 1985) ou elles sont peut-être dues à des variations de races.

Une variation des valeurs Km de la tréhalase spécifique au tissu a été observée dans le corps gras et le tissu ovarien de la chrysalide ($P < 0,01$). Comme le stade nymphal est un stade sans alimentation et comme le tréhalose sert comme substrat important pour la production d'énergie et la biosynthèse des macromolécules, on s'attend naturellement à une variation de l'activité spécifique et de la valeur Km de l'enzyme catabolisant le tréhalose, en fonction de l'état métabolique des tissus spécifiques pendant cette phase chez le ver à soie.

Dans l'intestin moyen, la tréhalase n'existe pas comme enzyme digestive, mais elle fournit de l'énergie métabolique pour maintenir des processus actifs y compris l'absorption des ions, la régulation osmotique, pendant la métamorphose ou pendant la période d'inanition (Azuma et Yamashita, 1985). Cela empêche aussi la rétrodiffusion du sucre du sang et réduit la perte de tréhalose dans le système alimentaire. Wyatt (1967) a proposé une méthode par laquelle l'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase de l'intestin moyen et la synthèse du tréhalose par le corps gras, en utilisant le glucose réabsorbé dans l'hémolymphe, oriente le cycle dans la direction de la rétention des hydrates de carbone de l'hémolymphe avec une perte minime en excréments. Cela explique clairement pourquoi la tréhalase, une enzyme clé du métabolisme des hydrates de carbone, a été trouvée dans différentes fractions cellulaires de différents tissus.

Pour comprendre en détail la signification physiologique de la tréhalase dans différents organes chez l'insecte, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la tréhalase apparaît comme un outil utile. Ainsi, cibler de manière spécifique l'inactivation de la tréhalase, pourrait s'avérer utile pour la mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes dans un futur proche (Valaitis et Bowers, 1993). Alternativement, la compréhension de la signification physiologique des activités de la tréhalase dans différents tissus de *B. mori* pourrait avoir un intérêt pour obtenir une meilleure production de soie.

COMBINING ABILITY AND HERITABILITY ESTIMATION FOR SRI LANKAN STOCKS OF MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI*

HO ZOO LEA

Department of Biology, Kangwon National University, Chunchon, South Korea, 200-701.

*Bivoltine strains of mulberry silkworm, **Bombyx mori** L. were initially introduced into Sri Lanka in the 1950's, however, systematic characterisation for quantitative characters has begun only recently (Lea and Alwis, 1995). For six economic characters the combining ability and heritability were estimated, using eight inbred pure line stocks and their F1 hybrids in a half diallel cross. Performance of parental inbreds ranged between 153 and 205 cg for the single cocoon weight (CW), 20.2 ~ 22.7% for the cocoon shell percentage (S%) and 15.6 ~ 20.8 kg for cocoon yields/10,000 larvae (CY). Their F1 hybrids performed from 195 to 230 cg for CW, 19.6 ~ 25.8% for S% and 18.5 ~ 23.3 kg for CY. Judging from the variation of both general (GCA) and specific (SCA) combining ability and heritability (h^2_B), the intensity of both additive and non-additive gene action was significant for future exploitation of genetic resources to develop superior hybrids for cocoon and silk production. Promising combiners of general and of specific combining ability were recognised for each of the six economically important characters to facilitate future silkworm breeding programs in Sri Lanka.*

Keywords: Mulberry silkworm, *Bombyx mori*, silkworm breeding, half-diallel cross, combining ability, heritability.

INTRODUCTION

During the early 1950's, bivoltine genetic stocks of the silkworm were first introduced into Sri Lanka, by a religious group and thereafter by various sericulture development projects. Their geographical origins were limited to the countries: China, India, Italy, Japan, Korea, Taiwan and Thailand. In Sri Lanka, as cold storage systems are too unstable to make it possible to practice long-term storage of bivoltine silkworm eggs, silkworm stock varieties are maintained through continuous rearing cycles all the year round; four to five generations each year. Consequently, it is speculated that any genetic stocks would have gone through a more rapid inbreeding process than in the country of origin. The germplasm bank of the mulberry silkworm in Sri Lanka consists of 12 pure lines for genetic marker genes and 57 inbred lines for hybrid generation for cocoon production. In addition, newly imported hybrids are fully exploited to accumulate new gene sources for improvement of economic characters for silk production. Knowledge on such basic parameters as combining ability and heritability is essential in choosing promising parental inbred lines for improved hybrid development. Both parameters are important tools in the interpretation of genetic backgrounds of the existing breeding population (ESCAP, 1993).

Following the initial study on eight numbers of inbreds (Lea and Alwis, 1995), in this investigation another 8 inbreds were employed to estimate the combining ability and heritability for six

economically important larval and cocoon characters and productivity. In formulating a breeding program, fundamental information is necessary on the identification of better combiners among inbred stock varieties and on the amount of releasable genetic variation of the base population. The genetic backgrounds of any gene-pool can be probed through the estimation of such important variables for the evaluation of the genetic stocks as combining ability and heritability. Through analysis of variance components of hybrid performances in half-diallel or diallel crosses, a silkworm breeder can obtain valuable information for genetic up-grading of hybrid varieties with economically important quantitative characters (Falconer, 1960; Sprague and Tatum, 1942).

MATERIALS AND METHODS

Average performance values of six important characters during the 3-year period (1993-1995) were first considered in the primary selection of promising parental pure lines. According to the internal regulations on silkworm germplasm management, selected inbred varieties were designated as SN23, SN43, SN44, SN46, SN47, SN48, SN49 and SN52; prefix *SN* for Sri Lanka, Nillambe, Silkworm Genetics and Breeding Station (SGBS), Silk and Allied Products Development Authority (SAPDA). Without reciprocals, they were crossed in a half-diallel combination with parents, generating 36 genotypes; 28 F1 hybrids and 8 parental pure lines.

Standard protocols were followed for the handling and treatment methods and procedures at egg stage, for larval rearing, for taking care of pupae and moths, in 2 replications for each of the 8 parents and 28 F1's. In choosing the parental stocks, priority was given to superiority in two major parameters; cocoon shell percentage and cocoon yields. During the month of May 1996, the parental lines were crossed and the silkworm eggs were subjected to the 'immediate acid treatment' method. For each replication, 200 individual larvae were counted on the first day of the fourth instar, and were reared at SGBS, SAPDA, Nillambe during the months of May and June 1996. Economically important characters were quantitatively measured: cocoon size (CS, cocoon/litre), cocoon shell weight (SW, cg), single cocoon weight (CW, cg), cocoon shell percentage (S%, %), pupation rate (PR, %) and cocoon yields/10000 larvae (CY, kg). Standard methods and techniques were observed for the collection and analyses of field data, as described in the references (ESCAP, 1993).

The BASIC program was exclusively employed on a personal computer for statistical analysis of observed values. The program was originally developed by Magari and Kang (1994) for Griffing's (1954) diallel analyses and kindly provided to me. In the analysis of variance (Table II), the genetic component of total phenotypic variation was calculated by the formula of

$$\sigma^2_G = \frac{(\sigma^2_E + r\sigma^2_G) - \sigma^2_E}{r}$$

and the heritability (h^2_B) in broad sense was calculated according to the formula of

$$h^2_B = \frac{\sigma^2_G}{(\sigma^2_E + \sigma^2_G)}$$

where σ^2_E is equivalent to the environmental variance, σ^2_G is the genetic variance, and r is the number of replications. Other statistical interpretations were made according to the concept of Dixon and Massey (1969).

Table I. Performance of parental inbreds and their F1's in a half-diallel cross.
Tableau I. Performance de parents consanguins et de leurs F1 dans un demi croisement diallétique.

Parent/F1	CS*	SW	CW	S%	PR	CY
SN23 × SN23	98	35	168	21.0	90	17.2
SN46	84	48	228	21.0	77	19.8
SN47	80	53	243	21.7	96	23.3
SN49	78	44	225	19.6	96	19.7
SN43	72	49	234	21.1	96	23.2
SN44	70	47	219	21.5	98	22.7
SN48	62	48	228	21.1	86	21.1
SN52	84	42	203	20.9	97	20.4
SN46 × SN46	90	41	185	22.1	84	20.8
SN47	84	47	220	21.3	96	20.0
SN49	67	48	230	21.0	93	20.4
SN43	75	47	225	21.0	95	20.0
SN44	84	47	203	23.0	93	19.9
SN48	63	50	225	22.1	95	22.1
SN52	83	46	216	21.2	97	21.6
SN47 × SN47	93	46	202	22.7	89	19.0
SN49	75	47	223	21.0	92	19.8
SN43	74	49	215	22.9	97	21.2
SN44	76	49	211	22.9	97	22.5
SN48	61	52	228	22.7	93	23.0
SN52	83	49	220	22.4	99	22.1
SN49 × SN49	78	36	182	20.2	95	18.3
SN43	69	43	215	29.9	84	20.6
SN44	75	44	205	21.5	99	21.0
SN48	69	47	225	20.9	94	22.4
SN52	79	41	195	21.2	98	20.1
SN43 × SN43	79	41	192	20.9	86	19.4
SN44	77	44	204	21.6	98	20.8
SN48	62	48	222	21.4	77	18.5
SN52	75	43	203	21.0	98	19.9
SN44 × SN44	79	37	168	22.4	70	16.6
SN48	62	55	213	25.8	99	22.3
SN52	70	45	196	22.9	99	20.5
SN48 × SN48	59	47	205	23.1	65	19.4
SN52	69	46	206	22.7	95	21.3
SN52 × SN52	96	34	153	22.0	70	15.6
Overall mean						
Moyenne générale	75.9	45.3	209.2	21.69	91.0	20.45

* CS: Cocoon size (cocoon/ l) / Taille du cocon (cocon / l). SW: Cocoon shell weight (cg) / Poids de la coque (cg). S%: Cocoon shell percentage (%) / Richesse soyeuse (%). PR: Pupation rate (%) / Taux de nymphose (%). CY: Cocoon yields (kg) / 10,000 larvae / Rendements en cocons (kg) / 10 000 larves.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Performance of parents and their hybrids:

Table I shows the average performance of parental inbreds and their F1's. The cocoon size, as measured by the number of individual cocoons in one litre volume, ranged from the largest 59/l for SN48 to the smallest 98/l for SN23 for the parental inbred lines, while for the F1 hybrids from the largest 61/l for SN47 × SN48 to the smallest 84/l for SN23 × SN46 and three other hybrids, with the overall mean value of 76/l. The cocoon shell weight ranged from 34 to 47 cg for a cocoon of parents and from 41 to 55 cg for hybrids, the overall mean being of 45 cg/cocoon. The heaviest single cocoon weight 205 cg/cocoon was observed for the parental line SN48 and the lightest 153 cg for SN52, while 195 cg/cocoon for the hybrid SN49 × SN52, 243 cg for SN23 × SN47, and the overall mean value was of 209cg/cocoon. The cocoon shell percentage for parents was highest 23.1% in SN48 and lowest 20.2 in SN49, and for the hybrids the highest was 25.8% in SN44 × SN48 and the lowest 19.6 in SN23 × SN49, with an overall mean of 21.7%. Among 8 parental lines, the highest pupation rate (95%) was observed in SN49 and the lowest (65%) in SN48. Out of 28 hybrid genotypes, the lowest pupation rate 77% was for SN23 × SN46 and SN43 × SN48, and the highest 99% for SN47 × SN52 and three others, with an overall mean of 91%. Fresh cocoon yields per 10000 larvae ranged from 15.6 to 20.8 kg for parents and from 18.5 to 23.3 kg for hybrids, with an overall mean yield of 20.5 kg.

Table II. Analysis of variance for major economic characters and combining ability of parental inbreds, and heritability estimates as expressed in their F1's in a half-diallel cross.

Tableau II. Analyse de variances des principaux caractères économiques et aptitude à la combinaison des consanguins parentaux et estimations de l'hérabilité d'après l'expression dans leurs F1 dans un demi croisement diallélique.

Source (variance components)	df	Mean squares					
Source (Composants de variance)	df	Somme des carrés					
		CS*	SW	CW	S %	PR	CY
Total	71						
Genotype ($\sigma^2_E + r\sigma^2_G$)	35	191.5	46.0	797.9	2.6	162.5	6.5
GCA	7	622.7	92.7	1224.8	9.1	117.1	3.7
SCA	28	83.6	34.4	691.1	1.0	173.8	7.2
Block (r) / Bloc (r)	1						
Error / Erreur (σ^2_E)	35	24.3	2.5	42.2	0.3	10.5	2.0
h^2_B (%)		78.0	90.1	90.0	79.3	87.9	53.0

* CS: Cocoon size (cocoon/l) / Taille du cocon (cocon / l). SW: Cocoon shell weight (cg) / Poids de la coque (cg). S%: Cocoon shell percentage (%) / Richesse soyeuse (%). PR: Pupation rate (%) / Taux de nymphose (%). CY: Cocoon yields (kg) / 10,000 larvae / Rendements en cocons (kg) / 10 000 larves. df/df: Degree of freedom / Degré de liberté.

Table III. Estimated values of general (GCA) and specific combining ability (SCA) between parental inbreds.

Tableau III. Valeurs estimées de l'aptitude générale (GCA) et spécifique (SCA) à la combinaison entre consanguins parentaux.

Parent/F1	CS*	SW	CW	S%	PR	CY
GCA						
SN23	4.3	-0.7	3.3	-0.7	0.35	0.0
SN46	3.6	0.6	3.3	-5.8	-0.7	0.1
SN47	3.6	2.9	8.0	0.5	2.7	0.6
SN49	-1.5	-2.2	-0.2	-1.0	2.6	-0.3
SN43	-2.2	-0.5	1.8	-0.5	-0.4	-0.1
SN44	-1.1	-0.3	-9.6	0.9	0.2	-0.1
SN48	-11.8	3.1	7.4	0.7	-5.1	0.5
SN52	5.1	-2.9	-13.9	8.2	0.4	-0.7
SCA						
SN23 × SN46	0.2	2.4	12.2	-0.0	-13.7	-0.8
SN23 × SN47	-3.8	5.3	22.5	0.2	1.5	2.2
SN23 × SN49	-0.7	1.4	12.7	-0.5	1.6	-0.4
SN23 × SN43	-6.0	5.0	19.2	0.5	4.6	2.8
SN23 × SN44	-9.1	2.2	16.1	-0.4	6.0	2.3
SN23 × SN48	-6.4	0.5	8.1	-0.7	-0.8	0.0
SN23 × SN52	-1.3	0.6	4.4	-0.3	5.3	0.6
SN46 × SN47	0.9	-2.0	-0.5	-0.8	2.5	-1.2
SN46 × SN49	-11.0	4.5	17.7	0.4	0.1	0.2
SN46 × SN43	-2.3	1.7	10.7	-0.2	5.1	-0.5
SN46 × SN44	5.6	1.7	7.8	0.5	2.0	-0.6
SN46 × SN48	-4.7	0.9	5.1	-0.3	9.8	1.0
SN46 × SN52	-1.6	2.7	17.4	-0.6	6.4	1.7
SN47 × SN49	-3.0	0.7	6.0	-0.2	-4.3	-0.9
SN47 × SN43	-3.3	1.5	-4.0	1.2	3.2	0.3
SN47 × SN44	-2.4	1.3	3.4	-0.2	2.6	1.6
SN47 × SN48	-6.7	0.3	3.4	-0.3	4.4	1.4
SN47 × SN52	-1.6	3.8	16.7	0.0	5.0	1.8
SN49 × SN43	-3.2	0.0	4.2	-0.3	-9.2	0.6
SN49 × SN44	1.7	1.3	5.6	0.0	5.2	1.0
SN49 × SN48	6.4	0.7	8.6	-0.6	5.0	1.8
SN49 × SN52	-0.5	1.0	-0.1	0.4	4.1	0.7
SN43 × SN44	4.4	-0.6	2.6	-0.5	6.7	0.6
SN43 × SN48	0.1	-0.4	3.6	-0.6	-8.5	-2.4
SN43 × SN52	-3.8	0.6	5.9	-0.4	6.6	0.3
SN44 × SN48	-1.0	6.8	6.0	2.5	12.9	1.4
SN44 × SN52	-9.9	2.8	10.3	0.3	7.5	0.9
SN48 × SN52	-0.2	0.6	3.3	0.2	8.8	1.0

* CS: Cocoon size (cocoon/l) / Taille du cocon (cocon / l). SW: Cocoon shell weight (cg) / Poids de la coque (cg). S%: Cocoon shell percentage (%) / Richesse soyeuse (%). PR: Pupation rate (%) / Taux de nymphose(%). CY: Cocoon yields (kg) / 10,000 larvae / Rendements en cocons (kg) / 10 000 larves.

2. Estimation of the combining ability and heritability:

Table II contains the analysis of variance results for the quantitative characters studied and also includes general (GCA) and specific (SCA) combining ability and heritability estimates. For all the characters examined, differences between the means of 36 genotypes and also between the values of their combining ability are highly significant. For the genotypic variance component, the GCA effect is more attributed to the additive gene action, while the SCA effect is more attributed to the non-additive dominance and to the interaction between the genes in action for the phenotypic expression (Falconer, 1960). In this interbreeding population under investigation, both additive and non-additive gene actions contribute significantly to the existing variation between parental stocks, so that the population is expected to respond effectively to both 'mass' and also 'pedigree' selections. In choosing a strategy for a breeding program utilising such pure lines, a certain degree of fixation of gene frequency is required before proceeding with 'cross-breeding' methods. In other words among those parental lines studied, effective gene frequencies to the expression of those economic characters are not yet completely fixed but still segregating, while revealing some amount of interaction between contributing loci.

Presented in Table III are the values of GCA and SCA estimated for the parental lines and their hybrids. Among pure line stocks, SN52 showed the highest GCA 5.1 and SN48 the lowest - 11.8 with $LSD/.05 = 2.62$ for the cocoon size. The range of GCA for the cocoon shell weight fell between -2.9 and 3.1 with $LSD/.05 = 0.84$. If one intends to increase the single cocoon weight, SN52 will not be a good choice as a parent since it revealed the negative GCA effect of - 13.9, while SN47 will serve as a good combiner with GCA 8.0. Cocoon shell percentage can be improved with better efficiency by employing SN52 as a general combiner. GCA values for the pupation rate ranged from -5.1 to 2.7. For cocoon yields, a rather smaller GCA effect was expected with the pure lines used in this study, among parental lines it ranged from -0.7 to 0.6 with $LSD/0.5 = 0.75$.

As the SCA effect for the cocoon size was as low as - 11.8 in the hybrid cross between SN46 and SN49, it is expected that in this cross combination the average cocoon size was bigger or there was a lower number of individual cocoons per litre than expected when only the additive gene action was considered. However, in the cross SN49 $\times$ SN48, the cocoon size of their F1's was smaller or there were more cocoons in a volume of a litre than expected only when the average mean values of parents were taken into account, exhibiting higher interactions between genes responsible for determining the cocoon size as compared with the non-additive gene action in cross combinations. The highest SCA value of 6.8 in the cocoon shell weight was recognised in the cross between SN44 and SN48 and the lowest - 2.0 in the hybrid SN46 $\times$ SN47. For the single cocoon weight, the hybrid SN23 $\times$ SN47 revealed the highest SCA effect of 22.5, while SN47 $\times$ SN43 the lowest - 4.0. SCA values indicated that the cocoon shell percentage increased most by the non-additive gene action in the hybrid SN44 $\times$ SN48 with SCA value of 12.9. Cocoon yields as expressed in kilograms per 10000 silkworm larvae ranged from - 2.4 for the hybrid SN43 $\times$ SN48 to 2.8 for SN23 $\times$ SN43 with Least Significant Difference ($LSD/.05 = 2.26$). In future breeding programs, hybrids with highest SCA values could be exploited for maintenance and dissemination of the non-additive gene action for that specific character under consideration.

3. Heritability:

Genetic component out of the total phenotypic variation of an economic character can be quantitatively expressed by estimating the heritability at a certain period of the genetic history of an inter-breeding genetic population under given environmental conditions. Prediction of the breeding value of a genotype for a quantitative character can be made through the heritability estimation, and it is one of the most important prerequisites in the process of deciding which parental lines should be chosen for the creation of a source population with ample variation. The value of heritability for a character is affected by such factors influencing the total phenotypic variation as the genetic backgrounds and history of a population, the number of genes involved for the character, the genotypes used, the extent of experimental errors, etc. Usually, homogeneous inbreeding populations with

limited number of individuals tend to exhibit a lower heritability, due to greater experimental error as exerted by the environmental fluctuation. It is generally accepted that the heritability of a given character is good only to a particular population under these specific genetic and experimental conditions.

Heritability in the broad sense (h^2_B , %) was estimated as shown in Table II. The relative magnitude of the genetic component was rather higher for each character than expected since with a small population size usually a lower heritability is expected. In Sri Lanka, stock varieties have been maintained through continuous rearing cycles; 4-5 times a year. Therefore, it was previously postulated that for each locus for a given character the pure line stocks have gone through a rapid gene fixation, losing considerable amount of heterogeneity within a line. During such periods of population history, the proportion of heritable genetic components gets usually low in total phenotypic variation. However, high values of heritability estimates were in line with the observation that variance caused by additive gene action was highly significant between parental lines. As part of the general background information for designing a future breeding program, heritability values were estimated for six economic characters: cocoon size (78.0%), cocoon shell weight (90.1%), single cocoon weight (90.0%), cocoon shell percentage (79.3%), pupation rate (87.9%) and cocoon yields (53.0%).

ACKNOWLEDGEMENT

I thank S. M. Alwis and H. N. Wijayagunasekara for their devotion and service in silkworm rearing and data collection; K. K. Weerasekera, Farm Manager of the Silkworm Genetics and Breeding Station, Silk and Allied Products Development Authority, Nilambe, Kandy, Sri Lanka for his maintenance of the mulberry garden and assistance in the daily operation of the experiments. This work was financially and operationally supported by the UNDP, FAO, and the Government of Sri Lanka through the Sericulture Development Project Phase III, SRL/91/012, 1992-1997.

REFERENCES

- DIXON W. J., MASSEY F. J. (1969) Introduction to Statistical Analysis. Third Edition, 638 pp., McGraw-Hill, New York.
- ECONOMICS AND SOCIAL COMMISSION FOR ASIA AND THE PACIFIC (ESCAP) (1993) Principles and Techniques of Silkworm Breeding. 114 pp., United Nations, New York.
- FALCONER D. S. (1960) Introduction to Quantitative Genetics. 365pp., The Ronald Press Company, New York.
- GRIFFING B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci. 9, 463-493.
- LEA H.Z., ALWIS S.M. (1995) Genetic structure of the mulberry silkworm population in Sri Lanka. Korean J. Seric Sci. 37, 10-15.
- MAGARI R., KANG M.S. (1994) Interactive BASIC program for Griffing's diallel analyses. J. Heredity, 85, 336.
- SPRAGUE G. F., TATUM L.A. (1942) General versus specific combining ability in single crosses of corn. J. Am. Soc. Agron., 34, 923-932.

APTITUDE A LA COMBINAISON ET ESTIMATION DE L'HERITABILITE DE SOUCHES SRI LANKAISES DU VER A SOIE DU MURIER, *BOMBYX MORI*

HO ZOO LEA

Department of Biology, Kangwon National University, Chunchon, Corée du Sud, 200-701.

*Les souches bivoltines du ver à soie du mûrier, **Bombyx mori** L., ont été introduites à l'origine dans les années cinquante au Sri Lanka, cependant la caractérisation systématique des caractères quantitatifs n'a commencé que récemment (Lea et Alwis, 1995). L'aptitude à la combinaison et l'héritabilité de six caractères économiques ont été estimées, en utilisant huit souches de lignées pures consanguines et leurs hybrides F1 dans un demi croisement diallélique. La performance des parents consanguins est comprise entre 153 et 205 cg pour le poids d'un cocon (CW), entre 20,2 et 22,7 % pour la richesse soyeuse (S %) et entre 15,6 et 20,8 kg pour les rendements en cocons / 10 000 larves (CY). La performance des hybrides F1 est comprise entre 195 à 230 cg pour CW, entre 19,6 et 25,8 % pour S% et entre 18,5 et 23,3 kg pour CY. D'après la variation de l'aptitude générale (GCA) et spécifique (SCA) à la combinaison et de l'héritabilité (h^2B), l'intensité de l'action des gènes additifs et non-additifs est significative pour l'exploitation ultérieure des ressources génétiques, afin de mettre au point des hybrides supérieurs pour la production de cocons et de soie. Des lignées avec une aptitude générale et spécifique prometteuses ont été détectées pour chacun des six caractères économiques importants pour faciliter les programmes de lignage ultérieurs du ver à soie au Sri Lanka.*

INTRODUCTION

Au début des années 1950, les souches génétiques bivoltines du ver à soie ont d'abord été introduites au Sri Lanka par un groupe religieux, puis par la suite par des projets de développement séricicole variés. Leurs origines géographiques sont limitées aux pays suivants : Chine, Inde, Italie, Japon, Corée, Taïwan et Thaïlande. Au Sri Lanka, comme les systèmes de stockage au froid sont trop instables pour la pratique du stockage à long terme des oeufs de vers à soie bivoltins, les souches de vers à soie sont maintenues par des cycles d'élevage continus pendant toute l'année, avec quatre à cinq générations par an. Par conséquent, on spécule que n'importe quelle souche génétique y subirait un processus de consanguinité plus rapide que dans le pays d'origine. La banque génétique de vers à soie du mûrier au Sri Lanka est constituée de 12 lignées pures pour les gènes marqueurs et de 57 lignées consanguines pour l'obtention d'hybrides pour la production de cocons. De plus, des hybrides nouvellement importés sont exploités afin d'accumuler de nouvelles sources de gènes pour l'amélioration des caractères économiques pour la production de soie. La connaissance des paramètres de base tels que l'aptitude à la combinaison et l'héritabilité est essentielle pour choisir des lignées consanguines parentales prometteuses pour l'amélioration du développement des hybrides. Les deux paramètres sont des outils importants dans l'interprétation des bases génétiques de la population existante (ESCAP, 1993).

Suite à l'étude initiale sur huit consanguins (Lea et Alwis, 1995), 8 autres consanguins ont été employés dans cette recherche pour estimer l'aptitude à la combinaison et l'héritabilité de six caractères économiques importants du cocon, de la larve et de productivité. Pour établir un programme de lignage, des informations fondamentales sont nécessaires sur l'identification des meilleurs

recombinants parmi les souches consanguines et sur l'importance de la variation génétique libérable de la population de base. Les composants de base de n'importe quel pool génique peuvent être sondés par l'estimation de variables aussi importantes que l'aptitude à la combinaison et l'héritabilité des souches génétiques. A travers les composants de l'analyse de variance des performances des hybrides dans les croisements dialléliques ou à moitié dialléliques, un sélectionneur de vers à soie peut obtenir des informations de valeur pour l'amélioration génétique des variétés hybrides avec des caractères quantitatifs importants sur le plan économique (Falconer, 1960 ; Sprague et Tatum, 1942).

MATERIELS ET METHODES

Les valeurs moyennes de performance pour six caractères économiques importants sont d'abord considérées pendant une période de trois ans (1993-1995) pour la sélection fondamentale de lignées parentales pures prometteuses. Selon les règles internes dans la gestion du germoplasme de mûriers, les variétés consanguines sélectionnées sont désignées SN23, SN43, SN44, SN46, SN47, SN48, SN49 et SN52, préfixe *SN* pour Sri Lanka, Nillambe, *Silkworm Genetic and Breeding Station* (SGBS), *Silk and Allied Products Development Authority* (SAPDA). Elles sont croisées sans réciprocité dans une combinaison à moitié diallétique entre les parents, générant 36 génotypes, 28 hybrides F1 et 8 lignées pures parentales.

Des protocoles standard ont été suivis pour les méthodes de manipulation et de traitement, pour les opérations au stade de l'oeuf, pour l'élevage larvaire et la manipulation des chrysalides et des papillons, avec deux répétitions pour chacun des 8 parents et des 28 F1. La priorité a été donnée dans le choix des parents à la supériorité de deux paramètres principaux, la richesse soyeuse et le rendement en cocons. Pendant le mois de mai 1996, les lignées parentales ont été croisées et les oeufs ont été soumis au «traitement immédiat par l'acide». Pour chaque répétition, on a compté 200 larves au premier jour du quatrième âge, qui ont été élevées à SGBS, SAPDA, Nillambe, pendant les mois de mai et juin 1996. Les caractères économiques importants ont été mesurés : taille du cocon (CS, nombre de cocons/litre), poids de la coque (SW, cg), poids d'un cocon (CW, cg), richesse soyeuse (S, %), taux de nymphose (PR, %) et rendements en cocons/10 000 larves (CY, kg). Des méthodes et des techniques standard ont été utilisées pour le recueil et l'analyse des données sur le terrain, d'après les descriptions antérieures (ESCAP, 1993).

L'analyse statistique des valeurs observées est faite exclusivement avec le programme BASIC, sur un ordinateur personnel. Le programme a été mis au point à l'origine par Magari et Kang (1994) pour les analyses dialléliques de Griffing (1954) et m'a été fourni. Dans l'analyse de variance (Tableau II), le composant génétique par rapport à la variation phénotypique totale est calculé avec la formule :

$$s^2_G = \frac{(\sigma^2_E + r\sigma^2_G) - \sigma^2_E}{r}$$

et l'héritabilité (h^2_B) au sens large est calculé avec la formule

$$h^2_B = \frac{\sigma^2_G}{(\sigma^2_E + \sigma^2_G)}$$

où σ^{2E} équivaut à la variance due à l'environnement, σ^2_G est la variance génétique et r est le nombre de répétitions. D'autres interprétations statistiques ont été faites en accord avec le concept de Dixon et Massey (1969).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Performance des parents et de leurs hybrides :

Le tableau I montre la performance moyenne des parents consanguins et de leurs F1. La taille du cocon, mesurée d'après le nombre de cocons dans un volume d'un litre, s'échelonne pour les lignées parentales entre 59/l pour SN48 le plus gros et 98/l pour le plus petit SN23, tandis que pour les hybrides F1 elle est comprise entre 61/l pour le plus gros SN47 × SN48 et 84/l pour le plus petit SN23 × SN46 et trois autres hybrides, avec une valeur moyenne générale de 76/l. Le poids de la coque est compris entre 34 à 47 cg pour les cocons des parents et entre 45 à 55 cg pour les hybrides, la moyenne générale étant de 45 cg/cocon. Le poids de cocon le plus élevé de 205 cg est observé dans la lignée parentale SN48 et le plus léger de 153 cg pour SN52, tandis que celui de l'hybride SN49 × SN52 est de 195 cg, celui de SN23 × SN47 de 243 cg et la valeur moyenne générale est de 209 cg/cocon. La richesse soyeuse des parents est la plus élevée 23,1 % pour SN48 et la plus basse 20,2 pour SN49; pour les hybrides, la plus élevée est de 25,8 % pour SN44 × SN48 et la plus faible de 19,6 pour SN23 × SN49 avec une moyenne générale de 21,7 %. Parmi les huit lignées parentales, le taux de nymphose le plus élevé (95 %) est observé pour SN49 et le plus bas (65 %) chez SN48. Sur 28 génotypes hybrides, le taux de nymphose le plus bas de 77 % est celui de SN23 × SN46 et de SN43 × SN48 et le plus élevé de 99 % est celui de SN47 × SN52 et de trois autres, avec une moyenne générale de 91 %. Les rendements en cocons frais pour 10 000 larves sont compris entre 15,6 à 20,8 kg pour les parents et entre 18,5 et 23,3 kg pour les hybrides, avec un rendement moyen général de 20,5 kg.

2. Estimation de l'aptitude à la combinaison et de l'hérabilité :

Le tableau II présente les résultats de l'analyse de variance pour les caractères quantitatifs étudiés et comprend aussi les estimations d'aptitude à la combinaison générale (GCA) et à la combinaison spécifique (SCA) et de l'hérabilité. Pour tous les caractères examinés, les différences entre les moyennes des 36 génotypes et aussi entre leurs valeurs d'aptitude à la combinaison sont hautement significatives. Pour le composant de variance génotypique, l'effet GCA est plus attribué à l'action de gènes additifs, tandis que l'effet SCA est plus attribué à la dominance non-additive et à l'interaction entre les gènes envers l'expression phénotypique (Falconer, 1960). Dans cette population consanguine à l'étude, les actions des gènes additifs et non-additifs contribuent à la fois de manière significative à la variation existante entre les souches parentales, de sorte que l'on s'attend à ce que la population réponde efficacement aux sélections de « masse » et de « pedigree ». Pour le choix d'une stratégie dans un programme de lignage utilisant de telles lignées pures, il faut un certain degré de fixation de la fréquence du gène avant de poursuivre avec des méthodes de « croisement ». Autrement dit, parmi les lignées parentales étudiées, les fréquences de gènes efficaces pour l'expression de ces caractères économiques ne sont pas encore complètement fixées mais sont toujours en ségrégation, tout en révélant un certain degré d'interaction entre les loci y contribuant.

Dans le tableau III les valeurs GCA et SCA estimées pour les lignées parentales et leurs hybrides sont présentées. Parmi les souches de lignées pures, SN52 présente la GCA la plus élevée de 5,1 et SN48 la plus basse - 11,8 avec une Différence Significative Minimale (LSD) 0,05 = 2,62 pour la taille du cocon. La fourchette de GCA pour le poids de la coque tombe entre - 2,9 et 3,1 avec LSD 0,05 = 0,84. Si l'on a l'intention d'augmenter le poids du cocon, SN52 n'est pas un bon choix en tant que parent puisqu'elle révèle un effet GCA négatif de - 13,9, tandis que SN47 peut servir de bon recombinaut avec une GCA de 8. La richesse soyeuse peut être améliorée avec plus d'efficacité en employant SN52 comme recombinaut général. Les valeurs GCA pour le taux de nymphose sont comprises entre - 5,1 et 2,7. Pour les rendements en cocons, on s'attend à un effet GCA plus faible avec les lignées pures utilisées dans cette étude, pour les lignées parentales il est compris entre - 0,7 et 0,6 avec un LSD 0,5 = 0,75.

Comme l'effet SCA pour la taille du cocon est seulement de - 11,8 dans le croisement hybride entre SN46 et SN49, on s'attend à ce que dans ce croisement la taille moyenne du cocon soit plus importante ou à ce qu'il y ait moins de cocons par litre que ce auquel on peut s'attendre quand seule

l'action du gène additif est prise en compte. Cependant, dans le croisement SN49 × SN48, la taille du cocon de leur F1 est plus petite ou il y a moins de cocons dans un volume d'un litre que ce auquel on peut s'attendre lorsque seules les valeurs moyennes des parents sont prises en compte, donnant ainsi des interactions plus élevées entre les gènes responsables de la détermination de la taille du cocon par comparaison à l'action du gène non-additif dans les combinaisons de croisement. La valeur SCA la plus élevée de 6,8 pour le poids de la coque est obtenue dans le croisement entre SN44 et SN48 et la plus basse - 2 dans l'hybride SN46 × SN47. Pour le poids du cocon individuel, l'hybride SN23 × SN47 révèle l'effet SCA le plus élevé de 22,5, et SN47 × SN43 le plus bas de - 4,0. Les valeurs SCA indiquent que la richesse soyeuse augmente le plus grâce à l'action de gènes non-additifs dans l'hybride SN44 × SN48 avec une valeur SCA de 12,9. Les rendements en cocons exprimés en kilogrammes pour 10 000 larves de vers à soie sont compris entre - 2,4 pour l'hybride SN43 × SN48 et 2,8 pour SN23 × SN43 avec LSD 0,05 = 2,26. Dans les programmes de lignage ultérieurs, les hybrides aux valeurs SCA les plus élevées pourraient être exploités pour le maintien et la dissémination de l'action de gènes non-additifs pour le caractère spécifique étudié.

3. Héritabilité :

Le composant génétique par rapport à la variation phénotypique totale d'un caractère économique peut être exprimé quantitativement en estimant l'héritabilité à une certaine période de l'histoire génétique d'une population consanguine dans des conditions environnementales données. La prédiction de la valeur de lignage d'un génotype pour un caractère quantitatif peut se faire grâce à l'estimation de l'héritabilité et c'est l'une des conditions nécessaires les plus importantes pour décider quelles lignées parentales doivent être choisies dans la création d'une population source à variation ample. La valeur d'héritabilité d'un caractère dépend de facteurs influençant la variation phénotypique totale tels que les contextes génétiques et l'histoire d'une population, le nombre de gènes impliqués dans le caractère, les génotypes utilisés, l'importance des erreurs expérimentales, etc. En général, les populations consanguines homogènes avec un nombre limité d'individus tendent à présenter une héritabilité plus faible, à cause d'une erreur expérimentale plus grande, due à la fluctuation environnementale. On accepte généralement que l'héritabilité d'un caractère donné est seulement valable pour une population donnée dans des conditions expérimentales et génétiques spécifiques.

L'héritabilité au sens large (h^2_B , %) a été estimée comme il apparaît dans le tableau II. L'importance relative du composant génétique était plutôt plus élevée pour chaque caractère que celle à laquelle on pouvait s'attendre, étant donné qu'avec une population de petite taille, on s'attend en général à une héritabilité plus faible. Au Sri Lanka, les variétés souches ont été maintenues par des cycles d'élevage continus, 4 à 5 fois par an. Ainsi, on a déjà émis l'hypothèse que pour chaque locus pour un caractère donné, les souches de lignée pure ont subi une fixation rapide des gènes, en perdant une part considérable d'hétérogénéité à l'intérieur d'une lignée. Pendant de telles périodes de l'histoire d'une population, la part des composants génétiques héréditaires par rapport à la variation phénotypique totale devient en général faible. Cependant, les valeurs élevées pour les estimations de l'héritabilité sont en accord avec l'observation selon laquelle la variance causée par l'action du gène additif est hautement significative entre les lignées parentales. Dans le cadre des informations générales de base pour la conception d'un programme de lignage ultérieur, les valeurs d'héritabilité pour six caractères économiques ont été estimées : taille du cocon (78 %), poids de la coque (90,1 %), poids d'un cocon (90,0 %), richesse soyeuse (79,3 %), taux de nymphose (87,9 %) et rendements en cocons (53 %).

POLYMORPHISMS OF GENOMIC DNA IN PARENTS AND THEIR RESULTING HYBRIDS IN MULBERRY *MORUS*

C.-F. LOU, Y.-Z. ZHANG, J.-M. ZHOU

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029, China.

Polymorphisms of genomic DNAs of five parents and their four resulting hybrids were analysed by means of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Six arbitrary primers revealed abundant polymorphisms. Of the F₁ patterns, most DNA bands produced were the same as those of their respective parents, however, a few were unique not found in their parents, meanwhile, some parental DNA fragments disappeared in their hybrids, thus molecularly demonstrated that hereditary variability occurred in mulberry cross breeding.

Keywords : Hybrid, genomic DNA, RAPD, mulberry.

INTRODUCTION

Employing modern molecular biotechnology to study the phylogenesis and consanguinity relationship in mulberry races and to interpret the genotype differences between mulberry lines at molecular level is very helpful to the researches of classification and genetic evolution, and mulberry breeding as well. With the development of RAPDs (Random Amplified Polymorphism DNAs), it becomes possible to conduct rapid and efficient polymorphism analysis of plant genomic DNAs, in order to analyse the existence of exogenous genes in transgenic plants (John *et al.*, 1991, Chui *et al.*, 1996), the recombination of parental genes (Wang *et al.*, 1996), the identification of offspring-parent and the determination of somatic hybrid (Tanaka *et al.*, 1994, Li *et al.*, 1996) in hybrid rice, the relations of interspecies (Heun *et al.*, 1993, Xian *et al.*, 1995, Cao *et al.*, 1995) and to construct genetic maps (John G. K. W. *et al.*, 1990, Sosinski, B. *et al.*, 1996, Mudge, J. *et al.*, 1996) etc.

Cross breeding, an essential method in mulberry breeding, is a time-consuming and effort demanding work. Its selection basically relies on morphological markers. In order to investigate the possibility of identifying the genotypes on the basis of RAPD markers, and also accumulate basic data for mulberry molecular genetics, polymorphism analysis of the genomic DNAs in F₁ hybrids and their respective parents in mulberry *Morus* were carried out in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Five parents and four hybrids obtained from mulberry germplasm of Sericulture Department, Zhejiang Agricultural University (Tab. I) were used. Genomic DNA were extracted from the top 2-4 leaves in the new shoots according to the recommended method by Lou, *et al.*, 1996.

PCR reaction mixtures (25 µl) contained 35ng genomic DNA, 1µl 4dNTP, 2.5µl 10× buffer, 2.0 µl MgCl₂ (25MMol/l), 1U Taq polymerase, 1µl random primer (16.5 ng/µl).

PCR reaction procedures: After 40 cycles of reaction following the steps below : denaturation 94°C for 60s; annealing 37 °C for 60s; extension 72 °C for 120s, the temperature was maintained at 72 °C for another 5 min. Six primers Q05, Q09, Q11, Q15, Q17 and F13 (Zhejiang Boliang Institutes) of 10 nucleotides in length and of arbitrary sequence for each, were used, and their sequences were Q05:

CCGCGTCTTG, Q09: GGCTAACCGA, Q11:TCTCCGCAAC, Q15: GGGTAACGTG, Q17: GAAGCCCTTG, F13: GGCTGCAGAA respectively. PCR products were electrophoresed through 1.4% agarose gel stained with ethidium bromide and visualised under UV light and the reproducible bands were photographed.

RESULTS AND DISCUSSION

The scorings of the amplification products with primer F13, Q05 and primer Q11, Q09, Q15 were shown in Fig. 1 and Fig. 2 respectively. Distinct and abundant fragments were presented, and a great deal of variation in band number of amplification products were observed when different primers and materials were used, that is the maximum number was 8, the minimum only 2. The largest fragment was about 2500bp, the smallest 200bp in light of molecular weight marker, indicating that the primers used have multi-combining sites in DNA of 200-2500 bp in length. In addition, the DNA polymorphisms of amplification with above described primers showed that certain complementary loci and homology between primer sequences and genomic DNA of the tested materials existed.

Tables II, III, IV alphabetically listed the amplified fragments yielded with 6 primers in size order. The fragments which were shared by the hybrid and both of its parents were defined as basic fragments, those appeared in hybrid and also only one of its parent (male or female) defined as common fragments, the remaining ones as specific fragments.

Table 1. Experimental materials and their species names.

Tableau I. Matériels d'expérimentation et noms d'espèces.

Serial No.	Materials	Species name	Chromosome numbers
No. d'ordre	Matériels	Nom de l'espèce	Nombre de chromosomes
1	Dong 1	<i>M. alba</i> Linn	Unclear / Brouillé
2	Tongxiangqing × Dong1		
3	Tongxiangqing	<i>M. multicaulis</i> perr	2n = 28
4	Tongxiangqing × Yu237		
5	Yu237	<i>M. alba</i> Linn	2n = 28
6	Husang96 × Yu237		
7	Husang96	<i>M. multicaulis</i> perr	2n = 28
8	Husang96 × Sinichinose		
9	Sinichinose	<i>M. alba</i> Linn	2n = 28

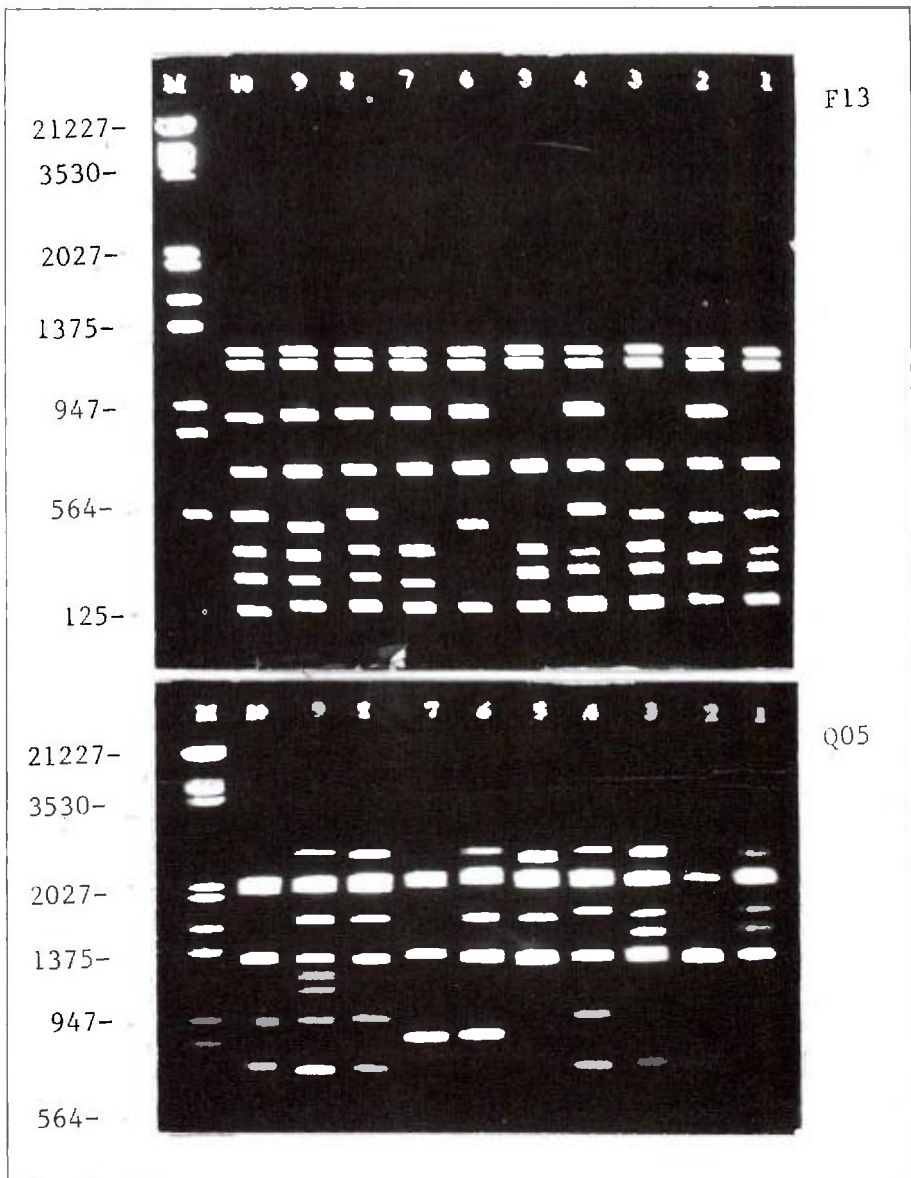


Fig. 1. RAPD fingerprints obtained with primer F13 (upper) and Q05 (lower).
 Fig1. Empreintes RAPD obtenues avec l'amorce F13 (supérieure) et Q05 (inférieure).

1. Dong1, 2. Tongxiangqing × Dong1, 3. Tongxiangqing × Yu237, 4. Tongxiangqing × Yu237, 5. Yu237, 6. Husang 96 × Sinichinose, 7. Husang 96, 8. Husang 96 × Yu237, 9. Sinichinose, 10. Sinichinose, M. Lambda DNA/EcoR I + Hind III.

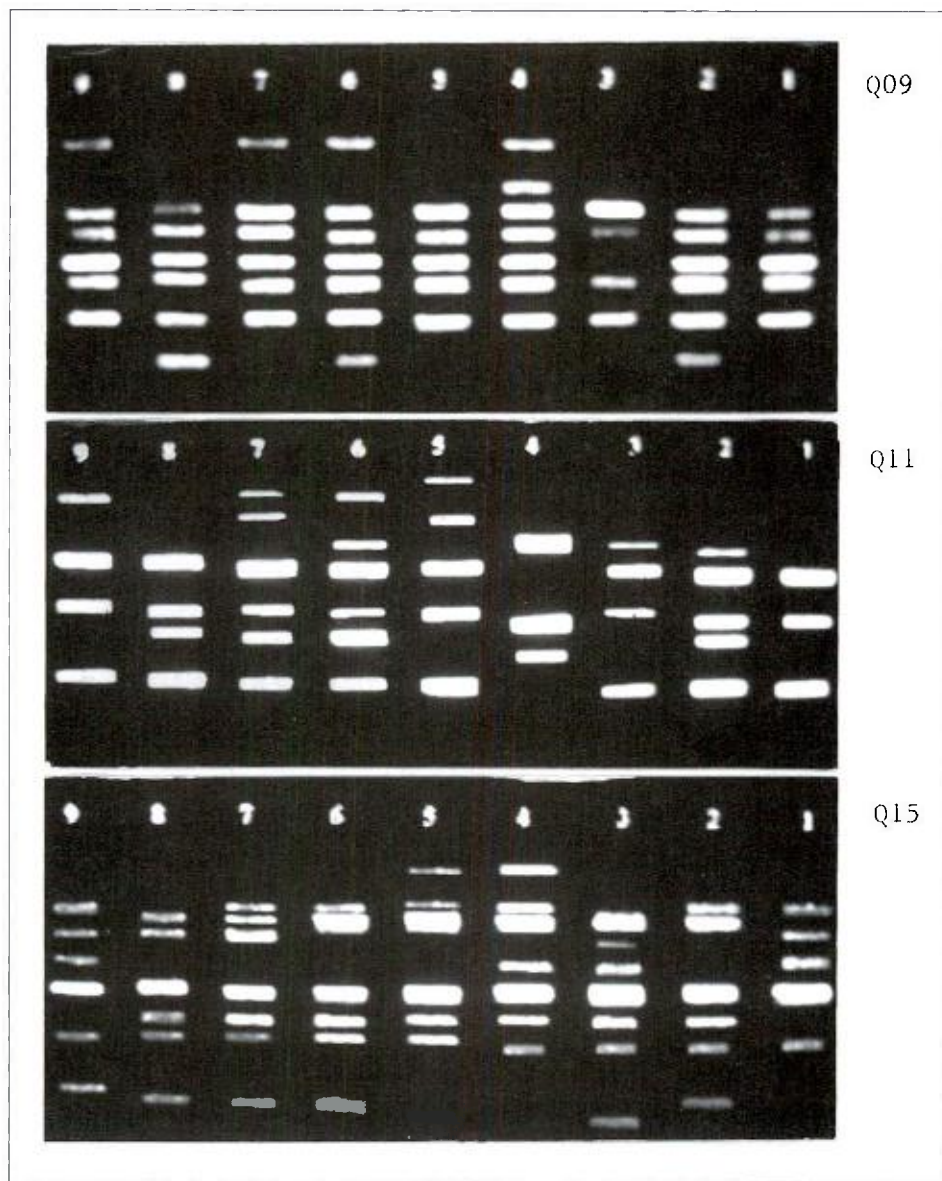


Fig. 2. RAPD fingerprints obtained with primer Q₀₉ (upper), Q₁₁ (middle), Q₁₅ (lower).

Fig. 2. Empreintes RAPD obtenues avec l'amorce Q₀₉ (supérieure), Q₁₁ (milieu), Q₁₅ (inférieure).

1. Dong1, 2. Tongxiangqing × Dong1, 3. Tongxiangqing 4. Tongxiangqing × Yu237, 5. Yu237, 6. Husang96 × Sinichinose, 7. Husang96, 8. Husang96 × Yu237, 8. Husang 96 × Sinichinose, 9. Sinichinose

Table II. Comparative DNA polymorphisms of genomic DNA amplification with primer Q05 and F13.

Tableau II. Polymorphismes comparatifs de l'amplification de l'ADN génomique avec les amorces Q05 et F13.

Primer	Serial no.	Materials	Number of amplified fragments	Basic fragments	Common fragments	Specific fragments
Amorce	No. d'ordre	Matériels	Nombre de fragments amplifiés	Fragments de base	Fragment communs	Fragments spécifiques
Q05	1	Dong1	5	b, e		a, c, d
	2	Tongxiangqing × Dong1	2	b, c		
	3	Tongxiangqing	6	b, e		a, c, d, j
	3	Tongxiangqing	6	a, b, c, e	j	d
	4	Tongxiangqing × Yu237	6	a, b, c, e	j	h
	5	Yu237	4	a, b, c, e		
	5	Yu237	4	b, e	a, c,	
	6	Husang96 × Yu237	5	b, e	a, c, i	
	7	Husang96	3	b, e	i	
F13	7	Husang96	3	b, e		i
	8	Husang96 × Sinichinose	6	b, e	a, c, h, j	
	9	Sinichinose	8	b, e	a, c, h, j	f, g
	1	Dong1	7	a, b, d, f, j		g, i
	2	Tongxiangqing × Dong1	7	a, b, d, f, j	h	e
	3	Tongxiangqing	7	a, b, d, f, j	h	g
	3	Tongxiangqing	7	a, b, d, g, h, j		f
	4	Tongxiangqing × Yu237	8	a, b, d, g, h, j		c, e
	5	Yu237	6	a, b, d, g, h, j		
	5	Yu237	6	a, b, d, j		g, h
	6	Husang96 × Yu237	6	a, b, d, j	c	f
	7	Husang96	7	a, b, d, j	c	g, i
	7	Husang No. 96	7	a, b, c, d, g, i, j		
	8	Husang96 × Sinichinose	8	a, b, c, d, g, i, j		e
	9	Sinichinose	8	a, b, c, d, g, i, j		f

Table II showed that the amplified fragments obtained with the primer Q05 were relatively fewer, the only specific fragment was 'h' of Tongxiangqing × Yu237, all other fragments of four hybrids were the same as those of their respective parents, some specific fragments of parents, however, disappeared in their resulting hybrids, such as fragment 'd' and 'g'. Contrarily, primer F13 presented abundant genomic DNA bands, and had produced more basic fragments, all four hybrids had their own specific DNA fragments, such as fragment 'c', 'e' and 'f', which demonstrated that cross breeding has resulted in genetic variation at DNA level in mulberry.

Table III. Comparative DNA polymorphisms of genomic DNA amplification with primer Q11 and Q15.*Tableau III. Polymorphismes comparatifs de l'amplification de l'ADN génomique avec les amorces Q11 et Q15.*

Primer	Serial no.	Materials	Number of amplified fragments	Basic fragments	Common fragments	Specific fragments
<i>Amorce</i>	<i>No. d'ordre</i>	<i>Matériels</i>	<i>Nombre de fragments amplifiés</i>	<i>Fragments de base</i>	<i>Fragments communs</i>	<i>Fragments spécifiques</i>
Q11	1	Dong1	3	e, f, i		
	2	Tongxiangqing × Dong1	5	e, f, i	d	g
	3	Tongxiangqing	4	e, f, i	d	
	3	Tongxiangqing	4	f	d	e, i
	4	Tongxiangqing × Yu237	3	f	d	h
	5	Yu237	5	f		a, c, e, i
	5	Yu237	5	e, f, i		a, c
	6	Husang96 × Yu237	6	e, f, i	b, g	d
	7	Husang96	6	e, f, i	b, g	c
Q15	7	Husang96	6	e, f, i	g	b, c
	8	Husang96 × Sinichinose	4	e, f, i	g	
	9	Sinichinose	4	e, f, i	b	a
	1	Dong1	5	f, h	b, c, g	d, e
	2	Tongxiangqing × Dong1	6	f, h	c, g	i
	3	Tongxiangqing	7	f, h	e	d, e, j
	3	Tongxiangqing	7	c, f, g, h	a, b, c	d, j
	4	Tongxiangqing × Yu237	7	c, f, g, h	a, b	
	5	Yu237	7	c, f, g, h		j
	5	Yu237	7	b, c, f, g, h, j		a
	6	Husang96 × Yu237	6	b, c, f, g, h, j		
	7	Husang96	7	b, c, f, g, h, j		d
	7	Husang96	7	d, f, h, j	c, g	b
	8	Husang96 × Sinichinose	6	d, f, h, j	c, g	
	9	Sinichinose	6	d, f, h, j		b, c

Table III illustrated the comparative polymorphisms of RAPD with primer Q11 and Q15. Among the amplification products of four hybrids, most were derived from their respective parents, a few from their male parent or female parent, while three hybrids Tongxiangqing × Dong1, Tongxiangqing × Yu237, Husang96 × Yu237 presented one specific fragment respectively.

Table IV. Comparative DNA polymorphisms of genomic DNA amplification with primers Q09 and Q17.*Tableau IV. Polymorphismes comparatifs de l'amplification d'ADN génomique avec les amorces Q09 et Q17.*

Primer	Serial No.	Materials	Number of amplified fragments	Basic fragments	Common fragments	Specific fragments
<i>Amorce</i>	<i>No. d'ordre</i>	<i>Matériels</i>	<i>Nombre de fragments amplifiés</i>	<i>Fragments de base</i>	<i>Fragments communs</i>	<i>Fragments spécifiques</i>
Q09	1	Dong1	5	c, d, f, g	e	
	2	Tongxiangqing × Dong1	6	c, d, f, g	e	h
	3	Tongxiangqing	4	c, d, f, g		
	3	Tongxiangqing	4	c, d, f, g		
	4	Tongxiangqing × Yu237	7	c, d, f, g	e	a, b
	5	Yu237	5	c, d, f, g	e	
	5	Yu237	5	c, d, e, f, g		
	6	Husang96 × Yu237	7	c, d, e, f, g	a	h
	7	Husang96	6	c, d, e, f, g	a	
Q17	7	Husang96	6	c, d, e, f, g		a
	8	Husang96 × Sinichinose	6	c, d, e, f, g		h
	9	Sinichinose	6	c, d, e, f, g		a
	1	Dong1	6	c, f, g, i	a, e	
	2	Tongxiangqing × Dong1	8	c, f, g, i	a, b, e	d
	3	Tongxiangqing	6	c, f, g, i	h	h
	3	Tongxiangqing	6	b, c, g, i	f	h
	4	Tongxiangqing × Yu237	7	b, c, g, i	a, d, f	
	5	Yu237	7	b, c, g, i	a, d	h
	5	Yu237	7	a, b, c, g, i	h	d
	6	Husang96 × Yu237	8	a, b, c, g, i	e, f, h	
	7	Husang96	7	a, b, c, g, i	e, f	
	7	Husang96	7	a, b, c, f, g, i		e
	8	Husang96 × Sinichinose	8	a, b, c, f, g, i	d	h
	9	Sinichinose	7	a, b, c, f, g, i	d	

As for the RAPD products obtained with Q09, abundant basic fragments were observed, and every hybrid showed its own specific fragments, such as fragment 'a', 'b' and 'h' (table IV). Similarly the amplification products obtained with primer Q17 also presented abundant basic fragments and common fragments, however, specific fragments only appeared in hybrid Tongxiangqing × Dong 1 and Husang96 × Sinichinose respectively, which were 'd' and 'g'.

The fingerprints of genomic DNA described above indicated that DNA fragments inserting and deleting in the corresponding region of hybrid genomes did have taken place, which led to similarity

and variability between parents and their off-springs. However, the number of common fragments and specific fragments of parent off-spring yielded with one primer was quite different, depending on hybrid combinations, which is probably related to the unequal contribution of parental genetic substances in the process of fertilisation, different speed of DNA replication, complementary loci formed after genomic recombination etc. Moreover, the differences of RAPDs obtained in the same hybrid with different primers is probably related to the degree of homology between primer sequences and genomic DNA. Therefore, primers of high homology and rich complementary loci with genomic DNA should be screened.

Wang (1994) and Tanaka (1994) considered that RAPDs was a simple method of high efficiency, after they had analysed the parent-offspring relationship in hybrid rice and tea with RAPD fingerprints respectively. Judge (1996) developed a genetic linkage map by means of RAPD single-dose markers with 84 F₁ progenies in sugarcane *Saccharum officinarum*. Among 279 single-dose markers identified from initial screening with 1840 primers, 161 markers were linked in 50 linkage groups, which indicated that RAPD markers helps marker-assisted selection in breeding. Ko *et al.*, (1996) considered that RAPD was a useful tool for establishing genetic diversity in plant when they had made an assessment to determine the suitability of RAPD analysis for identification of the Australian wildflower. Therefore, RAPD analysis can molecularly interpret the genomic DNA differences of breeding materials, and may become an important basis for cross breeding selection in crops. The result obtained in the present experiment that mulberry parents and their resulting hybrids had abundant DNA polymorphisms suggests that it is possible for fingerprints of genomic DNA to guide mulberry breeding and to be applied in basic researches of mulberry genetics. As for the hereditary distance between mulberry hybrids and their parents and the relationships among specific fragments and biocharacters they will be studied in further experiments.

REFERENCES

- CAO J.-S., CAO S.-C., YI Q.-M (1995) RAPD analysis on genomic DNA of Chinese cabbage and the other groups of Brassica. *ACTA Horticulture sinica*, 22(1), 47-52.
- JOHN D.H., STEVEN R., ANDREW S., GORDON T., MICHAEL J. C. R. (1991) The use of polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Reports*, 10, 221-224.
- JOHN G. K. W., ANNE R. K., KENNETH J. L., RAFALSKI J. A., SCOTT V. T. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 22, 6531-6535.
- KO H. L., HENRY R. J., BEAL P. R., MOISANDER J. A., FISHER K. A. (1996) Distinction of *Ozothamnus diosmifolius* (Vent.) DC genotypes using RAPD. *Hortscience*, 31(5):858-861.
- LI W.-B., LIANG H.-J., SUN Y.-R., YAN Q.-S., ZHANG X.-Q., TENG S. (1996) Identification of somatic hybrids between rice cultivar and wild oryza species by RAPD. *Chinese Journal of Biotechnology*, 12(4), 390-393.
- LOU C.-F., ZHANG Y.-Z., ZHOU J.-M., (1996) Studies on RAPD in mulberry. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, China, 22(2), 149-151.
- MUDGE J., RNDERSEN W. R., KEHRER R. L., FAIRGANDS D. J. (1996) A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Science*, 36, 1362-1366.
- SOSINSKI B., DOUCHES D. S. (1996) Using polymerase chain reaction-based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars. *Hortscience* 31(1): 130-133.
- TANAKA J. (1994) Identification of offspring-parent with RAPD marker in Tea. *Tea Research Report*, Japan, 79, 390-393.
- WANG G.-J., STEFANO C., ZHANG J., FU R.-Z., MA J.-S., LI W.-B., SUN Y.-R., FRANCESCOS (1994) Hybrid rice: identification and parentage determination by RAPD fingerprinting. *Plant Cell Research*, 14, 112-115.
- XIANG Z.-H., ZHANG X.-Y., YUM-D., KEY.-F. (1995) A preliminary report on the application of RAPD in systematics of *Morus* L. *Science of Sericulture*, China, 21(4), 203-207.

- ZHAI W. -X., LU C.-F, YANG W.-C., ZHAO K.-J. (1996) PCR analysis of half-seeds of cereal crops and its application in marker-assisted selection and breeding. Chinese Journal of Biotechnology, 12(4), 416-421.
- ZHEN X. L., REIGHARD G. L., BAIRD W. V., ABBOTT A. G., RAJAPAKSE S. (1996) Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers, Hortscience, 31(1):127-129.

POLYMORPHISMES DE L'ADN GENOMIQUE DES PARENTS ET DE LEURS HYBRIDES CHEZ LE MURIER

C.-F. LOU, Y.-Z. ZHANG, J.-M. ZHOU

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

Les polymorphismes des ADN génomiques de cinq parents et quatre de leurs hybrides ont été analysés au moyen de l'ADN polymorphique amplifié de manière aléatoire (RAPD). Six amorces (primers) arbitraires révèlent des polymorphismes abondants. Pour les diagrammes F₁, la plupart des bandes d'ADN produites sont les mêmes que celles des parents respectifs, cependant, certaines sont uniques et n'existent pas chez les parents, de même que certains fragments d'ADN parentaux disparaissent chez leurs hybrides, ce qui prouve sur le plan moléculaire que la variabilité héréditaire existe dans le croisement du mûrier.

INTRODUCTION

L'emploi de la biotechnologie moléculaire moderne pour étudier la relation phylogénétique et la consanguinité dans les variétés de mûrier et pour interpréter les différences de génotype entre les lignées de mûrier au niveau moléculaire est très utile pour les recherches de classification et d'évolution génétique, et aussi pour le lignage du mûrier. Avec le développement des RAPD (ADN polymorphique amplifié aléatoire), il devient possible de réaliser une analyse de polymorphisme rapide et efficace des ADN génomiques de la plante, d'analyser l'existence de gènes exogènes dans les plantes transgéniques (John et coll., 1991, Chui et coll., 1996), la recombinaison des gènes parentaux (Wang et coll., 1996), l'identification du parent de la descendance et la détermination d'hybride somatique chez le riz hybride (Tanaka et coll., 1994, Li et coll., 1996), les relations inter-espèces (Heun et coll., 1993, Xian et coll., 1995, Cao et coll., 1995) et de construire des cartes génétiques (John G.K.W. et coll., 1990, Sosinski B. et coll., 1996, Mudge J. et coll., 1996) etc.

Le croisement, une méthode essentielle de lignage du mûrier, est un travail long et prenant. Sa sélection au fond dépend des marqueurs morphologiques. On a procédé dans cette étude à l'analyse du polymorphisme chez le mûrier *Morus* des ADN génomiques chez les hybrides F₁ et chez leurs parents respectifs de manière à examiner la possibilité d'identifier les génotypes sur la base des marqueurs RAPD et à rassembler des informations de base pour la génétique moléculaire du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Cinq parents et quatre hybrides obtenus auprès de la banque génétique du mûrier du *Sericulture Department, Zhejiang Agricultural University* (Tableau 1) ont été utilisés. Les ADN génomiques ont été extraits dans 2 à 4 feuilles supérieures de nouvelles pousses d'après la méthode recommandée par Lou et coll., 1996.

Les mélanges de réaction PCR (25 µl) contiennent 35 ng d'ADN génomique, 1 µl des 4dNTP, 2,5 µl de tampon × 10, 2 µl MgCl₂ (25mMol/l), 1 U polymérase de Taq, 1 µl amorce aléatoire (16,5 ng/µl).

Les procédures de réaction PCR sont les suivantes : après 40 cycles de réaction suivant les étapes ci-après : dénaturation à 94 ° C pendant 60 secondes ; annealing à 37 ° C pendant 60 secondes ;

allongement à 72 ° C pendant 120 secondes, la température est maintenue à 72 ° C pendant 5 minutes de plus. Six amorces Q05, Q09, Q11, Q15, Q17 et F13 (*Zhejiang Boliang Institutes*) de 10 nucléotides de longueur et de séquence arbitraire, sont utilisés. Leurs séquences sont Q05 : CCGCGTCTTG, Q09 : GGCTAACCGA, Q11 : TCTCCGCAAC, Q15 : GGGTAACGTG, Q17 : GAAGCCCTTG, F13 : GGCTGCAGAA. Les produits PCR sont soumis à électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,4 % coloré avec du bromure d'éthidium et visualisés sous lumière UV et les bandes reproductibles sont photographiées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des produits d'amplification avec les amorces F13, Q05 et les amorces Q11, Q09, Q15 sont présentés sur la fig. 1 et la fig. 2 respectivement. Des fragments distincts et abondants sont présentés, et un grand nombre de variations du nombre de bandes des produits d'amplification est observé quand différentes amorces et matériels sont utilisés, c'est à dire que le nombre maximum est de 8 et le nombre minimum de 2 seulement. Le fragment le plus grand est d'environ 2500 pb, le plus petit de 200pb à la lumière du marqueur de poids moléculaire, ce qui indique que les amorces utilisées ont des sites multi-combinés dans l'ADN de 200-2500 pb de longueur. De plus, les polymorphismes d'amplification de l'ADN avec les amorces décrites ci-dessus montrent qu'il existe certains loci complémentaires et une homologie entre les séquences des amorces et l'ADN génomique des matériels testés.

Les tableaux II, III, IV donnent la liste dans l'ordre alphabétique des fragments amplifiés obtenus avec 6 amorces dans l'ordre de taille. Les fragments qui sont partagés par l'hybride et ses deux parents sont définis comme des fragments de base, ceux qui apparaissent dans l'hybride et aussi dans un seul des parents (mâle ou femelle) sont définis comme fragments communs, ceux qui restent comme fragments spécifiques.

Le tableau II montre que les fragments amplifiés obtenus avec l'amorce Q05 sont relativement moins nombreux, le seul fragment spécifique est « h » de Tongxiangqing × Yu237, tous les autres fragments des quatre hybrides sont les mêmes que ceux de leurs parents respectifs, certains fragments spécifiques des parents, cependant, disparaissent chez leurs hybrides, tels que les fragments « d » et « g ». A l'opposé, l'amorce F13 présente des bandes d'ADN génomique importantes, et produit plus de fragments de base, les quatre hybrides ayant leur propres fragments d'ADN spécifiques, tels que les fragments « c », « e » et « f », ce qui prouve que le croisement entraîne une variation génétique au niveau de l'ADN chez le murier.

Le tableau III illustre les polymorphismes comparatifs de RAPD avec les amorces Q11 et Q15. Parmi les produits d'amplification des quatre hybrides, la plupart dérivent de leurs parents respectifs, quelques uns du parent mâle ou du parent femelle, tandis que trois hybrides Tongxiangqing × Dong1, Tongxiangqing × Yu237, Husang96 × Yu237 présentent respectivement un fragment spécifique.

Pour ce qui est des produits RAPD obtenus avec Q09, de nombreux fragments de base sont observés, et chaque hybride présente ses propres fragments spécifiques, tels que les fragments « a », « b » et « h » (tableau IV). De même, les produits amplifiés obtenus avec l'amorce Q17 présentent aussi de nombreux fragments de base et des fragments communs, cependant, les fragments spécifiques apparaissent seulement dans les hybrides Tongxiangqing × Dong1 et Husang96 × Sinichose qui sont respectivement « d » et « g ».

Les empreintes d'ADN génomique décrites plus haut indiquent qu'il s'est produit des insertions et des délétions des fragments d'ADN dans la région correspondante des génomes des hybrides, ce qui entraîne une similarité et une variabilité entre les parents et leur descendance. Cependant, le nombre de fragments communs et de fragments spécifiques de la descendance des parents à partir d'une amorce est assez différent, en fonction des combinaisons d'hybrides, ce qui est sûrement lié à la contribution inégale des substances parentales génétiques pendant le processus de fécondation, à une vitesse différente de répllication de l'ADN, à des loci complémentaires se formant après la recombinaison génomique, etc... De plus, les différences de RAPD obtenues pour le même hybride

avec différentes amorces sont probablement dues au degré d'homologie entre les séquences des amorces et l'ADN génomique. Ainsi, il faudrait trier les amorces à homologie élevée et les loci complémentaires riches avec de l'ADN génomique.

Wang (1994) et Tanaka (1994) estiment que la RAPD est une méthode simple d'une efficacité élevée, après leur analyse de la relation parent-descendance respectivement chez le riz et le thé hybrides avec les empreintes RAPD. Judge (1996) a mis au point une carte de liaison génétique au moyen de marqueurs RAPD uniques avec 84 descendances F1 chez la canne à sucre *Saccharum officinarum*. Parmi les 279 marqueurs uniques identifiés à partir du criblage initial avec 1840 amorces, 161 marqueurs ont été liés à 50 groupes de liaison, ce qui indique que les marqueurs RAPD sont utiles pour la sélection assistée par marqueur dans le lignage. Ko et coll., (1996) considèrent que la RAPD est un outil utile pour établir la diversité génétique des plantes, après leur évaluation pour déterminer si l'analyse RAPD convenait à l'identification de fleurs sauvages australiennes. Ainsi, l'analyse RAPD permet d'interpréter sur le plan moléculaire les différences d'ADN génomique dans les matériels de lignage, et pourrait servir de base pour la sélection des croisements dans les cultures. Les résultats obtenus dans cette expérience, à savoir que chez le mûrier les parents et leurs hybrides ont des polymorphismes d'ADN importants suggèrent que les empreintes d'ADN génomique pourraient guider le lignage du mûrier et être utilisées pour des recherches de base en génétique du mûrier. Pour ce qui est de la distance héréditaire entre les hybrides du mûrier et leurs parents et des relations entre les fragments spécifiques et les bio-caractères, elles seront étudiées dans des expériences ultérieures.

SEASONAL STUDIES ON THE PERFORMANCE OF THE NEW MULTIVOLTINE BREED MU953 IN THE TROPICS

G. V. KALPANA* & G. SREERAMA REDDY

Sericultural Section, Department of Studies in Zoology, Manasa Gangotri, Mysore, India.

Seasonal performance of silkworm races is of vital importance in understanding the combined action of hereditary potential of its population and the extent to which such potential is permitted to express in the environment to which they are exposed. The concept of genotype and environment interactions has been well documented in several species of plants and animals. Hence, in the present study, an attempt has been made to analyse the seasonal performance of the new multivoltine breed MU953 evolved by conventional breeding and its adaptability to the fluctuating climatic conditions of the tropics. It is found that the new multivoltine breed MU953 has exhibited better performance over the traditional multivoltine races i.e. Pure Mysore and C. nichii in all the three seasons (pre-monsoon, monsoon and post-monsoon) of the year. The adaptability of the new breed to the fluctuating climatic conditions of tropical climate is discussed.

Keywords: Seasonal performance, genotype and environment interactions, adaptability.

INTRODUCTION

Silkworm races evolved under different conditions react differently to external environmental conditions such as temperature, relative humidity, air, light, food and pathogens influencing the physiological activities affecting their growth and development as well as the expression of economic traits. As a result, the quality and quantity of silk produced is not only dependent on the genetic potential of silkworm races but also on the climatic conditions in which they are reared.

Down through the history of sericulture, incessant efforts have been made by silkworm breeders to synthesise improved races with high productivity merit. Realising the importance of environmental conditions, Japanese breeders have successfully developed silkworm races suitable to different environmental conditions prevailing in different seasons of the year. However, efforts to synthesise silkworm breeds suitable to different seasons in tropical environments have met with little success. Therefore an attempt is made to understand the genetic response of the isolated multivoltine breed MU953 by rearing it in different seasons of the year along with the traditional multivoltine races i.e. Pure Mysore and C. nichii to evaluate their stability for the expression of commercial characters.

MATERIALS AND METHODS

The multivoltine breed MU953 spinning white dumb-bell cocoons isolated by conventional breeding along with the traditional multivoltine races namely Pure Mysore spinning spindle shaped yellow cocoons and C. nichii spinning white dumb-bell cocoons form the material for the study.

All the three races were reared in replicates of three each in the pre-monsoon season (March-May) characterised by a high temperature, low humidity and no rainfall, in the monsoon season

* Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore, India.

(June-October) characterised by moderate temperature, low humidity and moderate to heavy rainfall and in the post-monsoon season (Nov.-Feb.) characterised by low temperature, low humidity and no rainfall.

The rearing performance of the new and traditional multivoltine races was studied in three different seasons of the year with respect to the expression of nine quantitative traits i.e. fecundity, hatching percentage, larval duration, pupation rate, cocoon yield by number and cocoon yield by weight for 10,000 larvae, cocoon weight, shell weight and cocoon shell percentage. The results obtained are subjected to a statistical model of two way classification.

$$y_{ij} = u + R_i + S_j + (RS)_{ij} + e_{ij}$$

where,

y_{ij} = Effect of i^{th} race in the j^{th} season

u = Constant effect

R_i = Effect of i^{th} race

S_j = Effect of j^{th} season

$(RS)_{ij}$ = Interaction effect of i^{th} race and j^{th} season

e_{ij} = Random component effect.

RESULTS

The data pertaining to the nine quantitative traits of the new multivoltine breed MU953 along with the traditional multivoltine races Pure Mysore and *C. nichii* in different seasons of the year are pooled in the tables I to III. While, the analysis of variance (Anova) results for the nine metric traits for all the races under study in three different seasons are presented in tables IV to VI.

Table I. Mean values of nine economic traits of MU953, Pure Mysore and *C. nichii* in pre-monsoon season.

Tableau I. Valeurs moyennes pour neuf traits économiques chez MU953, Pure Mysore et C. nichii pendant la saison précédant la mousson.

Characters / Caractères	Races		
	MU953	Pure Mysore	C. nichii
Fecundity / Fécondité	483.33	463.33	445.00
Hatching percentage / Pourcentage d'éclosion	97.37	97.28	95.65
Larval duration / Durée larvaire	500.66	613.00	481.00
Pupation rate / Taux de pupaison	93.22	88.09	90.32
Cocoon yield / 10,000 larvae by number	9246.66	8855.00	9153.33
Rendement en cocons / 10 000 larves en nombre			
Cocoon yield/ 10,000 larvae by weight	13.31	7.46	9.24
Rendement en cocons / 10 000 larves en poids			
SCW	1.439	0.861	1.048
SSW	0.236	0.118	0.120
SR%	16.32	13.77	11.50

SCW: Single cocoon weight / Poids d'un cocon. SSW: Single shell weight / Poids d'une coque. SR %: Shell ratio percentage / Richesse soyeuse.

Table II. Mean values of nine economic traits of MU953, Pure Mysore and C. nichii in the monsoon season.

Tableau II. Valeurs moyennes pour neuf traits économiques chez MU953, Pure Mysore et C. nichii pendant la saison de la mousson.

Characters / Caractères	Races		
	MU953	Pure Mysore	C. nichii
Fecundity / Fécondité	464.33	462.00	471.66
Hatching percentage / Pourcentage d'éclosion	97.71	96.55	96.89
Larval duration / Durée larvaire	516.00	664.33	507.00
Pupation rate / Taux de pupaison	93.68	88.81	93.19
Cocoon yield / 10,000 larvae by number	9336.66	8927.66	8921.66
Rendement en cocons / 10,000 larves en nombre			
Cocoon yield/10,000 larvae by weight	12.25	8.76	10.23
Rendement en cocons/10 000 larves en poids			
SCW	1.312	0.985	1.119
SSW	0.202	0.135	0.125
SR %	15.43	13.69	11.27

Table III. Mean values of nine economic traits of MU953, Pure Mysore and C. nichii in the post-monsoon season.

Tableau III. Valeurs moyennes pour neuf traits économiques chez MU953, Pure Mysore et C. nichii pendant la saison de la post-mousson.

Characters / Caractères	Races		
	MU953	Pure Mysore	C. nichii
Fecundity / Fécondité	475.66	494.00	446.00
Hatching percentage / Pourcentage d'éclosion	97.88	94.56	97.38
Larval duration / Durée larvaire	529.33	740.33	527.33
Pupation rate / Taux de pupaison	93.06	86.63	92.32
Cocoon yield/10,000 larvae by number	9243.33	8888.33	9246.66
Rendement en cocons / 10 000 larves en nombre			
Cocoon yield/10,000 larvae by weight	12.27	8.68	9.49
Rendement en cocons / 10 000 larves en poids			
SCW	1.323	0.979	1.064
SSW	0.207	0.136	0.119
SR%	15.64	13.91	11.19

SCW: Single cocoon weight / Poids d'un cocon. SSW: Single shell weight / Poids d'une coque. SR %: Shell ratio percentage / Richesse soyeuse.

Table IV. Anova results for fecundity, hatching percentage, larval duration of three different races in three different seasons.*Tableau IV. Résultats d'analyse de variance pour la fécondité, le taux d'éclosion, la durée larvaire chez trois races différentes pendant trois saisons différentes.*

Sources of variation	df	SS	MS	F-ratio	SE	CD at 5%
<i>Sources de variation</i>						
1. Fecundity / Fécondité						
Races	2	2302.52	1151.25	6.918**	4.299	6.081
Seasons / Saisons	2	309.41	154.71	0.929NS	4.299	6.081
Races × seasons / Races × saisons	4	3575.93	893.98	5.372	7.447	10.5327
Error / Ecart	18	2995.33	166.41	-	-	-
2. Hatching percentage / Pourcentage d'éclosion						
Races	2	10.78	5.39	3.277**	0.427	0.604
Seasons / Saisons	2	0.90	0.45	0.272	0.427	0.604
Races × seasons / Races × saisons	4	16.15	4.04	2.456	0.740	1.046
Error / Ecart	18	29.57	1.64	-	-	-
3. Larval duration / Durée larvaire						
Races	2	192716.22	96358.11	30.21**	18.83	26.62
Seasons / Saisons	2	24100.22	12050.11	3.77NS	18.83	26.62
Races × seasons / Races × saisons	4	30328.88	7582.88	2.37NS	32.61	46.11
Error / Ecart	18	57411.33	3189.52	-	-	-

** Significant ($P < 0.01$) / *Significatif ($P < 0.01$)*. NS: Not significant / *Non significatif*. df: degree of freedom / *degré de liberté*. SS: Sum of squares / *Somme des carrés*. MS: Mean sum of squares / *Moyenne de la somme des carrés*. SE: Standard error / *Ecart type*. CD: Critical difference / *Différence critique*.

The mean values obtained for the nine metric traits revealed that the isolated breed MU953 revealed the highest values in all the three seasons followed by C. nichii and pure Mysore (Tables I to III).

Analysis of variance computed to study the mean of the nine metric traits in three different seasons revealed significant ($P < 0.01$) variations among races for all the nine metric traits (Tables IV-VI). While, insignificant ($P > 0.01$) seasonal variations were observed for all the metric traits except for cocoon yield/number in different races (Table IV-VI). The interaction between races and seasons was noticed to be significant ($P < 0.01$) for the traits cocoon yield by number, cocoon yield by weight, cocoon weight and shell weight (Tables IV-VI).

Table V. Anova results for pupation rate, cocoon yield/number, cocoon yield/weight in three different races in three different seasons.*Tableau V. Résultats ANOVA pour le taux de pupaison, le rendement en cocons/nombre, le rendement en cocon en poids chez trois races différentes pendant trois saisons différentes.*

Sources of variation	df	SS	MS	F-ratio	SE	CD at 5%
<i>Sources de variation</i>						
4. Pupation rate / Taux de pupaison						
Races	2	146.14	73.07	52.89**	0.39	0.554
Seasons / Saisons	2	10.10	5.05	3.66	0.39	0.554
Races × seasons / Races × saisons	4	11.03	2.76	1.99	0.68	0.959
Error / Ecart	18	24.87	1.38	-	-	-
5. Cocoon yield/number / Rendement en cocons en nombre						
Races	2	752828.78	376414.04	28.18**	38.52	54.48
Seasons / Saisons	2	133432.52	66716.26	4.99**	38.52	54.48
Races × seasons / Races × saisons	4	69367.26	17341.81	1.30NS	66.72	94.36
Error / Ecart	18	240399.33	13355.52	-	-	-
6. Cocoon yield/weight / Rendement en cocons en poids						
Races	2	87.39	43.69	176.31**	0.165	0.234
Seasons / Saisons	2	0.81	0.40	1.616NS	0.165	0.234
Races × seasons / Races × saisons	4	6.19	1.55	6.246**	0.287	0.406
Error / Ecart	18	4.46	0.25	-	-	-

** Significant ($P < 0.01$) / *Significatif*. NS: Not significant / *Non significatif*. df: degree of freedom / *degré de liberté*. SS: Sum of squares / *Somme des carrés*. MS: Mean sum of squares / *Moyenne de la somme des carrés*. SE: Standard error / *Ecart type*. CD: Critical difference / *Différence critique*.

DISCUSSION

The performance of a race or a breed is mainly dependent on the combined action of hereditary potential of its population and the extent to which such potential is permitted to express in the environment to which they are exposed. The concept of genotype and environment interaction has been well documented in both plants and animal species (Griffing and Zsioros, 1971; Orozco, 1976). It was Harada (1961) who demonstrated a high degree of phenotypic variability with regard to various economic traits in the silkworm during different seasons of the year. Seasonal studies made in both mulberry and non-mulberry silkworms revealed a differential expression of different breeds to varied

climatic conditions during different seasons (Krishnaswami and Narasimhanna, 1974; Watanabe, 1928 and Ueda *et al.*, 1979). Variable gene frequencies at several loci in different silkworm races make them respond differently to changing environmental conditions (Watanabe, 1918, 1919; Fukuda *et al.*, 1963 and Ueda *et al.*, 1969). Similarly, the isolated multivoltine breed MU953 was found to exhibit a high degree of phenotypic manifestation with regards to nine metric traits (Table I to VI) reflecting on their genetic constitution and their response to the prevailing environmental conditions. The data analysed regarding the rearing performance revealed the maximum expression of metric traits during the monsoon season followed by the post-monsoon and pre-monsoon seasons and parallel the earlier findings of Jaroonchai, 1972; Narasimhanna, 1976 and Subramanya, 1985.

Table VI. Anova results for cocoon weight, shell weight and cocoon shell percentage of three different races in three different seasons.

Tableau VI. Résultats ANOVA pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez trois races différentes à des saisons différentes.

Sources of variation	df	SS	MS	F-ratio	SE	CD at 5%
<i>Sources de variation</i>						
7. Cocoon weight / Poids du cocon						
Races	2	0.811	0.406	196.91**	0.015	0.021
Seasons / Saisons	2	0.002	0.001	0.58NS	0.015	0.021
Races × seasons / Races × saisons	4	0.066	0.016	7.89**	0.026	0.037
Error / Ecart	18	0.371	0.002	-	-	-
8. Shell weight / Poids de la coque						
Race	2	0.048	0.024	555.95**	0.002	0.003
Seasons / Saisons	4	0.000	0.001	1.26N	0.002	0.004
Races × seasons / Races × saisons	4	0.003	0.001	14.94**	0.004	0.005
Error / Ecart	18	0.000	0.000	-	-	-
9. Cocoon shell percentage / Pourcentage de coques soyeuses						
Races	2	90.43	45.22	105.29**	0.218	0.308
Seasons / Saisons	2	0.77	0.38	0.89NS	0.218	0.308
Races × seasons / Races × saisons	4	0.77	0.19	0.45NS	0.378	0.535
Error / Ecart	18	7.73	0.43	-	-	-

** Significant ($P < 0.01$) / *Significatif* ($P < 0.01$). NS: Not significant / *Non significatif*. df: degree of freedom / *degré de liberté*. SS: Sum of squares / *Somme des carrés*. MS: Mean sum of squares / *Moyenne de la somme des carrés*. SE: Standard error / *Ecart type*. CD: Critical difference / *Différence critique*.

The maximum expression of fecundity was observed in the new breed as well as in the control races in the favourable post-monsoon and monsoon seasons compared to the unfavourable pre-monsoon season (Table I to III) indicating that parental growth was best in the monsoon season because the character is under the control of the female parent genotype.

The higher hatching percentage of the isolated multivoltine races and of the control races in all the seasons of the year can be attributed to the healthiness of the male and female moths, to the duration of mating, and to proper incubation techniques during the course of experimentation. The longer larval duration exhibited by Pure Mysore in the post-monsoon season can be attributed to the reduced rate of metabolism resulting in the slow growth rate due to low temperature and other associated environmental conditions (Yokoyama, 1962 and Morohoshi, 1969). While, the reduced larval duration exhibited by MU953 and *C. nichii* indicate their better genotypic response, faster growth and development.

The improvement in the pupation observed in the new breed MU953 (93.22%) with an increment of 5.13% over PM and 2.90% over *C. nichii* in the unfavourable pre-monsoon season reflects the stability with regards to the trait. Further, the improvement of this trait directly contributes to the increased number of sound cocoons which has a bearing on silkworm egg production. The higher cocoon yield/number of the new breed MU953 in the pre-monsoon season contributes to an increment of 4.42% and 1.02% over PM and *C. nichii* respectively.

The improvement in the productivity traits such as cocoon weight, shell weight and cocoon shell % and cocoon yield/weight observed in the multivoltine race MU953 over the control races PM and *C. nichii* reflects on its productivity merit. The higher cocoon weight of 1.439 gms recorded in the isolated multivoltine breed MU953 in the unfavourable pre-monsoon season followed by 1.323 gms in the post-monsoon and 1.312 gm in the monsoon season confers its superiority with regards to the consistency in the expression of this trait. Similarly, the significant ($P < 0.01$) increase in shell weight and cocoon shell % observed in the isolated multivoltine race contributes to its superiority. The stability in the expression of the above traits can be attributed to the selection of heavier cocoons with a highest pupation rate over generations during the course of breeding. The consistency in the expression of the productivity and viability traits in the isolated breed MU953 in different seasons of the year contributed to a higher cocoon yield by weight which has a direct bearing on the increased productivity compared to the multivoltine races Pure Mysore and *C. nichii*.

ACKNOWLEDGMENT

One of the authors (Dr G. V. Kalpana) thanks the Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) for the financial support.

REFERENCES

- FUKUDA T., KAMEYAMA T., MATSUDA., A correlation between the mulberry leaves consumed by the larvae in different ages of the larval growth and production of cocoon fibre spun by silkworm larvae and of the eggs laid by the silkworm moths. 1963, Bull. Seri. Exp. St. 18(3): 165-171.
- GRIFFING B., ZSIROS E., Heterosis associated with genotype environment interactions. 1971, Genetics, 68: 443-445.
- HARADA C., Heterosis of the quantitative characters in the silkworm. 1961, Bull. Seri. Exp. Sta. 17(1): 50-52.
- JAROONCHAI J., Batch selection of Thai polyvoltine silkworm races 15TH and 15KY, 1972, Bull. Thai. Seric. Res. Train. Cent. 2: 56-58.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M. N., Large scale trials on bivoltine hybrids in Mysore State, 1974, Indian J. Genetics. 34A: 229-236.

- MOROHOSHI S., The control of growth and development in *Bombyx mori*. Relationship between environmental moulting and voltine characters. 1969, Proc. Jpn. Acad. 45, 797-802.
- NARASIMHANNA M. N. Contributions to the genetics of silkworm. PhD thesis, Univ. of Mysore, Mysore, India.
- OROZCO F., Heterosis and genotype environment interactions: theoretical and experimental aspects. Bulletin Techniques. 1976, Department de génétique animale. Institute of National Agronomic Research No. 24, 43, 52 (ABA 45, 449).
- SUBRAMANYA G. Ecogenetic approach for determination of high yielding breeds of silkworm *Bombyx mori* L., 1985, Ph. D thesis, Univ. of Mysore, Mysore, India.
- UEDA S., KIMURA R., SUZUKI Studies of the growth of the silkworm of the silkworm *Bombyx mori* L. II. The influence of the rearing condition upon larval growth, productivity on silk substance and boil off loss of the cocoon shell, 1969, Bull. Seric. Exp. Sta., Japan, 23: 290-293.
- UEDA S., KIMURA R., SUSUKI K. Studies as the growth of silkworm *Bombyx mori* L., IV. Mutual relationship between the growth in the fifth instar larvae and the productivity of substance and eggs. 1975, Bull. Seric. Exp. Stn. Tokyo, 26(3): 233-247.
- WATANABE K. Studies on the voltinism in the silkworm *Bombyx mori*. I. Inheritance of bivoltine Vs. Quadrivoltines. Bull. Seric. Expt. Stn. 1918, Japan 3:439-456
- WATANABE K. Studies on the voltinism in silkworm *Bombyx mori*. II. Inheritance of voltinism vs. multivoltine. 1919, Bull. Seric. Expt. Stn. Japan 4: 87-106.
- WATANABE K. Further studies on the voltinism in silkworm *Bombyx mori*, 1928, Bull. Seric. Expt. Stn. Japan. 7: 285-303.
- YOKOYAMA T. Synthesised Science of Sericulture, 1962, translated and published by Central Silk Board, Bombay, India.

PERFORMANCES SAISONNIERES DE LA NOUVELLE LIGNEE POLYVOLTINE MU953 EN REGION TROPICALE

G.V. KALPANA* & G. SREERAMA REDDY

Sericultural Section, Department of Studies in Zoology, Manasa Gangotri, Mysore, Inde.

La performance saisonnière des races de ver à soie est d'une importance vitale pour comprendre l'action combinée du potentiel héréditaire d'une population et le degré auquel un tel potentiel peut s'exprimer dans l'environnement auquel elles sont exposées. Les données d'interactions entre le génotype et l'environnement sont nombreuses pour plusieurs espèces de plantes et d'animaux. Ainsi, dans cette étude, nous nous sommes efforcé d'analyser la performance saisonnière de la nouvelle lignée polyvoltine MU953, mise au point par lignage conventionnel et son adaptation aux conditions climatiques fluctuantes des tropiques. Nous avons trouvé que la performance de la nouvelle lignée polyvoltine MU953 pendant les trois saisons de l'année (pré-mousson, mousson et post-mousson) était meilleure que celle des races polyvoltines traditionnelles Pure Mysore et C. nichii. L'adaptation de la nouvelle lignée aux conditions fluctuantes du climat tropical est présentée.

INTRODUCTION

Les races de vers à soie élaborées dans des conditions différentes réagissent différemment aux conditions environnementales extérieures telles que la température, l'humidité relative, l'air, la lumière, la nourriture, les pathogènes, qui ont une influence sur les activités physiologiques affectant leur croissance et leur développement, tout comme sur l'expression de leurs caractères économiques. En conséquence, la qualité et la quantité de soie produite dépendent non seulement du potentiel génétique des races de ver à soie mais aussi des conditions climatiques dans lesquelles elles sont élevées.

Pendant toute l'histoire de la sériciculture, des efforts incessants ont été faits par les sélectionneurs de vers à soie pour mettre au point des races améliorées à productivité élevée. Ayant pris conscience de l'importance des conditions environnementales, les sélectionneurs japonais ont mis au point avec succès des races de ver à soie convenant aux différentes conditions climatiques pendant les différentes saisons de l'année. Cependant, les efforts pour mettre au points des lignées de vers à soie adaptées aux différentes saisons dans les environnements tropicaux ont rencontré peu de succès. Ainsi, nous nous sommes efforcé de comprendre la réponse génétique de la lignée polyvoltine isolée MU953 en l'élevant pendant différentes saisons de l'année avec d'autres races polyvoltines traditionnelles, telles que Pure Mysore et C. nichii pour évaluer la stabilité de l'expression de ses caractères commerciaux.

MATERIELS ET METHODES

La lignée polyvoltine MU953 filant des cocons blancs cintrés isolée par lignage conventionnel et les races polyvoltines traditionnelles telles que Pure Mysore filant des cocons jaunes fuselés et C. nichii filant des cocons blancs cintrés forment le matériel de cette étude.

* Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore, Inde.

Les trois races ont été élevées en trois répétitions pendant les saisons de la pré-mousson (mars-mai) caractérisée par une température élevée, une faible humidité et l'absence de précipitations, de la mousson (juin-octobre) caractérisée par une température modérée, une faible humidité et des précipitations modérées à importantes et de la post-mousson (nov.-fév.) caractérisée par une température faible, une faible humidité et l'absence de précipitations.

La performance d'élevage des races polyvoltines nouvelles et traditionnelles a été étudiée pendant les trois différentes saisons de l'année par rapport à l'expression de neuf traits quantitatifs soit, la fécondité, le taux d'éclosion, la durée larvaire, le taux de pupaison, le rendement en cocons en nombre, le rendement en cocons en poids pour 10 000 larves, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse. Les résultats obtenus sont soumis à un modèle statistique de classement double.

$$y_{ij} = u + R_i + S_j + (RS)_{ij} + e_{ij}$$

où,

y_{ij} = effet de la $i^{\text{ème}}$ race pendant la $j^{\text{ème}}$ saison

u = Effet constant

R_i = Effet de la $i^{\text{ème}}$ race

S_j = Effet de la $j^{\text{ème}}$ saison

$(RS)_{ij}$ = Interaction effet de la $i^{\text{ème}}$ race et de la $j^{\text{ème}}$ saison

e_{ij} = Effet de composant aléatoire

RESULTATS

Les données concernant les neuf traits quantitatifs pour la nouvelle lignée polyvoltine MU953, tout comme pour les races polyvoltines traditionnelles Pure Mysore et C. nichii, pendant les différentes saisons de l'année, sont regroupées dans les tableaux I à III. Tandis que les résultats de l'analyse de variance (Anova) pour les neuf traits métriques pendant les trois saisons différentes pour toutes les races à l'étude sont présentés dans les tableaux IV à VI.

Les valeurs moyennes obtenues pour les neuf traits métriques révèlent que la lignée isolée MU953 présente les valeurs les plus élevées pendant les trois saisons, suivies par C. nichii et Pure Mysore (Tableaux I à III).

L'analyse de variance calculée pour étudier la moyenne des neuf traits métriques pendant les trois saisons différentes révèle des variations significatives ($P < 0,01$) parmi les races pour les neuf traits métriques (Tableaux IV-VI). Tandis que des variations saisonnières insignifiantes ($P > 0,01$) sont observées pour les neuf traits métriques sauf pour le rendement en cocons/nombre pour les différentes races (Tableaux IV-VI). On remarque que l'interaction entre les races et les saisons est significative ($P < 0,01$) pour les caractères de rendement en cocons en nombre, de rendement en cocons en poids, de poids du cocon et de poids de la coque (Tableaux IV-VI).

DISCUSSION

La performance d'une race ou d'une lignée dépend principalement de l'action combinée du potentiel héréditaire de sa population et du degré auquel un tel potentiel peut s'exprimer dans l'environnement auquel elle est exposée. Le concept d'interaction du génotype et de l'environnement est bien documenté à la fois pour les espèces de plantes et d'animaux (Griffing et Zsiorios, 1971, Orozco, 1976). C'est Harada (1961) qui a démontré un degré élevé de variabilité phénotypique par rapport à divers caractères économiques chez le ver à soie pendant différentes saisons de l'année. Les études saisonnières faites sur les vers à soie mûrier et non-mûrier révèlent une expression différentielle des différentes lignées par rapport à des conditions climatiques variées pour différentes saisons (Krishnaswami et Narasimhanna, 1974 ; Watanabe, 1928 et Ueda et coll., 1979). Des fréquences de gènes variables sur plusieurs loci chez différentes races de vers à soie les font répondre différemment à des conditions environnementales changeantes (Watanabe, 1918, 1919 ; Fukuda et coll., 1963 et Ueda et coll., 1969). De même, on observe que la lignée polyvoltine isolée MU953 présente un degré

élevé de manifestation phénotypique par rapport aux neuf traits métriques (Tableau I à VI) ce qui a une répercussion sur leur constitution génétique et leur réponse aux conditions environnementales dominantes. Les données analysées concernant la performance d'élevage révèlent une expression maximum des traits métriques pendant la saison de la mousson puis pendant les saisons de la post-mousson et de la pré-mousson, ce qui est semblable aux observations précédentes de Jaroonchai, 1972 ; Narasimhanna, 1976 et Subramanya, 1985.

L'expression maximale de la fécondité s'observe pour la nouvelle lignée tout comme pour les races témoins pendant les saisons favorables de la post-mousson et de la mousson comparées à la saison défavorable de la pré-mousson (Tableaux I à III), ce qui indique que la croissance parentale est meilleure pendant la saison de la mousson parce que le caractère est sous le contrôle du génotype du parent femelle.

Le pourcentage d'éclosion élevé de la race polyvoltine isolée et des races témoins pendant toutes les saisons de l'année peut être attribué à la bonne santé des papillons mâles et femelles, à la durée de l'accouplement, et à des techniques d'incubation appropriées au cours des expériences. La durée larvaire plus longue de Pure Mysore pendant la saison de la post-mousson peut être attribuée à la baisse du taux métabolique, qui entraîne un taux de croissance ralenti dû à la faible température et à d'autres conditions environnementales associées (Yokoyama, 1962 et Morohoshi, 1969). Tandis que, la durée larvaire plus courte de MU953 et de *C. nichii* indique leur meilleure réponse génotypique et une croissance et un développement plus rapides.

La meilleure nymphose observée chez la nouvelle lignée MU953 (93,22 %), supérieure de 5,13 % par rapport à celle de PM et de 2,90 % par rapport à celle de *C. nichii* pendant la saison défavorable de la pré-mousson reflète la stabilité de ce trait. De plus, l'amélioration de ce caractère contribue directement à l'augmentation du nombre de cocons sains, ce qui a une relation avec la production d'œufs de ver à soie. Le rendement plus élevé en cocons/nombre pour la nouvelle lignée MU953 pendant la saison de la pré-mousson représente une augmentation de 4,42 % et de 1,02 % par rapport à PM et à *C. nichii* respectivement.

Les meilleures performances observées pour les traits de productivité tels que le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et le rendement en cocons/poids chez la race polyvoltine MU953 par rapport aux races témoins PM et *C. nichii* reflètent sa valeur en matière de productivité. Le poids du cocon plus élevé de 1,439 g enregistré chez la lignée polyvoltine isolée MU953 pendant la saison défavorable de la pré-mousson, suivi par 1,323 g pendant la post-mousson et par 1,312 g pendant la saison de la mousson témoigne de sa supériorité pour ce qui est de la consistance de l'expression de ce trait. De manière similaire, l'augmentation significative ($P < 0,01$) du poids de la coque et de la richesse soyeuse du cocon observée chez la race polyvoltine isolée contribue à sa supériorité. La stabilité d'expression des traits ci-dessus peut être attribuée à la sélection de cocons plus lourds, au taux de nymphose plus élevé, pendant les générations au cours du lignage. La constance de l'expression des caractères de productivité et de viabilité chez la lignée isolée MU953 pendant les différentes saisons de l'année donne un rendement en cocons de poids plus élevé, ce qui a une relation directe avec l'augmentation de la productivité par rapport aux races polyvoltines Pure Mysore et *C. nichii*.

STUDIES ON CERTAIN ASPECTS OF WILD ERI SILKWORM (*PHILOSAMIA CYNTHIA* DRURY) WITH SPECIAL REFERENCE TO ITS REARING PERFORMANCE

B. GOGOI* & B. C. GOSWAMI

Department of Botany, Gauhati University, Guwahati - 781 014, Assam, India.

Philosamia cynthia Drury is a wild counterpart of the domesticated eri silkworm (*Philosamia ricini* Boisduval). Some caterpillars were observed in the forest areas under in situ condition at the 5th instar stage, especially on the dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) plant of which it is also the first report. Those caterpillars were not removed from their natural habitat but allowed to grow for subsequent observations. On maturity the worms started spinning and formed cocoons on the green leaves of dighloti which is also a muga silkworm food plant. Then these were removed and kept hanging indoor. Subsequently it was found that pupae inside the cocoons practically hibernated from November for five long months. After moth emergence a clear picture emerged and the insect was identified as *Philosamia cynthia* Drury. Since these worms were collected from in situ conditions i. e. wild outdoor state, a standard procedure of outdoor rearing like for the muga silkworm was followed on dighloti plants under domestic conditions for four generations. Then they underwent hibernation again. *Philosamia cynthia* Drury was observed to be resistant to the diseases like pebrine, grasserie and flacherie, and to be also less susceptible to the uzi infection. E.R.R. was more than 80 per cent in average, silk filament was continuous and cocoons were reelable unlike *Philosamia ricini* Boisduval which is spun. Interestingly, *Philosamia cynthia* Drury performed excellently with indoor rearing as well.

Keywords: Wild eri silkworm, rearing performance, Dighloti.

INTRODUCTION

Eri silkworm culture is a traditional vocation of the Assamese people in general and Indo-mongoloid and aboriginal tribes of Assam in particular, since immemorial times. Eri culture is still in the form of a cottage industry and forms an integral part of the socio-economic and cultural life of the rural Assamese people. Hand-spun eri yarn is only valued for man's wraps and women's scarves. But there is further scope for blending eri silk with other natural silk, polyester and ramie fibres for ultimate production of new kinds of textile products. Despite tremendous potentialities for development, the age-old ericulture remained in a state of under exploitation, due to many reasons. One of the reasons is that the genetic vigour of the eri silkworm (*Philosamia ricini* Boisduval) declined over the centuries probably due to the multivoltine nature of the insect and inbreeding depression. A genetically stable, improved hybrid eri silkworm breed with higher effective rate of rearing, disease resistance and reelability needs to be developed. A sound strategy involving investigation, analysis, evaluation and detailed understanding of qualitative and quantitative traits of various available eco-races, strains and wild counterparts of the eri silkworm is to be worked out for evolving a new improved race. Although 6 eco-races of the eri silkworm have been collected and 6 strains have been

* Dept. of Botany, Sonari College, Sonari - 785 690, Sibsagar, Assam: India.

isolated from a mixed lot by the Central Eri Research and Training Institute, Mendipathar, East Garo Hills, Meghalaya (CER & TI Report 1987) for an evaluation and further breeding program, the ever important bi, tri and tetravoltine wild eri silkworm (*Philosamia cynthia* Drury) has yet to be collected, investigated and evaluated to utilise in eri-breeding programs.

In our present investigation, attempts have been made to study the various aspects of the wild eri silkworm (*Philosamia cynthia* Drury), collected by us, with special emphasis on its rearing performance on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.). Observations and findings presented in this paper would not only help the rearers but also the silkworm breeders in evolving improved silkworm races for future breeding programs.

MATERIALS AND METHODS

Some wild caterpillars looking like eri silkworms feeding on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.), leaves were observed in the forest areas at the 5th instar stage on 13th November 1992. Incidentally, dighloti is also an important secondary food plant of the muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood). However, the silkworms were not removed from their natural habitat till they matured, ripened and spun cocoons under in situ conditions. After five days of strict observations, i.e. until 18th November 1992, they were found to spin and form dark brown, muga like cocoons on the green leaves of dighloti which were then collected on 25th November 1992. A few cocoons were utilised to study various characteristics such as shape, size, cocoon weight and shell weight and reelability of the silk fibre and others were kept hanging inside the house with proper care and protection for using them as green seed cocoons and frequently observed. It was found that the pupae inside the cocoons practically hibernated from November 1992 to April 1993 for five months. After moth emergence a clear picture emerged and the insect was identified as *Philosamia cynthia* Drury.

Immediately after, the rearing of *Philosamia cynthia* Drury was carried out on three years old dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) which was its natural host plant. The rearing was conducted for four consecutive generations to study the various aspects of the wild eri silkworm (*Philosamia cynthia* Drury). The standard rearing procedure as followed in the case of outdoor rearing of the muga silkworm was followed under domestic conditions. Of course, the dighloti bushes used for rearing were covered with nylon fishing nets to protect the *Philosamia cynthia* Drury silkworms from predators and other enemies. The different broods studied were Jethua (April/May), Aherua (June/July), Bhodia (August/September) and Kotia (October/November).

Philosamia cynthia Drury was reared indoor for one generation, in April/May (Jethua brood) to study its performance using dighloti leaves, and the normal procedure of rearing was followed as for the eri silkworm (*Philosamia ricini* Boisduval).

For reeling and spinning the *Philosamia cynthia* Drury cocoons were boiled in water supplemented with alkalis to remove the sericin. Reeling was done by country made 'Bhowri' like muga cocoons and spinning was done by hand as in the case of eri cocoons. During the study careful observations were made at every step, which were recorded, evaluated and analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on continuous rearing of *Philosamia cynthia* Drury for four generations are presented in Table I. The environmental factors like minimum and maximum temperature and relative humidity recorded at the time of study are also shown in the same table.

Table 1. Rearing performance of *Philosamia cynthia* Drury reared continuously from 7th November 1993.**Tableau 1. Performance d'élevage de *Philosamia cynthia* Drury élevé de manière continue à partir du 7 Novembre 1993.**

Generation or brood	Date of egg laying	Fecundity (No. of eggs per laying)	Date of hatching	Date of maturing	Total days	Weight of 10 full grown worms (grams)	Weight of 10 ripen worms (grams)	Weight of 10 cocoons with pupa (grams)	Weight of 10 cocoons without pupa (grams)	Silk content (Per cent)	ERR (Per cent)
Génération ou couvée	Date de ponte	Fécondité (Nbre d'œufs par ponte)	Date d'éclosion	Date de maturation	Nombre total de jours	Poids de 10 vers croissance max. (g)	Poids de 10 vers matures (g)	Poids de 10 cocons avec les pupes (g)	Poids de 10 cocons sans pupes (g)	Teneur en soie (Pourcent)	Taux effectif d'élevage (Pourcent)
Jethua April/May <i>Jethua Avril/mai</i>	28 April <i>28 avril</i>	400	7 May <i>7 mai</i>	29 May <i>29 mai</i>	23	88	45	24.50	3.50	14.28	80
Aherua June/July <i>Aherua Juin/juillet</i>	26th June <i>26 juin</i>	370	4 July <i>4 juillet</i>	23rd July <i>23 juillet</i>	20	80	40	20.50	2.60	12.68	62.5
Bhodia Aug./Sept. <i>Bhodia Août/sept.</i>	16th Aug. <i>16 août</i>	350	24th August <i>24 août</i>	13th Sept. <i>13 sept.</i>	21	83	41	22.50	2.8	12.44	65.5
Kotia Oct./nov. <i>Oct./nov.</i>	8th Oct. <i>8 octobre</i>	375	17th Oct. <i>17 octobre</i>	7th Nov. <i>7 novembre</i>	22	85	42	23.00	3.00	13.04	76.4

Abiotic factors / Facteurs abiotiques

Brood/season / <i>Couvée/saison</i>	Temperature (°C)		Relative humidity (%) <i>Humidité relative (%)</i>		Rainy days <i>Jours de pluie</i>
	Max.	Min.	Max.	Min.	
1. Spring (April/May) / <i>1. Printemps (avril/mai)</i>	30.2	27.3	84.4	64.5	15
2. Summer (June/July) / <i>2. Été (juin/juillet)</i>	33.3	28.2	88.5	68.4	31
3. Late summer (Aug./Sept.) / <i>3. Fin de l'été (août/sept.)</i>	31.4	23.2	90.5	71.5	25
4. Autumn (Oct./Nov.) / <i>4. Automne (oct./ nov.)</i>	26.5	17.5	85.5	65.2	12

The female moth of the wild eri (*Philosamia cynthia* Drury) is comparatively larger than the male so far as the wing expanse and the size of the body are concerned. The wing expanse of the male and the female is of 10.5 cm and 12.6 cm respectively. This indicates that the female moth has broad wings while the male moth has pointed wings. In *Philosamia cynthia* Drury the ground colour of the wings varies from dark brown to pinkish white while in *Philosamia ricini* it is olive green to orange brown. The tips of the outer margin of the wings are light brown with dark linings. There are two black semicircular spots with sickle like white markings on the tips of the wings in both the male and the female moths. Like *Philosamia ricini* Boisduval there is a pinkish white cross band present across the middle of the wings. A sickle like transparent marking with yellowish lining is present in each wing. The abdominal segments of *Philosamia cynthia* Drury were covered with small white tufts. This is an identifying character of *P. cynthia* from *P. ricini*. Two pointed antennae are on the heads of both the male and the female moths. The male moth has a larger and a longer antenna than the female moth. Male and female moths with vestigial wings were also found to have emerged. Unlike the *Philosamia ricini* Boisduval moth which is diurnal, the *Philosamia cynthia* Drury moths are nocturnal in habit, i.e. moth emergence, pairing and laying of eggs are done at night. Nocturnal habits are also a characteristic of the muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood). The size and shape of the eggs are almost similar to *Philosamia ricini* Boisduval but the colour of the eggs of *Philosamia cynthia* Drury is brownish white whereas the eggs of *P. ricini* Boisduval is greenish white.

The colour of the first stage larvae of *Philosamia cynthia* Drury is yellow with black lining and with black hairs. In the second stage the colour is yellow without black lining and with short black hairs. In the first and second stages they preferred to have a colonial habit during feeding. After the second moult of the worms the hairs disappear, tubercles develop on the back and they become white in colour. At this stage a lime like white powdery substance completely covers up the body and appears profusely on the tubercles. The colour of the worms in the 4th stage is greenish white with less lime like powder. At the 5th stage they become light green in colour without the white powder. The tubercles at this stage become much prominent and fleshy. The worms have a habit of eating their skin after moulting. The ripen *Philosamia cynthia* Drury silkworms are light in weight, soft and are yellow in colour. The colour of the cocoons is dark brown, the inner side is smooth and contains a long peduncle of 10.5 cm long with which they hang on the host leaves. The cocoons are also covered with a thin film of floss. The cocoons are hard, filaments are continuous and reelable like in muga and mulberry cocoons but unlike eri (*Philosamia ricini* Boisduval) which are spun.

The present study indicated that April/May (Jethua brood) was found to be the best time for rearing *Philosamia cynthia* Drury so far as the effective rate of rearing, cocoon quality and silk percentage are concerned followed by August/September (Bhodia brood) and October/November (Aherua brood). E.R.R. of Jethua brood was found to be 80% followed by 76.4% in Kotia, 65.5% in Bhodia and 62.5% in Aherua broods. The percentage of silk in the Jethua brood was found to be 14.28 followed by 13.04 in the Kotia brood, 12.44 in Bhodia brood and 12.68 in the Aherua brood.

S. N. Chowdhuri (1981) reported that *Philosamia cynthia* Drury feeds on *Ailanthus* leaves. J. K. Gogoi (1984) reported that *Philosamia cynthia* Drury feeds on Kesseru (*Heteropanax fragrans* Seem), Barkesseru (*Ailanthus gaudis*) and Gomari (*Gmelina arborea* Roxb.) Arora & Gupta reported about 28 species of the host plant of the philosamia genus but they did not include dighloti in the list. Gogoi and Goswami (1994) reported that the wild eri (*Philosamia cynthia* Drury) is exclusively found on the dighloti plant (*Litsaea salicifolia* Roxb.), which is a new report. Under domestic conditions the present rearing experiment suggested that *Philosamia cynthia* Drury performs well on the dighloti plant. Dighloti is also a secondary food plant of the semi domesticated muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood) and its wild counterpart is also exclusively found on it (Gogoi and Goswami, 1996). Another bivoltine wild silkworm, Kotkori muga (*Attacus atlas* L.) was also found recently on the dighloti plant, which is also the biggest silkworm (Gogoi and Goswami, 1996). The plant has some advantages for silkworm rearing, like net rearing which is easy, good response to pruning, easy clonal propagation through cuttings and air layerings, (Gogoi and Goswami, 1995) easy rearing of early stage, late hatching and weak worms.

J. K. Gogoi (1984) reported that *Philosamia cynthia* Drury may be univoltine and bivoltine and undergoes hibernation at the pupal stage. But in our present study the *Philosamia cynthia* Drury in domestic conditions was found to be tetravoltine and underwent 5 months of hibernation from November 1992 to April 1993 and again from November 1993 to April 1994 for two consecutive years. According to J. K. Gogoi (1984), *Philosamia cynthia* Drury silkworms were susceptible to grasserie. But in our present investigation *Philosamia cynthia* Drury was found to be completely free from grasserie and to be free from various other silkworm diseases like pebrine, flacherie and muscardine, probably due to the presence of a lime like dry powdery substance on its body, which keeps them dry. This observation may be confirmed through further study. Infestation by the uzi fly was found to be nil. Other predators and enemies like marauder insects, preying birds however, damaged the early stage worms to a certain extent.

The result of indoor rearing of *Philosamia cynthia* Drury was also found to be quite satisfactory with 70% E.R.R in April/May (Jethua brood).

CONCLUSION

Dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) is now established as a new host plant of the wild eri silkworm (*Philosamia cynthia* Drury). Dighloti can be raised in the same farm both for muga and ericulture for commercial and seed cocoon production as well as for maintaining various domesticated and wild silkworm races for breeding programs. *Philosamia cynthia* Drury can serve well as a resourceful material for breeding muga and eri to evolve ever important disease resistant, genetically stable, improved bivoltine silkworm races.

If the reelability of the eri cocoon (*Philosamia ricini* Boisduval) could be achieved through cross breeding with *Philosamia cynthia* Drury, it could be a breakthrough in the field of ericulture. Moreover, taking cue from the experience of outdoor rearing of *Philosamia cynthia* Drury on evergreen dighloti plants, large scale production of eri cocoons (*Philosamia ricini* Boisduval) which was hitherto a challenge could be achieved in the field of eri culture as outdoor rearing of eri silkworm was tried on *Ailanthus* sp. by noted sericulture scientist Dr S. N. Chowdhury in Assam Agricultural University, Jorhat, but failed. Therefore, greater attention is required for further investigations on these lines. Over and above there is a probability of blending the reeled yarn of *Philosamia cynthia* Drury with other natural silk and ramie textile fibres. Thus, the present study has established on a sound basis the genetically useful and important traits of *Philosamia cynthia* Drury, such as hibernation, reelability, disease resistance etc. for all future breeding programs of both *Philosamia ricini* Boisduval and *Antheraea assama* Westwood in evolving commercially and economically desirable improved strains of insects.

REFERENCES

- ARORA G. S., GUPTA I. J. (1979) Taxonomic studies on some of the Indian non-mulberry silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae : Saturniinae), Memoires of the Zoological Survey of India, 16(1), 49-54.
- CHAUDHURY S. N. (1981) Muga silk industry, 1st ed., 178, Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam, Guwahati, Assam, India.
- CHAUDHURY S. N. (1985) Textile - its genesis and future. The Assam Tribune, July 14, 1985, Tribune Press, Guwahati, Assam, India.
- GOGOI J. K. (1980) A practical hand book of eri and muga culture. 1st ed., 217. published by R.K. Gogoi, Titabor, Assam, India.
- GOGOI J. K. (1984) Asomor muga silpa, 1st ed., 132, published by T.N. Gogoi, Barcgaon, Sapekhati, Assam, India.
- GOGOI B., GOSWAMI B. C. (1994) Studies on *Philosamia cynthia*, a tetravoltine wild eri silkworm with special reference to its feeding behaviour on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.),

Proceedings of the Annual Technical Session, Assam Science Society, Guwahati, Assam, India, 50.

GOGOI B., GOSWAMI B. C. (1995) Conservation of muga silkworm food plant with special reference to Dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.), Vasundhara, 1: 94-97.

GOGOI B. & GOSWAMI B. C. (1996) Studies on certain aspects of muga silkworm culture on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) Proceedings of the XX International Congress of Entomology, Firenze, Italy, August 25-31, 1996, 427.

ETUDES DE CERTAINS ASPECTS DU VER A SOIE SAUVAGE ERI (*PHILOSAMIA CYNTHIA* DRURY) EN PARTICULIER DE SA PERFORMANCE D'ELEVAGE

B. GOGOI* & B. C. GOSWAMI

Department of Botany, Gauhati University, Guwahati - 781 014, Assam, Inde.

Philosamia cynthia Drury est l'équivalent sauvage du ver à soie eri domestiqué (*Philosamia ricini* Boisduval). On a observé des chenilles au cinquième âge *in situ* dans les zones forestières et pour la première fois, surtout sur la plante dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.). Ces chenilles n'ont pas été retirées de leur habitat naturel mais on les a laissées grandir pour les observer par la suite. A maturité, les vers ont commencé à filer et à former des cocons sur les feuilles vertes du dighloti, qui est aussi une plante hôte du ver à soie muga. Puis, ils ont été retirés et laissés suspendus à l'intérieur. Par la suite, on a observé que les chrysalides à l'intérieur des cocons hibernaient pratiquement pendant cinq longs mois à partir de Novembre. Après l'émergence du papillon, on a pu se faire une idée plus précise et l'insecte a été identifié en tant que *Philosamia cynthia* Drury. Ces vers ayant été recueillis dans les conditions naturelles, c'est à dire à l'état sauvage à l'extérieur, une procédure standard d'élevage à l'extérieur, comme pour le ver à soie muga, a été suivie sur les plantes dighloti dans des conditions domestiquées pendant quatre générations. Puis, on les a laissés à nouveau hiberner. On observe que *Philosamia cynthia* Drury est résistant aux maladies comme la pébrine, la grasserie et la flacherie et est moins sensible à l'infestation uzi. L'E.R.R (taux effectif d'élevage) est supérieur à 80 pour-cent en moyenne, les filaments de soie sont continus et les cocons sont dévidables contrairement à ceux de *Philosamia ricini* Boisduval qui sont filés. De manière intéressante, *Philosamia cynthia* Drury donne également d'excellents résultats en élevage à l'intérieur.

INTRODUCTION

La culture du ver à soie eri est une vocation traditionnelle des gens de l'Assam en général et des tribus indo-mongoles et aborigènes de l'Assam en particulier, depuis des temps immémoriaux. L'élevage eri est toujours une industrie familiale et forme une partie intégrante de la vie socio-économique et culturelle des gens des campagnes dans l'Assam.

Le fil eri, filé à la main, est uniquement utilisé pour les écharpes des hommes et les foulards des femmes. Mais, il existe des possibilités supplémentaires pour mélanger la soie eri à d'autres soies naturelles, aux fibres de polyester et de ramie pour la production finale de nouveaux types de produits textiles. Malgré d'énormes possibilités de développement, l'ériculture séculaire demeure dans un état de sous-exploitation pour de nombreuses raisons. L'une des raisons est que la vigueur génétique du ver à soie eri (*Philosamia ricini* Boisduval) a baissé au cours des siècles, sûrement à cause de la nature polyvoltine de l'insecte et à la dépression consanguine. Il faudrait mettre au point une lignée améliorée du ver à soie eri hybride, génétiquement stable, avec un taux effectif d'élevage élevé, une résistance à la maladie et une dévidabilité plus élevées. Une stratégie adaptée comprenant l'examen, l'analyse, l'évaluation et la compréhension détaillée des traits qualitatifs et quantitatifs des diverses éco-races,

* Dept. of Botany, Sonari College, Sonari - 785 690, Sibsagar, Assam, Inde.

souches et équivalents sauvages du ver à soie eri disponibles doit être mise au point pour élaborer une nouvelle race améliorée. Bien que 6 éco-races du ver à soie eri aient été recueillies et 6 souches aient été isolées à partir d'un lot mélangé par le *Central Eri Research and Training Institute*, Mendipathar, East Garo Hills, Meghalaya (CER & TI Report, 1987) pour un programme d'évaluation et d'élevage ultérieur, on n'a toujours pas recueilli, examiné et évalué le ver à soie eri sauvage bi, tri et tétramant (*Philosamia cynthia* Drury), d'une importance considérable, pour l'utiliser dans des programmes d'élevage eri.

Dans notre recherche, des essais ont été faits pour étudier les divers aspects du ver à soie sauvage eri (*Philosamia cynthia* Drury) que nous avons recueilli, en accordant une attention particulière à sa performance d'élevage sur dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.). Les observations et les conclusions présentées dans cet article aideront non seulement les éleveurs mais aussi les sélectionneurs de ver à soie pour élaborer des races de ver à soie améliorées pour des programmes de lignage ultérieurs.

MATERIELS ET METHODES

Des chenilles sauvages ressemblant à des vers à soie eri se nourrissant sur des feuilles de dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) ont été observées au 5ème âge dans les zones forestières le 13 novembre 1992. Incidemment, le dighloti est aussi une plante hôte secondaire importante du ver à soie muga (*Antheraea assama* Westwood). Cependant, les vers à soie n'ont pas été retirés de leur habitat naturel avant d'avoir grandi, mûri et filé leurs cocons dans les conditions naturelles. Après cinq jours d'observations strictes, c'est à dire jusqu'au 18 novembre 1992, on a observé qu'ils filaient et formaient des cocons marron foncé, comme ceux du muga, sur les feuilles vertes du dighloti que l'on a ensuite ramassés le 25 novembre 1992. Quelques cocons ont été utilisés pour étudier les diverses caractéristiques comme la forme, la taille, le poids du cocon et le poids de la coque et la dévidabilité de la fibre de soie et les autres ont été suspendus à l'intérieur, avec l'attention et la protection nécessaires pour les utiliser comme des cocons à graines fraîches et en les observant fréquemment. On a observé que les chrysalides à l'intérieur des cocons ont hiberné pratiquement de novembre 1992 à avril 1993 pendant cinq mois. Après l'émergence des papillons, on peut se faire une idée plus précise et l'insecte a été identifié en tant que *Philosamia cynthia* Drury.

Immédiatement après, l'élevage de *Philosamia cynthia* Drury a été réalisé sur un dighloti de trois ans (*Litsaea salicifolia* Roxb.) qui est sa plante hôte naturelle. L'élevage a été réalisé pendant quatre générations consécutives pour étudier les divers aspects du ver à soie eri sauvage (*Philosamia cynthia* Drury). La procédure standard d'élevage suivie pour l'élevage du ver muga à l'extérieur a été utilisée dans des conditions domestiquées. Les arbustes dighloti utilisés pour l'élevage sont recouverts avec des filets à pêche en nylon pour protéger les vers à soie *Philosamia cynthia* Drury des prédateurs et des autres ennemis. Les différentes générations étudiées sont Jethua (Avril/mai), Aherua (Juin/juillet), Bhodia (Août/septembre) et Kotia (Octobre/novembre).

Philosamia cynthia Drury a été élevé à l'intérieur pendant une génération, en Avril/mai (Jethua) pour étudier sa performance en utilisant des feuilles de dighloti, et la procédure normale d'élevage a été suivie comme pour le ver à soie eri (*Philosamia ricini* Boisduval).

Pour le dévidage et le filage, les cocons de *Philosamia cynthia* Drury ont été bouillis dans de l'eau additionnée avec de l'alcali afin d'enlever la sérécine. Le dévidage a été fait par « Bhowri » comme pour les cocons muga et le filage a été fait à la main comme pour les cocons eri. Pendant l'étude, des observations attentives ont été faites à chaque étape, qui ont été enregistrées, évaluées et analysées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'élevage continu de *Philosamia cynthia* Drury pendant quatre générations sont présentées dans le tableau I. Les facteurs environnementaux comme la température minimum et maximum et l'humidité relative enregistrées à la période d'étude sont aussi présentés dans le même tableau.

Le papillon femelle de l'eri sauvage (*Philosamia cynthia* Drury) est comparativement plus grand que le mâle en ce qui concerne l'étendue de son aile et la taille de son corps. L'étendue de l'aile du mâle et de la femelle est de 10,5 cm et 12,5 cm respectivement. Ceci indique que le papillon femelle a des ailes larges tandis que le papillon mâle a des ailes pointues. Chez *Philosamia cynthia* Drury, la couleur des ailes varie de marron foncé à blanc rosé tandis que chez *Philosamia ricini* elle va de vert olive à marron orangé. Les bouts du bord extérieur des ailes sont marron clair avec une ligne noire. Il y a deux points noirs semi-circulaires avec des marques blanches falciformes au bout des ailes chez les papillons femelle et mâle. Comme chez *Philosamia ricini* Boisduval une croix blanc rosé est présente au milieu des ailes. Une marque transparente falciforme avec une bordure jaune est présente sur chaque aile. Les segments abdominaux de *Philosamia cynthia* Drury sont recouverts de petites touffes blanches. Ceci est un caractère distinctif chez *P. cynthia* par rapport à *P. ricini*. Les papillons mâle et femelle ont deux antennes pointues sur la tête. Le papillon mâle a une antenne plus grande et plus longue que le papillon femelle. On a aussi trouvé que des papillons mâles et femelles avec des ailes atrophiées avaient émergé. A la différence du papillon *Philosamia ricini* Boisduval qui est diurne, les papillons *Philosamia cynthia* Drury ont des habitudes nocturnes, c'est à dire que l'émergence du papillon, l'accouplement et la ponte des oeufs se font la nuit. Les habitudes nocturnes sont aussi l'une des caractéristiques du ver à soie muga (*Antheraea assama* Westwood). La taille et la forme des oeufs sont presque similaires à ceux de *Philosamia ricini* Boisduval mais la couleur des oeufs de *Philosamia cynthia* Drury est blanc marron tandis que les oeufs de *P. ricini* Boisduval sont blanc vert.

La couleur des larves du premier âge chez *Philosamia cynthia* Drury est jaune avec une ligne noire et des poils noirs. Au deuxième âge, leur couleur est jaune sans ligne noire et elles ont des poils noirs courts. Au premier et au deuxième âge, elles présentent un comportement grégaire pendant le nourrissage. Après la deuxième mue des vers, les poils disparaissent, des tubercules se développent sur le dos et ils deviennent de couleur blanche. A ce stade, une substance poudreuse blanche semblable à de la chaux recouvre complètement leur corps et apparaît en abondance sur les tubercules. La couleur des vers au 4ème âge est blanc vert avec moins de poudre semblable à de la chaux. Au cinquième âge, ils deviennent de couleur vert clair sans poudre blanche. Les tubercules à ce stade deviennent plus proéminents et charnus. Les vers ont l'habitude de manger leur peau après la mue. Les vers à soie *Philosamia cynthia* Drury matures sont légers en poids, doux et de couleur jaune. La couleur des cocons est marron foncé, la paroi intérieure est lisse et contient un long pédoncule de 10,5 cm de long par lequel ils pendent aux feuilles hôtes. Les cocons sont aussi recouverts d'une fine couche de blaze. Les cocons sont durs, les filaments sont continus et dévidables comme les cocons muga et mûrier mais pas comme les eri (*Philosamia ricini* Boisduval) qui sont filés.

L'étude actuelle indique que la meilleure période d'élevage de *Philosamia cynthia* Drury (cuvée Jethua) est Avril/mai pour ce qui est du taux effectif d'élevage, de la qualité du cocon et du pourcentage de soie, suivie par Août/septembre (cuvée Bhodia) et Octobre/novembre (cuvée Aherua). L'ERR de la génération Jethua est de 80 %, suivis par 76,4 % pour les générations Kotia, 65,5 % pour Bhodia et 62,5 % pour Aherua. Le pourcentage de soie de la génération Jethua est de 14,28, suivi par 13,04 pour la génération Kotia, 12,44 pour la génération Bhodia et 12,68 pour la génération Aherua.

S. N. Choudhuri (1981) a signalé que *Philosamia cynthia* Drury se nourrit sur les feuilles d'*Ailanthus*. J. K. Gogoi (1984) a rapporté que *Philosamia cynthia* Drury se nourrit sur Kesseru (*Heteropanax fragrans* Seem), Barkesseru (*Ailanthus gaudis*) et Gomari (*Gmelina arborea* Roxb.). Arora et Gupta ont signalé environ 28 espèces de plantes hôtes pour le genre *Philosamia* mais n'ont pas inclus le dighloti dans la liste. Gogoi et Goswami (1994) ont observé que l'eri sauvage (*Philosamia cynthia* Drury) se trouve exclusivement sur la plante dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.), ce qui est signalé pour la première fois. L'expérience d'élevage réalisée ici suggère que *Philosamia cynthia* Drury donne de bons résultats dans des conditions domestiquées sur la plante dighloti. Le dighloti est aussi une plante hôte secondaire du ver à soie muga semi-domestiqué (*Antheraea assama* Westwood) et son équivalent sauvage ne se trouve aussi exclusivement que sur lui (Gogoi et Goswami, 1996). Un autre ver à soie sauvage bivoltin, le muga Kotkori (*Attacus atlas* L.), qui est le plus grand papillon à soie a aussi été trouvé récemment sur la plante dighloti, (Gogoi et Goswami, 1996). La plante a des

avantages pour l'élevage du ver à soie, comme la facilité d'élevage en filet, une bonne réponse à la taille, la facilité de propagation clonale par boutures et marcottages (Gogoi et Goswami, 1995), un élevage facile des premiers âges, des éclosions tardives et des vers faibles.

J. K. Gogoi (1984) a signalé que *Philosamia cynthia* Drury est peut-être monovoltin et bivoltin et hiberne au stade nymphal. Mais dans notre étude, nous trouvons que *Philosamia cynthia* Drury dans des conditions domestiquées est tétramant et hiberne 5 mois de novembre 1992 à avril 1993 et à nouveau de novembre 1993 à avril 1994 pendant deux années consécutives. Selon J. K. Gogoi (1984), les vers à soie *Philosamia cynthia* Drury sont sensibles à la maladie de la grasserie. Mais dans notre recherche, nous avons trouvé que *Philosamia cynthia* Drury est complètement exempt de la grasserie et d'autres maladies du ver à soie comme la pébrine, la flacherie et la muscardine, probablement grâce à la présence d'une substance poudreuse sèche semblable à de la chaux sur son corps, qui les garde au sec. Cette observation sera peut-être confirmée par des études supplémentaires. Nous avons trouvé que l'infestation par la mouche uzi est nulle. Les autres prédateurs et les ennemis comme les insectes maraudeurs et les oiseaux de proie nuisent, cependant, aux vers à soie aux premiers âges jusqu'à un certain point.

Nous trouvons que les résultats d'élevage de *Philosamia cynthia* Drury à l'intérieur sont assez satisfaisants avec 70 % d'E.R.R (taux effectif d'élevage) en Avril/mai (cuvée Jethua).

CONCLUSION

On sait maintenant que le dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) est une nouvelle plante hôte du ver à soie eri sauvage (*Philosamia cynthia* Drury). Le dighloti peut être cultivé dans la même ferme à la fois pour l'élevage muga et eri pour la production de cocons de grainage et de cocons commerciaux, tout comme pour maintenir plusieurs races de vers à soie domestiqués et sauvages pour des programmes de lignage. *Philosamia cynthia* Drury peut être utilisé comme matériel plein de ressources pour l'élevage du muga et de l'eri afin d'élaborer des races de ver à soie bivoltines améliorées résistant à la maladie, génétiquement stables et d'une importance considérable.

Si la dévidabilité du cocon eri (*Philosamia ricini* Boisduval) pouvait être obtenue par des croisements entre races avec *Philosamia cynthia* Drury, cela pourrait être une découverte capitale dans le domaine de l'ériculture. De plus, s'inspirant de l'expérience d'élevage de *Philosamia cynthia* Drury à l'extérieur sur des plantes dighloti à feuilles persistantes, la production à grande échelle de cocons eri (*Philosamia ricini* Boisduval) qui était jusqu'ici un défi dans le domaine de la culture eri, pourrait être obtenue étant donné que l'élevage à l'extérieur du ver à soie eri avait été essayé sur *Ailanthus*, par Dr S. N. Choudhury, chercheur reconnu en sériciculture à l'*Assam Agricultural University*, Jorhat, mais n'avait pas réussi. Ainsi, il faudrait accorder plus d'attention à des recherches supplémentaires dans ce sens. Par dessus tout, il y aurait la possibilité de mélanger le fil dévidé de *Philosamia cynthia* Drury à d'autres fibres textiles naturelles de soie et de ramie. Ainsi, l'étude actuelle montre les caractères génétiquement utiles et importants de *Philosamia cynthia* Drury, tels que l'hibernation, la dévidabilité, la résistance à la maladie, etc.. pour tous les programmes de lignage ultérieurs avec *Philosamia ricini* Boisduval et *Antheraea assama* Westwood, pour élaborer des souches d'insectes améliorées, désirables commercialement et économiquement.

ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *CINNAMOMUM BEJOLGHOTA* (BUCH-HAM.) SWEET - A SECONDARY MUGA (*ANTHRAEA ASSAMA* W/w) FOOD PLANT FROM ASSAM, INDIA

S. N. CHOUDHURY^{1*}, R. Z. AHMED¹, ANDRE BARTHEL^{** 2}, PIET A. LECLERCQ^{*2}

1. Plant Sciences and Ecology Division, Regional Research Laboratory,
Jorhat - 785006, Assam, India.

2. Laboratory of Instrumental Analysis, Department of Chemical Engineering, Eindhoven
University of Technology, P. O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, The Netherlands.

Cinnamomum bejolghota (Buch-Ham.) Sweet (formerly known as *C. obtusifolium* Roxb. ex Nees) is a secondary host plant for the muga silk worm (*Antheraea assama* W/w). The leaves of this plant were collected from the Jorhat and Sibsagar districts in Assam, India, and hydrodistilled to extract the essential oils. The composition of the oils was investigated by GC and GC/MS. The oils were found to contain more than 67 and 41 compounds, respectively. The major constituents appeared to be linalool (35.8% and 52.2%), 1,8-cineole (14.3% and 6.0%) and bicyclogermacrene (9.9% and 6.6%).

Keywords: *Cinnamomum bejolghota*, Lauraceae, muga food plant, essential oil composition, linalool, 1,8-cineole, bicyclogermacrene.

INTRODUCTION

Cinnamomum bejolghota (Buch-Ham.) (Bennet, 1987) (Lauraceae), previously also known as *C. obtusifolium* Roxb. ex Nees, is a large robust tree spread throughout the central and outer Eastern Himalayas, East Bengal, Assam and the Andaman Islands (Anon., 1950). In Assam (where the plant is known as Patichunda) it is well distributed in the Sibsagar, Jorhat, Golaghat, Nowgong and Kamrup districts. The plant is also reported to be found in the Garo, Khasi and Jaintia districts of Meghalaya and in a few places of Nagaland in Northeast India (Kanjilal *et al.*, 1992). In general, the plant is reported to occur up to an elevation of 2100 m above mean sea level (Husain *et al.*, 1992).

Cinnamomum bejolghota, *Litsea cubeba* Pers syn., *L. citrata* Blume and *L. salicifolia* Roxb. ex Wall are the secondary host plants for the 'muga worm' (*Antheraea assama* W/w) (Bharali, 1971; Choudhury, 1981). The muga silk industry is unique to Northeast India and occupies a premier position in the cultural history of the region. Muga worms are reared on these plants to yield the 'muga silk', the golden yellow silk yarn which is very attractive and has a lustre not matched by any silk produced elsewhere (Choudhury, 1981).

A considerable amount of literature is available describing the utility of *C. bejolghota* as a muga host plant (Bharali, 1971; Yadav and Goswami, 1992), but only two reports on the chemical composition of its essential oil were found. Cinnamic aldehyde was detected in the leaf oil from Burma (P. Kya and N. C. Min, 1970) as well as in the bark oil from Japan (Y. Sakai and Z. Meng, 1992).

* Addresses for correspondence.

** Current address: Faculty of Chemistry and Mineralogy, Leipzig University, Germany.

Cinnamic acid and cinnamic alcohol were also present in the latter oil. No other constituents of the oils of *C. bejolghota* have been reported.

The present contribution reports on the oil compositions of *C. bejolghota* leaves collected from two different districts of Assam, keeping in view the influence of variable leaf oil compositions upon palatability to muga worms.

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

Fresh leaves were collected from matured trees from the Jorhat (Plant No. 1) and Sibsagar (Plant No. 2) districts of Assam in March, 1996. Voucher specimens have been deposited in the herbarium of the Regional Research Laboratory, Jorhat, Assam, India.

Isolation of the essential oils:

Fresh leaves (300g) of both plant samples were steam distilled in a clevenger-type apparatus for 3h.

Qualitative and quantitative analysis:

The oil was investigated by capillary GC and GC/MS.

GC - A Perkin-Elmer 8500 gas chromatograph equipped with a FID detector and a HP-1 fused silica column (24 m × 0.32 mm, 0.17 µm film thickness) was used. The samples, dissolved in hexane, were injected in the split mode, using pressure controlled helium as carrier gas at a linear velocity of 30 cm/s (at 60 ° C). Injector and detector temperatures were maintained at 250 ° C. The column oven temperature was programmed from 60 ° C (after 2 min) to 250 ° C at 4°/min. The final temperature was held for 20 min. Peak areas and retention times were measured by electronic integration. The relative amounts of individual components are based on the peak areas obtained, without the FID response factor correction. Temperature programmed (linear) retention indices of the compounds were determined relative to n-alkanes.

GC/MS - Analyses were carried out with a Hewlett-Packard 5970A mass selective detector (MSD), directly coupled to a HP 5790A gas chromatograph. A 25 m × 0.20 mm fused silica HP-1 column, with a film thickness of 0.33 µm was employed. The column oven temperature was programmed from 60° C (after 3 min) to 300 ° C at 5°/min. The injector and GC/MS interface temperatures were maintained at 280 and 300° C, respectively. The helium carrier gas was pressure controlled to give a linear gas velocity of 44 cm/s (at 60 ° C). Electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 10-400 Da at a rate of 2 spectra/s.

Component identification:

The constituents of the oils were identified by matching their 70 eV mass spectra and linear temperature programmed retention indices with reference libraries (Anon., 1986, Anon., 1994; Davis, 1990; Henneberg *et al.*, 1994; Libbey, 1991; Masada, 1967; Mc Lafferty and Stauffer, 1993; Ramaswami *et al.*, 1986; Sandra and Bicchi, 1987).

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrostillation of the green leaves produced aromatic smelling oils in 0.10% and 0.13% yield from Plant Nos. 1 and 2, respectively. The oil from Jorhat appeared colourless, whereas the oil from Sibsagar was light yellow in colour.

Table I. Composition of the leaf oils of *Cinnamomum bejolghota* (Buch-Ham) Sweet (Lauraceae), from Assam, India.**Tableau I. Composition des huiles de la feuille de *Cinnamomum bejolghota* (Buch-Ham) Sweet (Lauraceae), d'Assam en Inde.**

Compound / Composant	RI ^a	Percentage ^b / Pourcentage ^b	
		Plant no. 1 / Plante no. 1	Plant no. 2 / Plante no. 2
hexanal	770	tr	-
(Z)-3-hexen-1-ol	833	tr	-
1-hexanol	847	tr	-
2-heptanone	864	tr	-
heptanal	876	tr	-
α -thujene	921	0.1	0.2
α -pinene	928	2.2	1.6
camphene	940	tr	tr
sabinene	962	2.1	4.9
β -pinene	967	1.7	1.8
myrcene	982	0.9	0.5
(Z)-3-hexenyl acetate	987	tr	-
α -phellandrene	994	1.1	tr
α -terpinene	1008	0.3	0.6
p-cymene	1010	0.2	0.8
1,8-cineole	1016	14.3	6.0
limonene	1019	2.2	0.8
(Z)- β -ocimene	1027	0.1	tr
(E)- β -ocimene	1038	0.4	0.3
γ -terpinene	1047	0.2	0.5
terpinolene	1077	0.1	0.1
linalool	1084	35.8	52.2
cis-pinene hydrate	1103	2.3	-
camphor / camphre	1114	tr	-
trans-pinocarveol	1118	tr	-
trans-pinene hydrate	1120	2.0	-
terpinen-4-ol	1158	1.2	2.5
α -terpineol	1169	2.0	0.3
(Z)-piperitol	1177	0.6	-
(E)-piperitol	1187	1.5	-
nerol	1209	tr	-
geraniol	1234	tr	-
δ -elemene	1330	0.2	0.2
neryl acetate	1344	tr	-
geranyl acetate	1362	0.2	-

Table I. (Continued). / Tableau I. (Suite).

Compound / Composant	RI ^a	Percentage ^b / Pourcentage ^b	
		Plant no. 1 / Plante no. 1	Plant no. 2 / Plante no. 2
α -copaene	1370	0.1	0.2
β -elemene	1384	0.2	0.3
α -gurjunene	1405	0.2	-
β -caryophyllene	1411	2.6	2.2
aromadendrene	1431	0.1	-
α -humulene	1444	0.4	0.3
allo-aromadendrene	1451	0.2	-
β -cadidene	1462	tr	-
γ -muurolene	1466	0.2	0.1
germacrene D	1470	0.3	0.3
β -selinene	1476	tr	-
bicyclogermacrene	1487	9.9	6.6
α -muurolene	1489	tr	-
cubebol	1501	0.4	0.4
α -cadinene	1510	1.1	1.0
cubenene	1520	tr	-
(E)-nerolidol	1547	0.5	0.3
palustrol	1552	tr	-
spathulenol	1557	1.9	2.1
caryophyllene oxide	1562	0.5	0.6
globulol	1566	1.5	0.8
viridiflorol	1574	0.9	0.7
ledol	1585	0.6	0.5
10-epi- γ -eudesmol	1599	-	0.3
epicubenol	1609	0.1	0.1
T-muurolol + T-cadinol	1621	1.3	2.2
δ -cadinol	1623	0.4	0.5
β -eudesmol	1628	-	0.6
α -cadinol	1632	2.1	4.2
selin-11-en-4 α -ol	1633	0.3	-
(E, E)-farnesol	1700	0.5	-
n-tricosane	2300	tr	-
n-pentacosane	2500	tr	-
other compounds / autres composés		1.0	2.3

^a Measured linear retention indices on a HP-1 column, relative to n-alkanes / Indices de rétention linéaire mesurés sur une colonne HP-1, par rapport aux n-alkanes.

^b area %; tr = trace (< 0.1%) / Surface en % ; tr = trace (< 0.1%).

The volatile compounds identified in the oils are listed in Table I. The bulk of the oils consisted of 67 and 41 compounds accounting for more than 99.0% and 97.7% for plant nos. 1 and 2 respectively. The major constituent of both oils was linalool, but the percentages (35.8% and 52.2%) differed significantly between the two plant samples. Other predominant compounds were 1,8 cineole (14.3% and 6.0% respectively), bicyclo-germacrene (9.9% and 6.6%) and α -cadinol (2.1% and 4.2%). The composition of the leaf oils of both plants is not only different quantitatively but also qualitatively. It is interesting to note that a number of compounds (hexanal, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, 2-heptanone, heptanol, (Z)-3-hexenyl acetate, camphor, trans-pinocarveol, nerol, geraniol, neryl acetate, β -cadinene, β -selinene, α -muurolene, cubenene, palustrol, tricosane and pentacosane) were present in one sample (Plant no. 1) and totally absent in the other one (Plant no. 2). It is also noteworthy that not even a trace of cinnamaldehyde was detected, contrary to published results (P. Kya and N. C. Min, 1970).

Variation in the total oil content, significant differences in percentages of individual components and qualitative differences indicate that the Northeast Indian germplasms may have considerable variation in such plant species in natural state. Moreover, differences in aromatic nature may result in variations in taste and flavour of the plants for muga silkworms in different areas of the region.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1950) The wealth of India; Raw materials. CSIR, New Delhi, B. N. Shastri (ed.) 2, 178-179.
- ANONYMOUS (1986) The Sadtler standard gas chromatography retention index library. Sadtler Research Laboratories, Philadelphia, PA, USA.
- ANONYMOUS (1994) PC Version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database, version 4.5. National Institute of Standards and Technology, U. S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA (1994).
- BENNET S.S.R. (1987) Name changes in flowering plants of India and adjacent regions. 126.
- BIHARALI N. N. (1971) Muga: an agro-biological industry. Indian Silk 10(7), 5-10.
- CHOUDHURY S.N. (1981) Muga silk industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam, Gauhati, Assam, India, 1-31.
- DAVIS N. W. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. J. Chromatogr. 503, 1-24.
- HENNEBERG D., WEIMANN B., JOPPEK W. (1994) Mass spectrometry library search system MassLib, version 7.4 (for Ultrix). Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr, Germany (1994). Using MassLib the following databases were searched:
- a) MCCLAFFERTY F. W., STAUFFER D. B. (1988) The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 4th ed. Wiley-Interscience, New York, NY, USA
- b) HENNEBERG D., WEIMANN B., JOPPEK W. (1994) MPI library of mass spectral data. Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr, Germany.
- c) TEN NOEVER DE BRAUW M. C., BOUWMAN J., TAS A. C., LA VOS G. F. (1988) Compilation of mass spectra of volatile compounds in food. TNO-HVV-CSIA, Zeist, The Netherlands.
- d) LECLERCQ P. A., SNIJDERS H. M. (1996) EUT library of EI mass spectra. Eindhoven University of Technology, Eindhoven, The Netherlands.
- HUSAIN A., BIRMANI O. P., POPLI S. P., MISRA L. N., GUPTA M. N., SRIVASTAVA G. N., ABRAHAM Z., SINGH A. K. (1992) Dictionary of Indian medicinal plants, CIMAP, Lucknow, India, 132-133.
- KANJILAL U. N., KANJILAL P. C., DE R. N., DAS A. (2nd reprint, 1992) Flora of Assam. Periodical Expert Book Agency, Vivek Vihar, Delhi, India, 4, 56-57.
- KYA P., MIN N.C. (1970) Studies on some local Cinnamomum species. Union Burma J. Life Sci., 3(3), 197-204.
- LIBBEY L. M. (1991) A Paradox database for GC/MS data on components of essential oils and other volatiles. J. Essent. Oil Res. 3, 193-194.

- MASADA Y. (1967) Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. Wiley and Sons, New York, NY, USA.
- McLAFFERTY F.W., STAUFFER D.B. (1993) Mass spectrometry library search system Bench-Top/PBM, version 3.0. Palisade Co., Newfield, NY, USA. Using BenchTop/PBM the following database was searched:
- a) McLAFFERTY F.W., STAUFFER D.B. (1991) The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 5th ed., Wiley and Sons, New York, NY, USA
- RAMASWAMY D.K., BRISCESE P., GARGIULLO R.J., VONGELDERN T. (1986) Sesquiterpene hydrocarbons: from mass confusion to orderly line-up. In: Flavors and Fragrances: A World perspective (Proceed. 10th Internat. Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors. Washington, DC, USA). LAWRENCE B.M., MOOKHERJEE B.D., WILLIS B.J. (eds.), Elsevier Science Publ., Amsterdam, The Netherlands (1988) 951-980.
- SAKAI Y., MENG Z. (1992) Quality of commercial crude drugs. II. Contents of cinnamaldehydes in commercial Cinnamomum bark. Gifu-ken Eisei Kenkyushoho, 37, 24-40.
- SANDRA P., BICCHI C. (1987) Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Hüthig, Heidelberg, Germany.
- YADAV G. S., GOSWAMI B. C. (1992) Studies on the foliar constituents of 'som' (*Machilus bombycina* King.) and 'soalu' (*Litsea plyantha* Juss.). Sericologia 32(3), 447-451.

COMPOSITION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CINNAMOMUM BEJOLGHOTA* (BUCH-HAM) SWEET - UNE PLANTE HÔTE SECONDAIRE DU MUGA (*ANTHRAEA ASSAMA* Ww) DANS L'ASSAM EN INDE

S.N. CHOUDHURY^{1*}, R.Z. AHMED¹, ANDRE BARTHEL^{**2}, PIET A. LECLERCQ^{2*}

1. Plant Sciences and Ecology Division, Regional Research Laboratory,
Jorhat - 785006, Assam, Inde.

2. Laboratory of Instrumental Analysis, Department of Chemical Engineering, Eindhoven
University of Technology, P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, Pays-Bas.

Cinnamomum bejolghota (Buch-Ham) Sweet (connu précédemment sous le nom de *C. obtusifolium* Roxb. ex Nees) est une plante hôte secondaire du ver à soie muga (*Antheraea assama* Ww). Les feuilles de cette plante ont été recueillies dans les régions de Jorhat et de Sibsagar dans l'Assam, en Inde et ont été hydrodistillées pour en extraire les huiles essentielles. La composition des huiles est analysée par GC et GC/MS. Nous trouvons que les huiles contiennent respectivement 67 et 41 composés. Les constituants principaux sont le linalol (35,8 % et 52,2 %) le cineole-1,8 (14,3 % et 6 %) et le bicyclogermacrene (9,9 % et 6,6 %).

INTRODUCTION

Cinnamomum bejolghota (Buch-Ham.) (Bennet, 1987) (Lauraceae), connu précédemment sous le nom de *C. obtusifolium* Roxb. ex Nees, est un grand arbre robuste répandu dans le centre et au bord de l'Himalaya de l'est dans le Bengale-Est en Assam et dans les îles Andaman (Anon., 1950). En Assam (où la plante est connue sous le nom de Patichunda), elle est bien distribuée dans les régions de Sibsagar, Jorhat, Golaghat, Nowgong et Kamrup. La plante a aussi été signalée dans les régions de Garo, Khasi et Jaintia dans le Meghalaya et dans quelques endroits du Nagaland dans le Nord-est de l'Inde (Kanjilal et coll., 1992). En général, la présence de la plante est signalée jusqu'à 2100 m d'altitude (Husain et coll., 1992).

Cinnamomum bejolghota, *Litsea cubeba* Pers syn., *L. citrata* Blume et *L. salicifolia* Roxb. ex. Wall sont les plantes hôtes secondaires du « ver muga » (*Antheraea assama* Ww) (Bharali, 1971 ; Choudhury, 1981). L'industrie de la soie muga est unique au nord-est de l'Inde et occupe une place primordiale dans l'histoire culturelle de la région. Les vers muga sont élevés sur ces plantes pour donner la « soie muga », au très beau fil de soie jaune doré dont le lustre est incomparable à aucune autre soie produite ailleurs (Choudhury, 1981).

Il existe beaucoup de littérature décrivant l'utilité de *C. bejolghota* comme plante hôte du muga (Bharali, 1971 ; Yadav et Goswami, 1992), mais on ne trouve seulement que deux rapports sur la composition chimique de son huile essentielle. De l'aldéhyde cinnamique est détecté dans l'huile de la feuille au Burma (P. Kya et N. C. Min, 1970), tout comme dans l'huile de l'écorce au Japon (Y. Sakai et Z. Meng, 1992). Dans cette dernière, on a également trouvé de l'acide cinnamique et de l'alcool cinnamique. Aucun autre constituant de l'huile de *C. bejolghota* n'a été signalé.

* Adresses pour la correspondance.

** Adresse actuelle : Faculty of Chemistry and Mineralogy, Leipzig University, Allemagne.

Cet article décrit la composition de l'huile des feuilles de *C. bejolghota* recueillies dans deux régions différentes dans l'Assam, en ayant en tête l'influence de la composition en huile de la feuille sur sa sapidité pour les vers muga.

MATERIELS ET METHODES

Plante :

Des feuilles fraîches ont été recueillies sur des arbres adultes dans les régions de Jorhat (plante no. 1) et de Sibsagar (plante no. 2) dans l'Assam en mars 1996. Des spécimens ont été déposés dans l'herbier du *Regional Research Laboratory*, Jorhat, Assam, Inde.

Isolement des huiles essentielles :

Des feuilles fraîches (300 g) sont distillées à la vapeur dans un appareil de type *clevenger* pendant 3 heures pour les deux échantillons de plantes.

Analyse qualitative et quantitative :

L'huile est analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC) et spectrométrie de masse (GC/MS) capillaires.

GC - Un chromatographe à gaz Perkin-Elmer 8500 équipé avec un détecteur FID et une colonne de silice condensée (24 m × 0,32 mm, épaisseur du film de 0,17 μ) est utilisé. Les échantillons dissous dans de l'hexane sont injectés par parties, en utilisant de l'hélium à pression contrôlée comme gaz porteur à une vitesse linéaire de 30 cm/s (à 60 °C). Les températures d'injecteur et de détecteur sont maintenues à 250 °C. La température du four dans la colonne est augmentée de 60 °C (après 2 minutes) à 250 °C à 4°/min. La température finale est maintenue pendant 20 minutes. Les zones pics et les temps de rétention sont mesurés par intégration électronique. Les quantités relatives en composants individuels sont basées sur les zones pic obtenues, sans la correction du facteur de réponse FID. Les indices de rétention à la température programmée (linéaire) des composants sont déterminés par rapport aux n-alcane.

GC/MS - Les analyses sont réalisées avec un détecteur sélectif de masse (MSD) Hewlett-Packard 5970A, directement couplé à un chromatographe à gaz HP 5790A. Une colonne de silice HP-1 condensée de 25 m × 0,20 mm, au film d'une épaisseur de 0,33 μ m est employée. La température du four dans la colonne est programmée de 60 °C (après 3 minutes) à 300 °C à 5 °C/min. Les températures de l'injecteur et de l'interface GC/MS sont maintenues à 280 et 300 °C, respectivement. La pression du gaz porteur l'hélium est contrôlée pour donner une vitesse linéaire de gaz de 44 cm/s (à 60 °C). Les spectres de masse d'ionisation des électrons sont acquis sur la gamme de 10-400 Da à un rythme de 2 spectres/s.

Identification des composants :

Les constituants des huiles sont identifiés en comparant leurs spectres de masse 70 eV et les indices de rétention linéaires à la température programmée dans les bibliothèques de référence (Anon., 1986; Anon., 1994; Davis, 1990; Henneberg et coll., 1994; Libbey, 1991; Masada, 1967; Mc Lafferty et Stauffer, 1993; Ramaswami et coll., 1986; Sandra et Bicchi, 1987)

RESULTATS ET DISCUSSION

L'hydrodistillation des feuilles vertes produit des huiles aromatiques odorantes dans un rendement de 0,10 % et de 0,13 % pour les plantes no. 1 et 2, respectivement. L'huile de Jorhat est incolore, tandis que l'huile de Sibsagar est de couleur jaune clair.

Les composants volatiles identifiés dans les huiles sont énumérés dans le tableau I. La majeure partie des huiles est constituée de 67 et 41 composants représentant plus de 99 % et de 97,7 % pour les plantes no. 1 et 2 respectivement. Le constituant principal des deux huiles est le linalol, mais les

pourcentages (35,8 % et 52,2 %) diffèrent de manière significative entre les deux échantillons de plantes. Les autres composants prédominants sont le cinéole 1,8 (14,3 % et 6 % respectivement), le bicyclogermacrene (9,9 % et 6,6 %) et l' α -cadinol (2,1 % et 4,2 %). La composition en huiles de la feuille diffère non seulement sur le plan quantitatif mais aussi sur le plan qualitatif pour les deux plantes. Il est intéressant de noter qu'un nombre de composants (l'hexanal, (Z)-3-hexen-1-ol, l'hexanol, le 2-heptanone, l'heptanol, (Z)-3-hexenyl acétate, le camphre, le trans-pinocarveol, le nerol, le geraniol, l'acétate neryl, le β -cadinene, le β -selinene, l' α -muurolene, le cubenene, le palustrol, le tricosane et le pentacosane) sont présents dans un échantillon (plante no. 1) et totalement absent dans l'autre (plante no. 2). Il est aussi intéressant de constater qu'aucune trace de cinnamaldéhyde n'est détectée, contrairement aux résultats publiés (P. Kya et N. C. Min, 1970).

La variation du contenu total en huile, les différences significatives de pourcentage en composants individuels et les différences qualitatives indiquent que les germoplasmes du nord est de l'Inde pourraient varier considérablement dans de telles espèces de plantes à l'état naturel. De plus, les différences de nature aromatique dans les plantes pourraient entraîner des variations de goût et de parfum pour les vers à soie muga dans différentes zones de la région.

CONSUMPTION AND UTILISATION OF *TERMINALIA ARJUNA* LEAVES IN DIFFERENT INSTARS OF TROPICAL TASAR SILKWORM *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

U. S. P. SINHA, C. M. BAJPAI, B. N. BRAHMACHARI, B.R.R.P. SINHA & S. S. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Nagri, Dist. Ranchi (Bihar), India.

*A feeding trial of *Antheraea mylitta* Drury was conducted on the foliage of *Terminalia arjuna* to determine its food consumption, utilisation and tissue growth during its different larval instars of development. During its larval span of 42 days, the average total consumption of an individual larva was 123.630 g of which 68.951 g were assimilated by the insect. The quantity of food consumption increased with increase in the age of the larvae and reached its peak in the fifth instar (79.67%). The assimilation and tissue growth were found to positively correlate with the consumption as well as with the age of the larvae. With the advancement in age, the approximate digestibility declined whereas the efficiency of conversion of ingested and digested food rose up to the fourth instar and decreased in the fifth instar.*

Keywords: *Antheraea mylitta*, *Terminalia arjuna*, assimilation, digestibility.

INTRODUCTION

The study of the nutritional parameters of sericigenous insects is considered to be an important field of work for better management and development of the sericulture industry as well as for its physiological importance. Studies have been made on these aspects with regards to several insects by workers like Evans (1939), Waldbauer (1964, 1968), Mukherji and Guppy (1970), Latheef and Harcourt (1972), Bailey (1976), Prem Chand (1979), Palanichamy (1979) but only little information on the consumption and utilisation of food in sericigenous insects is available like that of Kapil (1963), Poonia (1979), Pant *et al.*, (1986) and Reddy & Alfred (1979) in *Philosamia ricini*. Barah *et al.*, in *Antheraea assama* and Yadav *et al.*, (1983), Rana *et al.*, (1987) in *Antheraea proylei*. Mohanty and Mitra (1991) have only studied the larval energetics of *A. mylitta* grown on *Terminalia tomentosa*.

The present study, therefore, is an attempt to determine the instarwise consumption and utilisation of food by the tasar silkworm *A. mylitta*, an insect of immense sericultural importance.

MATERIALS AND METHODS

The healthy larvae of *A. mylitta* were reared from the first to the fifth instar on *T. arjuna* leaves during the 2nd rearing season in the laboratory as described by Barah *et al.*, (1989). Four replications with fifty larvae per replication were maintained from brushing till the end of the fifth instar. A reserved batch of worms, having the same age and size reared under identical conditions was also maintained to replace the weak and dead larvae during the course of the study. Besides, a control set of leaves identical to each of the four replications was also maintained to determine the loss in the weight of leaves due to desiccation. The amount of ingestion, egestion and larval weight were measured and recorded except during the moulting period. The gravimetric method of Waldbaur (1968) was followed for the evaluation of daily consumption.

The IPB formula of Petrusiewicz and Mac Fayden (1970) was used for the calculation of food energy assimilation, $A = C - F$ and respiration, $R = C - (F + P)$, where C = food consumption, F = food egestion and P = increase in body weight.

The method of Evans (1939) was used for the conversion of assimilation and the gain in weight data for the coefficient of utilisation and growth.

$$\text{Coefficient of utilisation or approximate digestibility (AD)} = \frac{\text{Assimilation}}{\text{Ingestion}} \times 100$$

$$\text{Efficiency of conversion of ingested (ECI) food to body substances} = \frac{\text{Tissue growth}}{\text{Ingestion}} \times 100$$

$$\text{Efficiency of conversion of digested (ECD) food to body substances} = \frac{\text{Tissue growth}}{\text{Assimilation}} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

The instarwise amount of food ingested and assimilated, the tissue growth and the food oxidised for all the larval instars are given in Table I. During 42 days of its larval life, the average total consumption of a larva was computed to be 123.63g. The consumption of food increased according to the weight and the age of the larva. The increase was maximum during the fifth instar, being 79.7% of the total consumption. Similar results have been reported by Reddy and Alfred (1979) in *Philosamia ricini*. Palanichamy *et al.*, (1979) in *Eupterote molifera* and Prem Chand (1979) in *Diacrisia obliqua*.

Table I. Average consumption, egestion, assimilation, tissue growth and respiration in different instars of *A. mylitta* fed on *T. arjuna* (fresh weight in grams).

Tableau I. Consommation, évacuation, assimilation, croissance des tissus et respiration moyennes à différents âges chez A. mylitta nourri sur T. arjuna (poids frais en grammes).

Instar	Consumption	Egestion	Assimilation	Tissue growth	Respiration
Age	Consommation	Evacuation		Croissance des tissus	
I	0.377 ± 0.046 (0.30)	0.072 ± 0.005	0.305 ± 0.042 (0.44)	0.054 ± 0.004 (0.20)	0.251 ± 0.038
II	1.811 ± 0.042 (1.46)	0.407 ± 0.005	1.404 ± 0.041 (2.04)	0.360 ± 0.037 (1.36)	1.044 ± 0.025
III	6.869 ± 0.022 (5.56)	2.000 ± 0.058	4.869 ± 0.042 (7.06)	1.600 ± 0.058 (6.03)	3.269 ± 0.098
IV	16.072 ± 0.046 (13.00)	5.200 ± 0.091	10.872 ± 0.051 (15.77)	5.200 ± 0.091 (19.61)	5.672 ± 0.141
V	98.501 ± 0.203 (79.67)	47.000 ± 0.235	51.501 ± 0.071 (74.69)	19.300 ± 0.091 (72.79)	32.101 ± 0.148

± value indicates standar error / la valeur ± indique l'écart type.

Instarwise percent of consumption, assimilation and tissue growth are given in parentheses. / Les pourcentages de consommation, d'assimilation et de croissance des tissus dépendant de l'âge sont donnés entre parenthèses.

In the insects, assimilation is the total quantity of food available to be incorporated as body substance or to be metabolised for energy (Reddy and Alfred, 1979). Assimilation was recorded to be the highest in the fifth instar (74.69%) and found to be related with the amount of food consumed. This finding is in agreement with Yadav *et al.*, (1983) and Barah *et al.*, (1989). When the results of the increase in body weight or tissue growth are computed, a direct correlation was observed with the age of the larva. The tissue growth was also found to be positively related to the amount of food consumed (Fig. 1 & 2) and found maximum (72.79%) in the fifth instar larvae. The average larval weight of mature larva in the fifth instar was found to be 26.522 g. Digestibility, efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food to body substances are three primary parameters of nutritional physiology which have been presented in table II. The approximate digestibility (AD) was found to be negatively correlated to the amount of food consumed. The AD was higher in the early instars which gradually reduced, the lowest being during the fifth instar (52.29%). A similar trend has been reported (Horie *et al.*, 1976, Ito and Kobayashi, 1978, Horie and Watanabe, 1983; Benchamin and Jolly, 1984). Digestibility is affected by nutritional deficiency or an unbalanced diet, a high content of crude fibre or deficiency of water in the food (Waldbaur, 1964). The highest AD in early instars may be due to the fact that young larvae are generally selective feeders and feed on the young and succulent leaves which are easier to digest. The old instar larvae on the other hand ingest mature leaves including leaf veins with thick crude fibres which are not digestible, which results in the decline of approximate digestibility. The grand mean value of AD for the five larval instars in *A. mylitta* on the fresh weight basis was found to be 69.843% while the same value on the fresh weight basis was found to be 71% in *Antheraea proylei* (Rana *et al.*, 1987).

Table II. Mean efficiency of food utilisation by the larvae of *A. mylitta* fed on *T. arjuna* leaves.

Tableau II. Efficacité moyenne de l'utilisation de la nourriture par les larves de *A. mylitta* nourries sur les feuilles de *T. arjuna*.

Instar	Approximate digestibility (%)	Efficiency of conversion of ingested food (ECI) (%)	Efficiency of conversion of digested food (ECD) (%)
Age	Digestibilité approximative (%)	Efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) (%)	Efficacité de conversion de la nourriture digérée (ECD) %
I	80.895 ± 1.571	14.408 ± 0.796	18.123 ± 1.063
II	77.494 ± 0.522	19.590 ± 0.456	25.600 ± 0.646
III	70.890 ± 0.764	23.283 ± 0.779	32.898 ± 1.459
IV	67.650 ± 0.482	32.350 ± 0.482	47.843 ± 1.054
V	52.285 ± 0.146	19.595 ± 0.061	37.475 ± 0.215

± value indicates standard error / la valeur ± indique l'écart type.

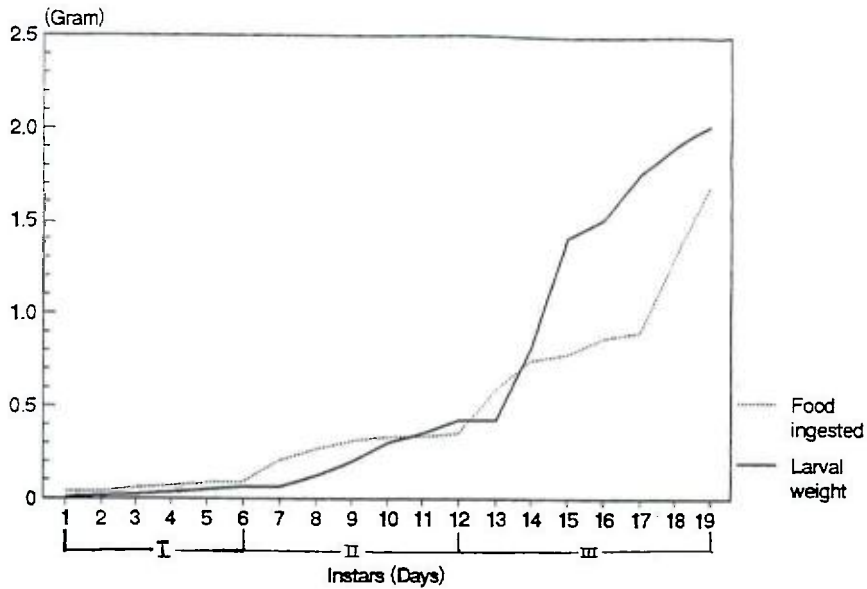


Fig. 1. Daily cumulative weights attained (vs) food consumed by *A. mylitta* (larval stages I-III).

Fig.1. Poids cumulatifs quotidiens atteints en fonction de la nourriture consommée par *A. mylitta* (âges larvaires I à III).

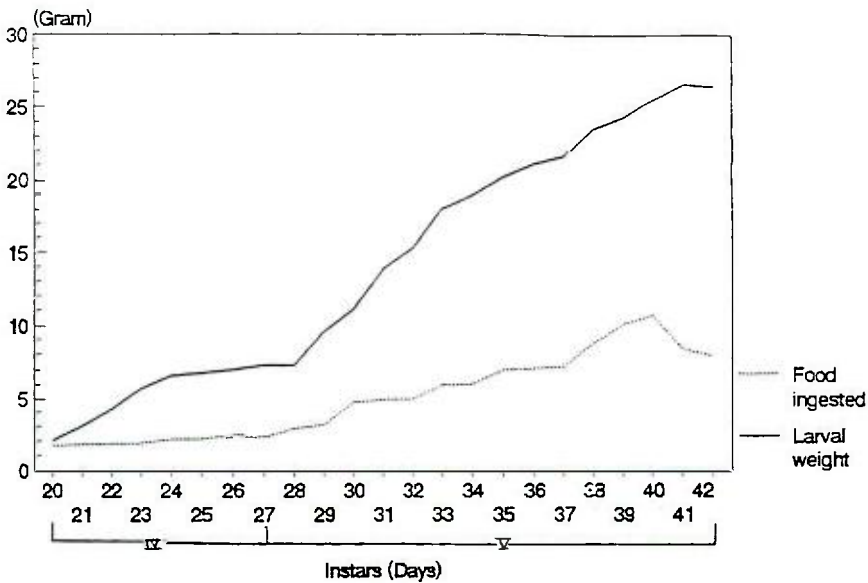


Fig 2. Daily cumulative weights attained (vs) food consumed by *A. mylitta* (larval stages IV-V).

Fig. 2. Poids cumulatifs quotidiens atteints en fonction de la nourriture consommée par *A. mylitta* (âges larvaires IV à V).

As regards to ECI and ECD, the values increased from the first to the fourth instar and declined in the fifth stage (Table II). A number of workers supported this trend of rise and fall in ECI and ECD in different insects (Mukherji and Guppy, 1970, Latheef and Harcourt, 1972 and Bailey, 1976). The lower values of ECI and ECD in the early instars may be due to the fact that a smaller portion of the ingested or digested food is used for tissue growth and more for its maintenance while in the latter stage the metabolic rate is higher than the early stage and hence more of the ingested or digested food is available for conversion to body tissue. The grand mean value of ECI over the entire larval period was 21.845%. Waldbauer (1964) reported this value to be in between 20-30% in *Menduca sexta*. Horie and Watanabe (1983) reported 22-23% ECI in the mature larva of *Bombyx mori*. The mean value of ECD was calculated to be 32.388% in *A. mylitta* while ECD for *A. proylei* was reported to be 34% (Rena *et al.*, 1987).

Further it was also observed that both ECI and ECD declined in the fifth instar where maximum tissue growth takes place. The longer larval life and maximum consumption of food (79.67% of the total consumption) during the instar is perhaps responsible for the high rate of tissue growth in spite of the decline in ECI and ECD. The fall of ECI and ECD in the fifth instar may be due to the fact that the higher amount of ingested or digested food is metabolised for maintenance of the body and a lesser amount used for tissue growth.

REFERENCES

- BAILEY C. C. (1976) A quantitative study of consumption and utilisation of various diets in the bertha armyworm *Mamestra configurata* (Lep: Noct.); Can. Entomol. 108: 1319-1326.
- BARAH A., GOSWAMI M. C., SAMSON M. V. (1989) Consumption and utilisation of food in different instars of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.), 98(2): 99-103.
- BENCHAMIN K. V., JOLLY M. S. (1984) Studies on ingestion, digestion and conversion efficiency in polyvoltine and bivoltine silkworm breeds (*B. mori* L.) Proceedings, III Oriental entomological symposium, Feb. 21-24, Trivandrum (2): 195-206.
- EVANS A. C. (1939) The utilization of food by certain Lepidopterous insects, Trans R. Entomol. Soc. London, 89: 13-22.
- HORIE Y., INOKUCHI T., WATANABE K., NAKASONE S., YUNAGAWA H. (1976) Quantitative studies on food utilization by the silkworm *B. mori* L. through its life cycle, I. Economy of dry matter, Energy and carbon. Bull. Seric. Expt. Stn. Jpn. 26(6): 413-442.
- HORIE Y., WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter in food by the silkworm *B. mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entomol. Zool., 18: 70-80.
- ITO T., KOBAYASHI M. (1978) Rearing of silkworm in the silkworm and important laboratory tool (ed. Tazima, Y.) Kodansha Scientific Book Ltd. Tokyo: 83-100.
- KAPIL R. P. (1963) Quantitative feeding of larvae of *Philosamia ricini*, Indian J. Entomol. 25: 233-241.
- LATHEEF M. A., HARCOURT D. C. (1972) Quantitative study of food consumption, assimilation and growth in *Leptonotarsa decemlineata* (Col: Chrysom.) on two host plants; Can. Entomol. 104: 1271-1278.
- MUKHERJI M. K., GUPPY J. C. (1970) Quantitative study of food consumption and growth in *Pseudaletia unipuncta* (Lep: Noct.) Can. Entomol. 102: 1179-1188.
- PANT R., RAMANA D., SARKAR A. (1986) Consumption and utilisation of food in *Philosamia ricini* larva during development: Sericologia, 26: 49-54.
- PALANICHAMI S., THANGARAJ T., PONNUCHAMY R. (1979) Studies on food utilisation by *Eupterote mollifera*, The Indian Zoologist, 3(1 & 2), 89-92.
- PETRUSEWICZ K., MACFAYDEN A. (1970) Productivity of terrestrial animals, IBH Handbook, Blackwell Scientific Pbs: Oxford, 13, 109.
- POONIA F. S. (1978) Studies on food utilisation and rate of growth during the developmental stages of eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Sat.), Indian J. Seric., 17(1): 48-60.

- PRE-CHAND (1979) Utilisation of food by the Bihar hairy caterpillar, *Diacrisia obliqua* Walker, Indian J. Ent., 41(3), 237-239.
- RANA B., PRASAD B., NIGRAM M. P. (1987) Consumption and utilisation of food by oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae, Sericologia, 27(1): 11-19.
- REDDY M. V., ALFRED J. R. B. (1979) Utilisation of castor *Ricinus Communis* Linn. leaves by the last instar larvae of the silkmoth *Philosamia ricini* Hutt. (Lep. Sat.), Indian Biologist, II (1-2), 35-40.
- WALDBAUER G. P. (1964) The consumption, digestion and utilisation of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan) (Lep.: Sphin.), Ent. Ext. Appl. 7: 253-269.
- WALDBAUER G. P. (1968) The consumption and utilisation of food by insects, Adv. Insect. Physiol., 5: 229-288.
- YADAVA P. S., BHATACHARJEE, KAKATI L. N. (1983) Food consumption, assimilation, tissue growth and ecological efficiencies in the larvae of *Antheraea proylei* Jolly, Proc. Symp. Ins. Ecol. & Resource Manage., Meerut, 204-214.

CONSOMMATION ET UTILISATION DES FEUILLES DE *TERMINALIA ARJUNA* PAR LE VER A SOIE TASAR *TROPICAL ANTHRAEA MYLITTA* DRURY A DIFFERENTS AGES

U.S.P. SINHA, C. M. BAJPAI, B. N. BRAHMACHARI, B. R. R. P. SINHA & S. S. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Nagri Dist. Ranchi (Bihar), Inde.

Une expérience de nourrissage a été réalisée sur le feuillage de Terminalia arjuna avec Anthraea mylitta Drury pour déterminer la consommation, l'utilisation de nourriture et la croissance des tissus pendant les différents âges du développement larvaire. Pendant la durée de sa vie larvaire de 42 jours, la consommation moyenne totale d'une larve individuelle est de 123,630 g dont 68,951 g sont assimilés par l'insecte. La quantité de nourriture consommée augmente alors que les larves progressent en âge et atteint son sommet au cinquième âge (79,67 %). L'assimilation et la croissance des tissus sont corrélés de manière positive avec la consommation tout comme avec l'âge des larves. Avec l'avancement en âge, la digestibilité approximative baisse tandis que l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée augmente jusqu'au quatrième âge, puis baisse au cinquième âge.

INTRODUCTION

L'étude des paramètres nutritionnels des insectes séricigènes est considérée comme un domaine important pour une meilleure gestion et un meilleur développement de l'industrie séricicole, tout comme pour son intérêt physiologique. Ces aspects ont fait l'objet de travaux chez plusieurs insectes par des chercheurs comme Evans (1939), Waldbauer (1964, 1968), Mukherji et Guppy (1970), Latheef et Harecourt (1972), Bailey (1976), Prem Chand (1979), Palanichamy (1979) mais très peu d'information est disponible sur la consommation et l'utilisation de la nourriture chez les insectes séricigènes à part les études de Kapil (1963), Poonia (1979), Pant et coll., (1986) et Reddy et Alfred (1979) chez *Philosamia ricini*, Barah et coll., chez *Anthraea assama* et Yadav et coll., (1983), Rana et coll., (1987) chez *Anthraea proylei*. Mohanty et Mitra (1991) ont seulement étudié l'énergie larvaire chez *A. mylitta* élevée sur *Terminalia tomentosa*.

L'étude actuelle représente donc un essai pour déterminer la consommation et l'utilisation de nourriture en fonction de l'âge, par le ver à soie tasar *A. mylitta*, un insecte d'une immense importance séricicole.

MATERIELS ET METHODES

Des larves saines de *A. mylitta* sont élevées en laboratoire, du premier au cinquième âge, sur des feuilles de *T. arjuna* pendant la deuxième saison d'élevage, d'après la description de Barah et coll., (1989). Quatre répétitions, avec cinquante larves par répétition, sont maintenues de la levée jusqu'à la fin du cinquième âge. Un lot de vers en réserve, de la même taille et du même âge, élevé dans des conditions identiques, est aussi maintenu pour remplacer les larves faibles et mortes au cours de l'étude. De plus, un lot témoin de feuilles, identique à celui des quatre répétitions, est aussi conservé pour déterminer la perte de poids des feuilles due à la dessiccation. La quantité d'ingestion,

d'évacuation et le poids larvaire ont été mesurés et enregistrés sauf pendant la période de mue. La méthode gravimétrique de Waldbauer (1968) est utilisée pour l'évaluation de la consommation quotidienne.

La formule IPB de Petrusiewicz et Mac Fayden (1970) a été utilisée pour le calcul de l'assimilation de l'énergie alimentaire, $A = C - F$ et la respiration $R = C - (F + P)$, où C = consommation de nourriture, F = évacuation de nourriture et P = augmentation du poids.

La méthode d'Evans (1939) a été utilisée pour la conversion de l'assimilation et le gain de poids pour le coefficient d'utilisation et la croissance.

$$\text{Coefficient d'utilisation ou digestibilité approximative (AD)} = \frac{\text{Assimilation}}{\text{Ingestion}} \times 100$$

Efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) en substances corporelles =

$$\frac{\text{Croissance des tissus}}{\text{Ingestion}} \times 100$$

Efficacité de conversion de la nourriture digérée (ECD) en substances corporelles =

$$\frac{\text{Croissance des tissus}}{\text{Assimilation}} \times 100$$

RESULTATS ET DISCUSSION

La quantité de nourriture ingérée et assimilée en fonction de l'âge, la croissance des tissus et la nourriture oxydée sont présentées pour tous les âges larvaires dans le tableau I. Pendant les 42 jours de vie larvaire, la consommation totale moyenne d'une larve est de 123,63 g. La consommation de nourriture augmente en fonction du poids et de l'âge de la larve. L'augmentation est maximum pendant le cinquième âge, elle représente 79,7 % de la consommation totale. Des résultats similaires ont été signalés par Reddy et Alfred (1979) chez *Philosamia ricini*, Palanichamy et coll., (1979) chez *Eupterote molifera* et Prem Chand (1979) chez *Diacrisia obliqua*.

Chez les insectes, l'assimilation est la quantité totale de nourriture disponible pour être incorporée en tant que substance corporelle ou métabolisée pour l'énergie (Reddy et Alfred, 1979). L'assimilation est la plus élevée au cinquième âge (74,69%) et l'on observe qu'elle est liée à la quantité de nourriture consommée. Cette observation est en accord avec celles de Yadav et coll., (1983) et de Barah et coll., (1989). Quand on évalue les résultats concernant l'augmentation de poids ou la croissance des tissus, on observe une corrélation directe avec l'âge de la larve. On relève aussi que la croissance des tissus est liée de manière positive à la quantité de nourriture consommée (Fig. 1 et 2) et est maximum (72,79 %) chez les larves du cinquième âge. On trouve que le poids larvaire moyen des larves adultes au cinquième âge est de 26,522 g. La digestibilité, l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) en substances corporelles, qui sont trois paramètres principaux de la physiologie nutritionnelle sont présentés dans le tableau II. On relève que la digestibilité approximative (AD) est corrélée de manière négative à la quantité de nourriture consommée. La digestibilité approximative est plus élevée aux premiers âges et baisse progressivement, elle est la plus basse au cinquième âge (52,29 %). Une tendance similaire a été signalée (Horie et coll., 1976, Ito et Kobayashi, 1978, Horie et Watanabe, 1983 ; Benchamin et Jolly, 1984). Les carences nutritionnelles, un régime déséquilibré, un contenu élevé en fibres brutes ou le manque d'eau dans la nourriture ont des effets sur la digestibilité (Waldbauer, 1964). La digestibilité approximative plus élevée aux premiers âges est peut être due au fait que les jeunes larves sont généralement des mangeurs sélectifs, qui se nourrissent de feuilles jeunes et succulentes, qui sont plus faciles à digérer. Les larves des derniers âges, en revanche, ingèrent des feuilles adultes, y compris les nervures, aux fibres brutes épaisses qui ne sont pas digestes, ce qui entraîne une baisse de la digestibilité approximative. On

relève que la valeur moyenne totale de l'AD, sur la base du poids frais, pour les cinq âges larvaires chez *A. mylitta* est de 69,843 % tandis que la même valeur sur la base du poids frais est de 71 % chez *Antheraea proylei* (Rana et coll., 1987).

En ce qui concerne l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et l'efficacité de conversion de la nourriture digérée, les valeurs augmentent du premier au quatrième âge et baissent au cinquième âge (Tableau II). Un certain nombre de chercheurs ont observé cette tendance à la hausse et à la baisse de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et de l'efficacité de conversion de la nourriture digérée chez différents insectes (Mukherji et Guppy, 1970 ; Latheef et Harcourt, 1972 et Bailey, 1976). Les valeurs inférieures d'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et d'efficacité de conversion de la nourriture digérée aux premiers âges sont peut-être dues au fait qu'une plus petite part de nourriture ingérée ou digérée est utilisée pour la croissance des tissus et plus pour le fonctionnement, tandis qu'au dernier âge le taux métabolique est plus élevé qu'au premier âge et il existe donc plus de nourriture ingérée ou digérée disponible pour la conversion en tissu. La valeur moyenne totale de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée pendant toute la période larvaire est de 21,845 %. Waldbauer (1964) a signalé que cette valeur était comprise entre 20 et 30 % chez *Menduca sexta*. Horie et Watanabe (1983) ont signalé une efficacité de conversion de la nourriture ingérée de 22 à 23 % chez les larves adultes de *Bombyx mori*. On a calculé que la valeur moyenne d'efficacité de conversion de la nourriture digérée est de 32,388 % chez *A. mylitta* tandis qu'on a rapporté que l'efficacité de conversion de la nourriture digérée par *A. proylei* est de 34 % (Rena et coll., 1987).

De plus, on a aussi relevé que l'efficacité de conversion de la nourriture digérée et l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée baissent toutes les deux au cinquième âge, où une croissance maximum des tissus a lieu. Une vie larvaire plus longue et une consommation maximum de nourriture (79,67 % de la consommation totale) à cet âge sont peut-être responsables du taux élevé, malgré la baisse de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et de l'efficacité de conversion de la nourriture digérée. La chute de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et de l'efficacité de conversion de la nourriture digérée au cinquième âge est peut-être due au fait que la quantité plus élevée de nourriture ingérée ou consommée est métabolisée pour le fonctionnement du corps et une moindre quantité est utilisée pour la croissance des tissus.

CHANGES IN THE BIOCHEMICAL CONTENTS OF CASTOR LEAVES AFFECTED BY FUNGAL DISEASES

M. P. SHREE, CHANDRAMMA & C.M. VENKATESH

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

Castor leaf is the main food of eri silkworm. Good growth and development of the eri worm and in turn the yield of eri cocoons depend on the quality of castor leaves. But, like any other crop plant, castor is also affected by many fungal diseases among which rust, spot and blight are most common and destructive. The worms dislike the spotted leaves and suffer when fed on them. Hence, it was thought worthwhile to know the post-infectional biochemical changes in castor leaves infected by fungal pathogens. The total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a/b ratio, amino acids, proline, total proteins, phenols, soluble and reducing sugar contents were estimated in the healthy and infected castor leaves. All the three fungal diseases either decreased or increased the biochemical contents to different extents. Probably these changes result in inferior quality castor leaves.

Keywords: Biochemical contents, blight, castor, rust, spot.

INTRODUCTION

Castor is cultivated mainly as an oil seed crop as well as an inter crop in different regions of India. In North-Eastern parts of India, there is no regular cultivation of castor and it is mainly grown to sustain eri silkworm rearing. When castor is grown only for ericulture it is hardly economical due to its high cultivation cost; but when grown both for ericulture and seed purposes, it becomes slightly economic (Md. Isa *et al.*, 1994).

Castor is reported to suffer severe losses due to many diseases caused by fungi and bacteria. The following three fungal diseases were found to be more common and destructive.

i) The rust disease is caused by a biotroph (Obligate parasite) *Melampsora ricini*. It belongs to the class - Basidiomycetes, order - Uredinales and family - Melampsoraceae.

The rust affected leaves bear numerous minute orange yellow pustules on the lower surfaces. They shed orange yellow spores on rupture of epidermis. The corresponding upper surface of the leaf shows a yellow discoloration. On severe infection, the leaves turn yellow, tend to dry and shed.

ii) The leaf spot disease is caused by *Cercospora ricinella*. It belongs to the class - Deuteromycetes, order - Moniliales and family - Dematiaceae. The disease appears as minute black or brown points surrounded by a pale green ring. As the spots enlarge, the centre turns pale brown and then greyish white, surrounded by a deep brown band. The fructification of the fungus appears as tiny black dots in the white centre. The spots often occur in great numbers scattered over the leaves. They are round when young but, may become irregularly angular when mature. When the spots are close to each other the interveinal leaf tissue withers and large brown patches of dried leaf may result.

iii) The blight disease is caused by *Alternaria ricini*. It belongs to the class - Deuteromycetes, order - Moniliales and family - Dematiaceae. All the aerial parts of the plant i.e., the stem, leaves, inflorescence and capsules are liable to be attacked. The disease makes its appearance first on the

cotyledons in the form of spots. These spots become intensive during the rainy season on the foliage. They are irregular, brownish, scattered and appear in concentric rings and later become covered with sooty growth. When the attack is severe, the spots coalesce and form big patches resulting in the premature defoliation of the plant.

Since good quality castor leaves are essential for eriworms and in turn for a good yield of quality cocoons, an attempt was made to investigate the post-infectious biochemical changes in the castor leaves affected by the above mentioned fungal diseases.

MATERIALS AND METHODS

The healthy and diseased (rust, spot and blight) castor leaves were collected from plantations in and around Bangalore. The different biochemical contents were analysed in both the healthy and diseased (as mentioned above) leaf material using the following procedures:-

Total chlorophyll:

The extraction of total chlorophyll from fresh leaves without maceration was carried out by following the method of Hiscox and Israelstam (1979). 50 mg of fresh leaf tissue was placed in a glass vial containing 7 ml of dimethyl sulphoxide (DMSO) and chlorophyll was extracted into the fluid at 65 °C in an electric oven for 3 hours. The extracted liquid was transferred to a measuring cylinder and made up to a volume of 10 ml with DMSO, assayed immediately or transferred to vials and stored between 0° and 4° C until required for analysis.

The total chlorophyll, chlorophyll-a and chlorophyll-b were estimated using the method of Arnon (1949). 5ml sample of chlorophyll extract was transferred to a cuvette and optical density values at 645 and 663 nm were read in a Systronics 118, spectrophotometer against DMSO blank. The chlorophyll content was calculated using the equation as given below (Mahadevan and Sridhar, 1986).

$$\text{Total chlorophyll} = 20.2(D_{645}) + 8.02(D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times \text{wt of leaf (g)}}$$

= mg of total chlorophyll / g fresh wt.

$$\text{Chlorophyll-a} = (12.7 \times D_{663}) - (2.67 \times D_{645}) \times \frac{V}{1000 \times \text{wt of leaf (g)}}$$

= mg of total chlorophyll-a/ g fresh wt.

$$\text{Chlorophyll-b} = (22.9 \times D_{645}) - (4.68 \times D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times \text{wt of leaf (g)}}$$

= mg of total chlorophyll-b/g fresh weight.

Where:

V = Volume of the extract

D = Optical density

Wt = Weight

g = Gram

Amino acids:

50 mg fresh castor leaf powder was ground in 5 ml of 80% methanol using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was partitioned with an equal volume of petroleum ether to remove the chloroplast pigments. The methanolic layer was used for amino acid and proline estimation (Moore and Stein, 1948).

To 0.5 ml of the sample, 0.5 ml of propanol in distilled water (1:1) was added, followed by 1 ml of ninhydrin reagent (prepared by mixing 1% ninhydrin in 0.5 M citrate buffer). The mixture was boiled in a water bath for 20 min. The solution was cooled and the intensity of purple colour was read at 570 nm. The proline content was measured at 440 nm in a photoelectric colorimeter. Glycine was used as the standard.

Total soluble proteins:

100 mg of fresh castor leaf was ground with 10 ml of distilled water using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant was stored and the residue was re-extracted twice with the same volume of the solvent and the supernatants were pooled. For this, an equal volume of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded. The precipitate was dissolved in 5 ml of 0.1 N sodium hydroxide and 1 ml of this suspension was used for the protein estimation. To this suspension, 5 ml of copper reagent was added and kept for 10 minutes. Later, 0.5 ml of Folin-phenol reagent was added and the mixture was allowed to stand for 30 minutes. Its optical density was read at 570 nm in a photoelectric colorimeter. A standard curve was prepared with Bovine serum albumin (Lowry *et al.*, 1951).

Total phenols:

100 mg of fresh castor leaf was ground with 2-3 drops of ethanol and 10 ml of distilled water using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and the supernatant was collected and used for total phenol estimation.

To 0.5 ml of the sample, 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent was added, followed by 2 ml of 20% sodium carbonate solution. The mixture was shaken vigorously and heated in a boiling water bath for a minute. The solution was cooled under running tap water. Afterwards, the solution was diluted with distilled water to make up the volume to 12.5 ml. The optical density was measured at 650 nm in a photoelectric colorimeter (Bray and Thorpe, 1954). The total phenolic content was calculated using caffeic acid as the standard.

Total soluble sugars and reducing sugars:

500 mg of dried castor leaf powder was ground in 10 ml of 80% methanol using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was saved and the pellet was re-extracted twice with the same volume of the solvent. The pooled supernatant was partitioned with an equal volume of petroleum ether in a separating funnel to remove the chlorophyll pigments. The methanolic layer was used for the determination of total soluble sugars and reducing sugars.

Soluble sugars:

To 1 ml of the above sample, 4 ml of anthrone reagent was added and boiled over a water bath for 10 min. The mixture was allowed to cool down to room temperature. The optical density was measured at 625 nm in a photoelectric colorimeter (Yemm and Willis, 1954). The soluble sugar content was calculated using glucose as the standard.

Reducing sugars:

It was estimated according to the method of Miller (1972). To 3 ml of aliquot of the extract, 3 ml of Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added and the mixture was heated for 5 minutes in a boiling water bath. After the colour development, 1 ml of 40% sodium potassium tartarate (Rochelle's salt) was added when the contents of the tubes were still warm. Later, the tubes were cooled under running tap water and optical density was measured at 575 nm. Using glucose as standard, the amount of reducing sugars was calculated.

All the experimental results were statistically analysed using the 't' test.

RESULTS AND DISCUSSION

All the ten different biochemical components (total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a/b ratio, amino acids, proline, proteins, phenols, soluble sugars and reducing sugars) analysed in the diseased leaves showed a variation depending on the infection. However, all the three fungal infections either increased or decreased the different biochemical components. The data (fig. 1-10) were found to be significant at $P < 0.05$ level.

Total chlorophyll:

The rust disease was seen only in coarse leaves while spot and blight were observed only on the medium leaves. Both *Alternaria* and *Cercospora* infections reduced the total chlorophyll content. The reduction was drastic in *Alternaria* infected leaves compared to healthy ones. The reduction caused due to rust was insignificant (fig. 1).

Chlorophyll a: All the three fungal infections decreased the chlorophyll a content; it was drastic in *Cercospora* infected leaves while rust had decreased the content slightly (fig. 2).

Chlorophyll b: Both *Alternaria* and *Cercospora* had similar effects i.e., they reduced the chlorophyll b content. Rust had a negligible effect (fig. 3).

Chlorophyll a/b ratio: All the three infections reduced the ratio, it was drastic in *Cercospora* affected leaves while rust exercised an insignificant effect (fig. 4).

All the three foliar infections (*Alternaria*, *Cercospora* and rust) reduced the total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b content(s) as well as the chlorophyll a/b ratio in the castor leaves of different maturity. The lowered content of chlorophyll may be due to inhibition of its production by the pathogen(s) (Pero and Main 1970) or metabolic disturbances (Upadhyaya and Dwivedi, 1979) or to the increased activity of chlorophyllase (Kaur and Deshpande, 1980). Of the three diseases, rust had a negligible effect.

Amino acids:

All the three fungal infections decreased the amino acid content in medium and coarse leaves (fig. 5). In general, although all the three fungal pathogens reduced the amino acid content, the proline content in particular was increased drastically only by *Cercospora* and the rust fungus (fig. 6).

Raj Bhansali *et al.*, (1983) observed free proline accumulation in sugarcane leaves infected by *Colletotrichum falcatum* and felt that such accumulation was not necessarily associated with the water stress. The reduction in amino acid could be due to their utilisation in the synthesis of proteins during host - parasite interaction (Chile and Vyas, 1983). Nagaraja (1985) also reported both increase and decrease in the proline content of infected *Strychnos nux-vomica* plants. Although proline is known to protect plants against drought, the exact physiological significance of increased proline during biotic and abiotic stress has not yet been clearly understood.

Total proteins:

All the three fungal diseases studied reduced the total protein content in the medium and coarse leaves. The reduction caused due to *Cercospora* in the medium and rust in coarse leaves was almost the same (fig. 7).

All the three foliar fungal pathogens reduced the total protein content, depending on the maturity of the leaf. The proteins may be degraded or utilised by the pathogens at a faster rate (Samborski *et al.*, 1958).

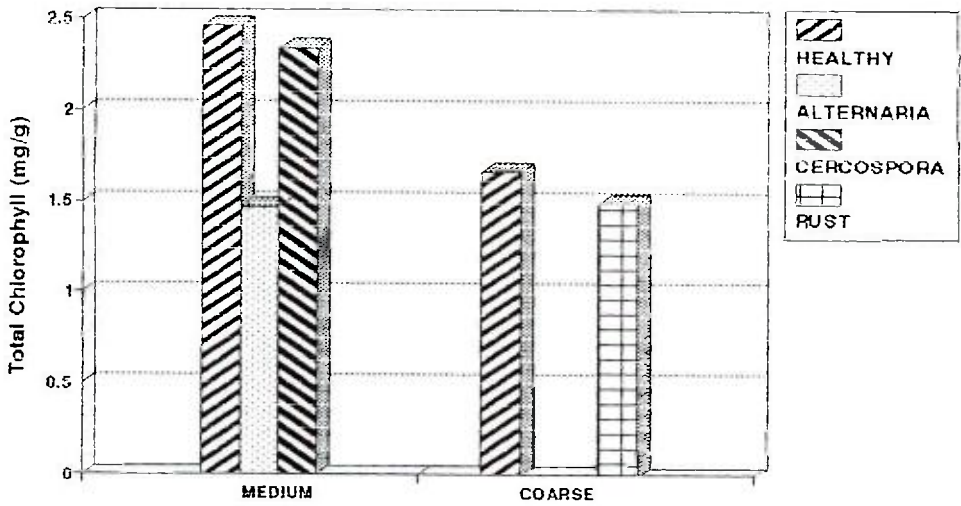


Fig. 1. Total chlorophyll content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 1. Teneur totale en chlorophylle dans les feuilles de ricin saines et malades.

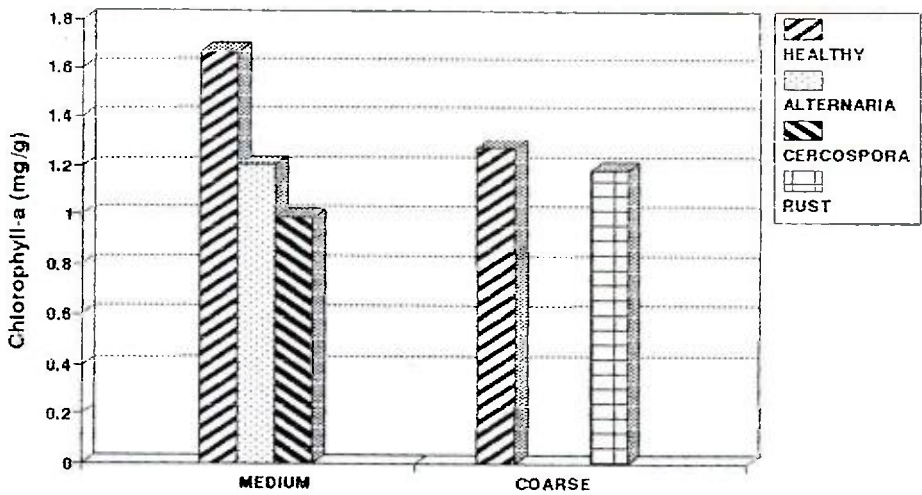


Fig. 2. Chlorophyll-a content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 2. Teneur en chlorophylle-a dans les feuilles de ricin saines et malades.

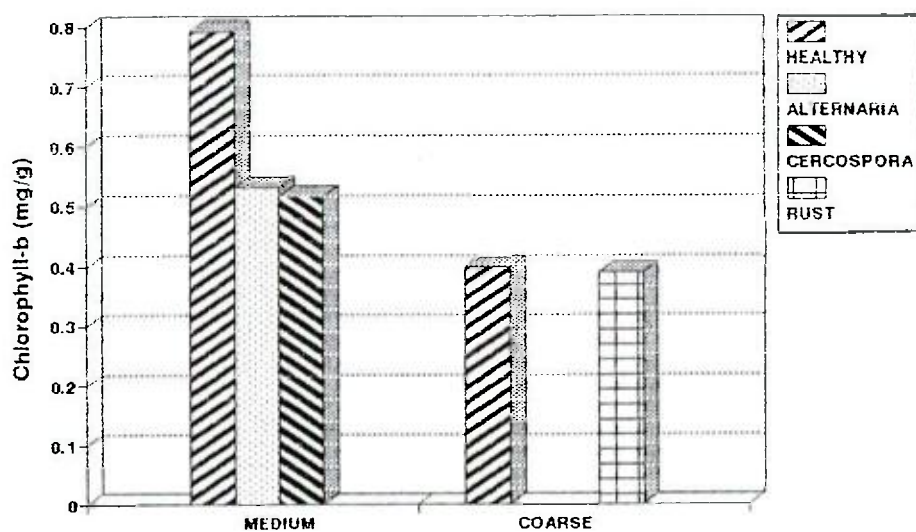


Fig. 3. Chlorophyll-b content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 3. Teneur en chlorophylle-b dans les feuilles de ricin saines et malades.

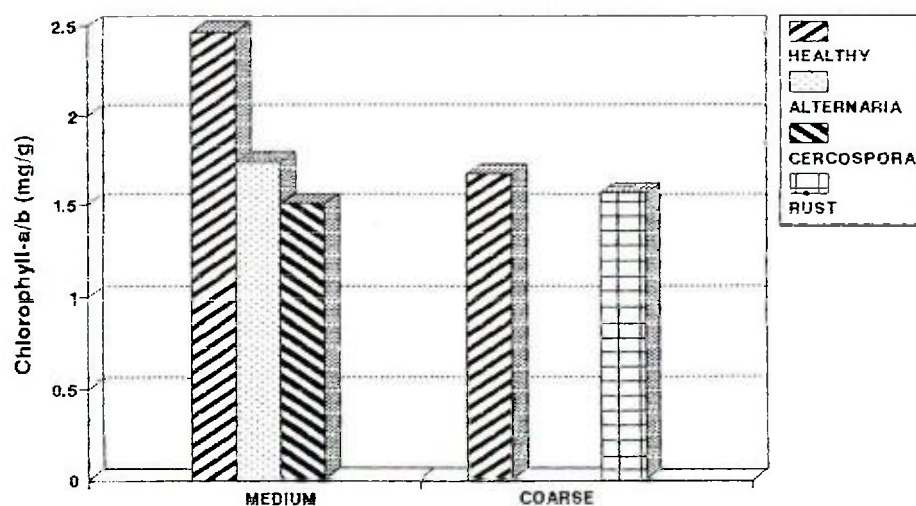


Fig. 4. Chlorophyll-a/b content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 4. Rapport chlorophylle-a/b dans les feuilles de ricin saines et malades.

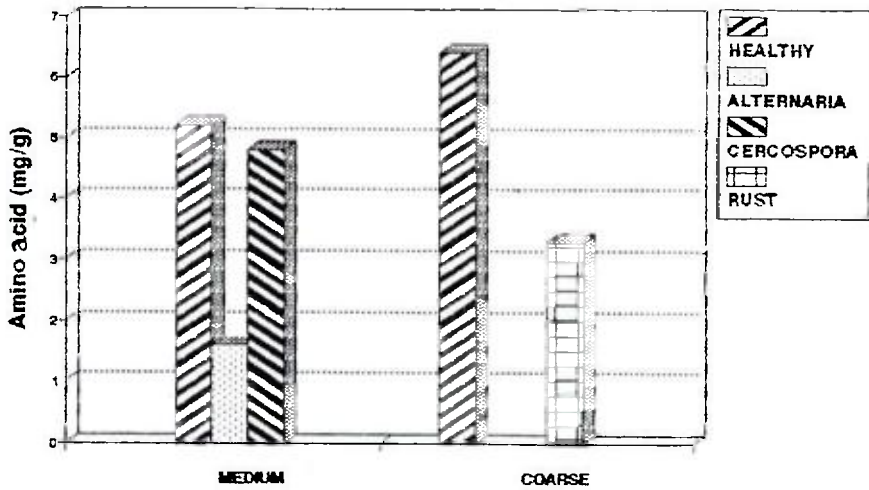


Fig. 5. Amino acid content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 5. Teneur en acides aminés dans les feuilles de ricin saines et malades.

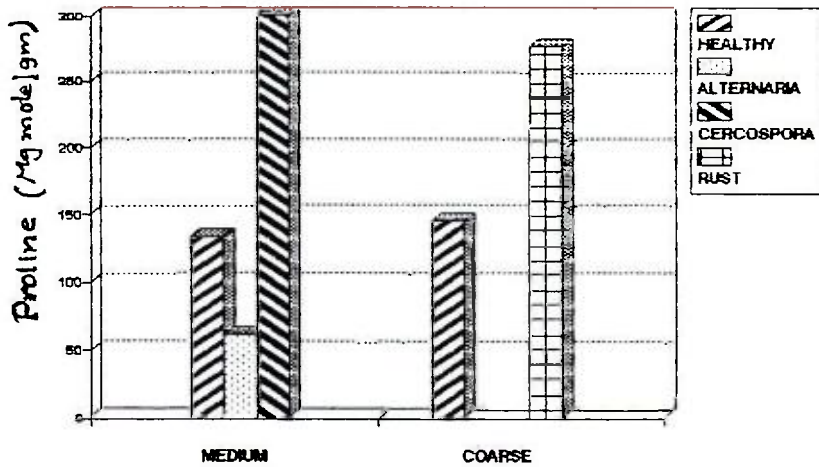


Fig. 6. Proline content in healthy and diseased castor leaves.

Fig. 6. Teneur en proline dans les feuilles de ricin saines et malades.

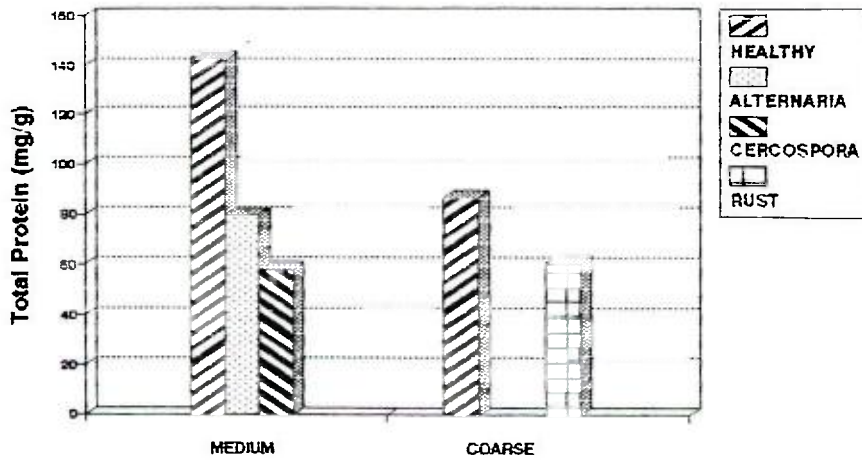


Fig. 7. Total protein content in healthy and diseased castor leaves.
 Fig. 7. Teneur totale en protéines dans les feuilles de ricin saines et malades.

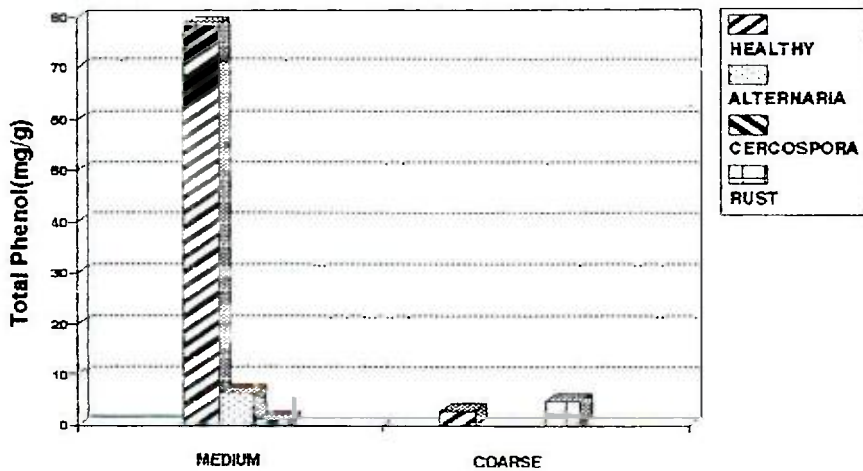


Fig. 8. Total phenol content in healthy and diseased castor leaves.
 Fig. 8. Teneur totale en phénol dans les feuilles de ricin saines et malades.

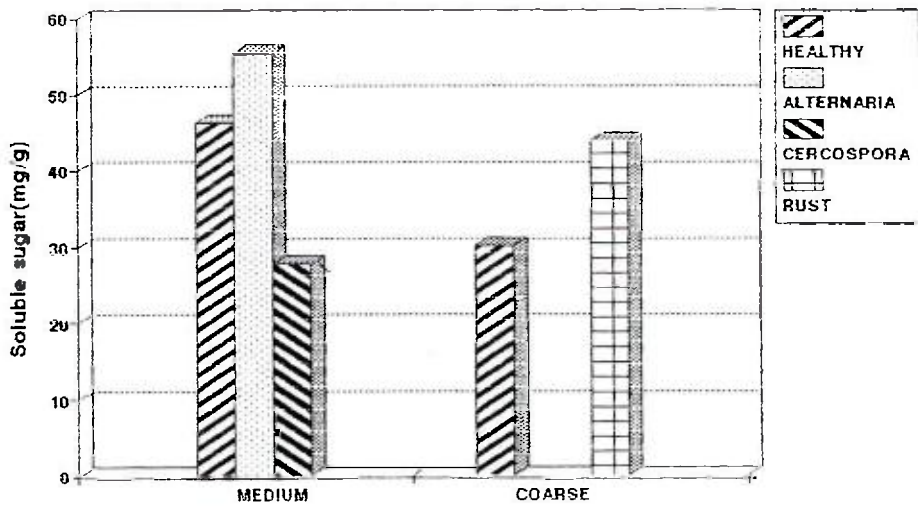


Fig. 9. Soluble sugar content in healthy and diseased castor leaves.
 Fig. 9. Teneur en sucres solubles dans les feuilles de ricin saines et malades.

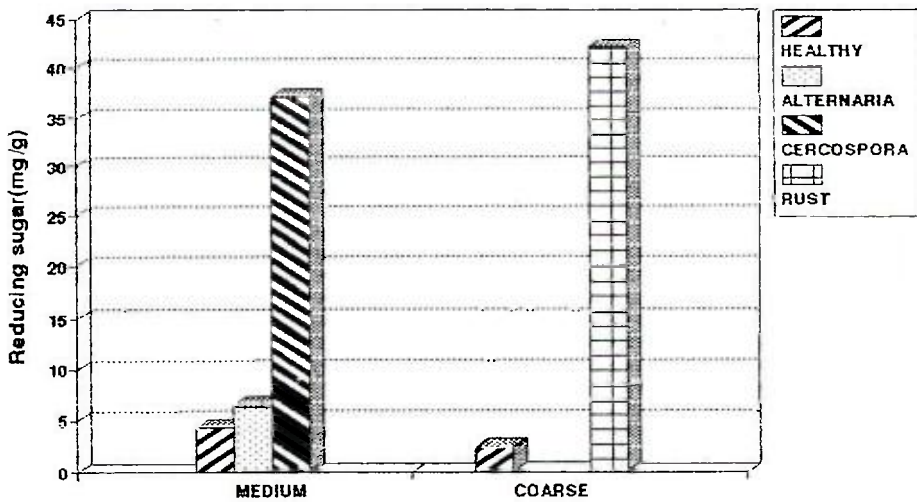


Fig. 10. Reducing sugar content in healthy and diseased castor leaves.
 Fig. 10. Teneur en sucres réducteurs dans les feuilles de ricin saines et malades.

Total phenols:

There was a very highly significant reduction in the total phenolic content of *Alternaria* and *Cercospora* affected medium leaves. While a negligible increase was noticed in rust affected coarse leaves (fig. 8).

The reduction in the total phenolic content was significant with *Alternaria* and *Cercospora* infections but rust increased the content negligibly. The increased activity of polyphenol oxidase results in the oxidation of phenols and is the cause of reduction in the phenolic content (Vidyasekaran, 1974).

Sugars:

The soluble sugar content was increased in *Alternaria* and rust affected medium and coarse leaves respectively while the *Cercospora* infection decreased the content noticeably (fig. 9). It was interesting to record a drastic increase in the reducing sugar content as a response to all the three fungal infections in medium as well as coarse leaves (fig. 10).

Both, soluble sugar (except with the *Cercospora* infection) and reducing sugar contents drastically increased. This could be due to the reduced photosynthetic activity (Thite *et al.*, 1980), or due to the increased activity of invertase and the reduced activity of sucrose synthetase and sucrose-p-synthetase (Mitchell, 1992) while the decrease may be due to the utilisation by the pathogen.

Among the ten biochemical constituents analysed, only the proline and soluble sugar contents were increased due to the fungal attack, while the remaining eight compounds decreased. Such post-infectional chemical changes generally alter the nutritional quality of leaves which when fed to eri silkworms may affect their growth and development. Rearing trials in this regard are in progress to test the effect of feeding diseased leaves to the eri silkworm on cocoon yield and quality characters.

ACKNOWLEDGEMENTS

Chandramma is grateful to Bangalore University for providing financial assistance. Authors thank the Chairman of the Department of Sericulture, Bangalore University, for facilities and encouragement.

REFERENCES

- ARNON D.I. (1949) Copper enzymes is isolated chloroplasts. Polyphenoloxides in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- BRAY H.G., THORPE W.E. (1954) Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Meth. Biochem. Anal. 1:27-52.
- CHILE S.K., VYAS K.M. (1983) Free amino acids in relation to Phytophthora leaf rot pathogenesis of *Piper betle*. Indian Phytopath. 36:721-722.
- HISCOX, ISRAELSTAM G.F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Botany. 57:1332-1334.
- KAUR M., DESHPANDE K.B. (1980) Photosynthetic activity of Cowpea plants infected with *Erysiphae polygani*. Indian Phytopath. 32(2):344-345.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FAN A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 266-275.
- Md. ISA., YADAV G.S., PRASAD D.N., SINHA S.S. (1994) Effect of leaf harvest on the seed yield of castor, *Ricinus communis* L. Indian J. Seric. 33(1): 76-77.
- MAHADEVAN A., SRIDHAR R. (1986) Methods in physiological plant Pathol. Shivakami Publishers Madras (6-7).
- MITCHELL D.T. (1982) Invertase activity in leaf tissue susceptible and resistance to wheat stem rust. Trans. Bri. Mycol. Sci., 78(1):173-176.

- MILLER G.L. (1972) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- MOORE S., STEIN W. H. (1948) Photometric method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176:367-388.
- NAGARAJA T. G. (1995) Some biochemical changes in the leaves of *Strychnos nux-vomica* during infection of a leaf curl virus. Ad. Plant. Sci. 8(2): 258-260.
- PERO R., MAIN C. (1970) Chlorosis of tobacco induced by Alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. Phytopath. 60: 1570-1573.
- RAJ BHANSALI R. (1983) Accumulation of free proline in sugarcane leaves infected with *Colletotrichum falcatum*. 36: 367-368.
- * SAMBORSKI D.J., FORSYTH, PARSON C. (1958) Can. J. Bot., 36: 591-601.
- THITE A.N., CHAVAN P.D., KARADGE B.A.(1980) Some biochemical changes in teak leaves infected with powdery mildew fungus. Indian J. Mycol and pl. pathol. 10(2): 131-135.
- UPADHYAYA P.K., DWIVEDI R.S. (1979) Biochemical changes in leaf of *Eucalyptus globulus* infected with *Pestalopsis funerea*. Phytopath. 32(3) 434-437.
- VIDHYASEKARAN P. (1974c) Changes in phenolic contents in ragi leaves due to susceptible disease reactions. Indian J. Expt. biol., 12: 592-593.
- YEMM K.W., WILLS A.J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical J. 57: 508-514.
- * Original not seen.

CHANGEMENTS BIOCHIMIQUES DANS LES FEUILLES DE RICIN ATTEINTES PAR DES MALADIES FONGIQUES

M. P. SHREE, CHANDRAMMA & C. M. VENKATESH

Department of Sericulture, Jnana Bharati Campus, Bangalore University,
Bangalore - 560 056, Inde.

La feuille de ricin est la nourriture principale du ver à soie eri. La bonne croissance et le développement du ver eri et en conséquence le rendement en cocons eri dépendent de la qualité des feuilles de ricin. Mais, comme n'importe quelle autre plante de culture, le ricin est aussi atteint par de nombreuses maladies fongiques parmi lesquelles la rouille, la tache et la flétrissure sont les plus courantes et les plus destructrices. Les vers n'aiment pas les feuilles tachées et souffrent quand on les nourrit avec. Ainsi, on a pensé qu'il était utile de connaître les changements biochimiques post-infectieux dans les feuilles de ricin infestées par des pathogènes fongiques. Les contenus totaux en chlorophylle, chlorophylle a, chlorophylle b, en acides aminés, en proline, en protéines totales, en phénols, en sucres solubles et réducteurs des feuilles de ricin saines et infestées ont été estimés. Les trois maladies fongiques entraînent une baisse ou une augmentation des contenus biochimiques à différents degrés. Ces changements donnent probablement des feuilles de ricin de qualité inférieure.

INTRODUCTION

Le ricin est cultivé principalement pour la récolte de ses graines pour l'huile tout comme culture alternée dans différentes régions de l'Inde. Dans les parties du nord-est de l'Inde, il n'y a pas de culture régulière du ricin et il est principalement cultivé pour l'élevage du ver à soie eri. Quand le ricin est seulement élevé pour l'ériculture il est à peine rentable à cause de son coût de culture élevé, mais lorsqu'il est cultivé à la fois pour l'ériculture et pour ses graines, il devient légèrement rentable (Md. Isa et coll., 1994).

On sait que le ricin subit des pertes importantes à cause de maladies provoquées par des champignons et des bactéries. Les trois maladies suivantes s'avèrent les plus courantes et les plus destructrices.

i) La maladie de la rouille est provoquée par un biotrophe (parasite obligé) *Melampsora ricini*. Il appartient à la classe des Basidiomycetes, l'ordre des Uredinales et à la famille des Melampsoraceae.

Les feuilles atteintes par la rouille présentent des pustules minuscules et nombreuses jaune orangé sur les surfaces inférieures. Des spores jaune orangé apparaissent lors de la rupture de l'épiderme. La surface supérieure correspondante de la feuille présente une décoloration jaune. Dans le cas d'une infestation importante, les feuilles deviennent jaune, ont tendance à sécher et tombent.

ii) La maladie de la tache de la feuille est provoquée par *Cercospora ricinella*. Il appartient à la classe des Deuteromycetes, à l'ordre des Moniliales et à la famille des Dematiaceae. La maladie apparaît sous forme de points noirs ou marron minuscules entourés par un cercle vert pâle. Alors que les points grandissent, le centre devient marron pâle puis blanc gris et est entouré par une bande marron foncé. La fructification du champignon entraîne l'apparition de petits points noirs dans le centre blanc. Les points sont souvent présents en grand nombre et sont éparpillés sur les feuilles. Ils sont ronds quand ils sont jeunes, mais peuvent devenir irrégulièrement angulaires quand ils sont matures. Quand

les points sont près les uns des autres le tissu veiné de la feuille se flétrit et cela peut entraîner de grands pans marron de feuille desséchée.

iii) La maladie de la flétrissure est causée par *Alternaria ricini*. Il appartient à la classe des Deuteromycetes, ordre des Moniliales et famille des Dematiaceae. Toutes les parties aériennes de la plante, c'est à dire la tige, les feuilles, l'inflorescence et les capsules sont susceptibles d'être atteintes. La maladie fait son apparition d'abord sur les cotylédons sous la forme de points. Ces points deviennent nombreux sur le feuillage pendant la saison des pluies. Ils sont irréguliers, marron, dispersés et apparaissent en cercles concentriques et sont plus tard recouverts par une croissance fuligineuse. Quand l'attaque est sévère, les points se fondent et forment de grandes plaques, ce qui entraîne la défoliation prématurée de la plante.

Les feuilles de ricin de bonne qualité étant essentielles pour les vers éri et donc pour obtenir un bon rendement en cocons de qualité, nous avons essayé d'analyser les changements post-infectieux biochimiques dans les feuilles de ricin atteintes par les maladies fongiques mentionnées ci-dessus.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles de ricin saines et malades (rouille, tâche et flétrissure) sont recueillies sur des plantations dans et autour de Bangalore. Les différents contenus biochimiques du matériel foliaire sain et malade (voir ci-dessus) sont analysés en utilisant les méthodes suivantes :

Chlorophylle totale :

L'extraction de la chlorophylle totale dans les feuilles fraîches a été réalisée sans macération en suivant la méthode d'Hiscox et Israelstam (1979). 50 mg de tissu foliaire frais sont placés dans une fiole en verre contenant 7 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) et la chlorophylle est extraite dans le fluide à 65° C dans un four électrique pendant 3 heures. Le liquide extrait est transféré dans une éprouvette graduée et complété jusqu'à un volume de 10 ml avec du DMSO, dosé immédiatement ou transféré dans des fioles et stocké entre 0° et 4° C jusqu'à l'analyse.

La chlorophylle totale, la chlorophylle-a et la chlorophylle-b sont estimées en utilisant la méthode d'Arnon (1949). Un échantillon d'extrait de chlorophylle de 5 ml est transféré dans une cuve et les valeurs de densité optique à 645 et 663 nm sont lues dans un spectrophotomètre Systronic 118 contre un blanc DMSO. Le contenu en chlorophylle est calculé en utilisant l'équation ci-dessous (Mahadevan et Sridhar, 1986).

$$\text{Chlorophylle totale} = 20,2(D_{645}) + 8,02(D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times \text{poids de la feuille (g)}}$$

$$= \text{mg de chlorophylle totale / g de poids frais.}$$

$$\text{Chlorophylle-a} = (12,7 \times D_{663}) - (2,67 \times D_{645}) \times \frac{V}{1000 \times \text{poids de la feuille (g)}}$$

$$= \text{mg de chlorophylle-a totale / g poids frais.}$$

$$\text{Chlorophylle-b} = (22,9 \times D_{645}) - (4,68 \times D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times \text{poids de la feuille (g)}}$$

$$= \text{mg de chlorophylle-b totale / g poids frais}$$

Où :

V = Volume de l'extrait

D = Densité optique

P = Poids

g = gramme

Acides aminés :

50 mg de poudre de feuille de ricin fraîche sont broyées dans 5 ml de méthanol à 80 % en utilisant un mortier et un pilon. L'homogénat est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 minutes. Le surnageant est partitionné avec un volume égal d'éther de pétrole pour enlever les pigments des chloroplastes. La couche méthanolique est utilisée pour l'estimation en acides aminés et en proline (Moore et Stein, 1948). On ajoute à 0,5 ml de l'échantillon 0,5 ml de propanol dans de l'eau distillée (1:1), suivi par 1 ml de réactif ninhydrine (préparé en mélangeant de la ninhydrine 1 % dans du tampon citrate à 0,5 M). Le mélange est bouilli dans un bain marie pendant 20 minutes. La solution est refroidie et l'intensité de la couleur violette est lue à 570 nm. Le contenu en proline est mesuré à 440 nm dans un colorimètre photo-électrique. La glycine est utilisée comme étalon.

Protéines solubles totales :

100 mg de feuilles de ricin fraîches sont broyées avec 10 ml d'eau distillée en utilisant un mortier et un pilon. L'homogénat est centrifugé à 3000 tpm pendant 15 minutes. Le surnageant est stocké et le résidu est re-extrait deux fois avec le même volume de solvant et les surnageants sont regroupés. Un volume égal d'acide trichloroacétique à 10 % est ajouté et le mélange est centrifugé à 5000 tpm pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté. Le précipité est dissous dans 5 ml d'hydroxyde de sodium à 0,1 N et 1 ml de cette suspension est utilisé pour l'estimation des protéines. A cette suspension, sont ajoutés 5 ml de réactif de cuivre pendant 10 minutes. Plus tard 0,5 ml de réactif phénol-Folin sont ajoutés et le mélange est laissé au repos pendant 30 minutes. Sa densité optique est lue à 570 nm dans un colorimètre photo-électrique. Une courbe d'étalonnage est préparée avec de l'albumine de sérum bovine (Lowry et coll., 1951).

Phénols totaux :

100 mg de feuilles de ricin fraîches sont broyées avec 2-3 gouttes d'éthanol et 10 ml d'eau distillée en utilisant un mortier et un pilon. L'homogénat est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 minutes et le surnageant est recueilli et utilisé pour l'estimation en phénols totaux.

A 0,5 ml d'échantillon sont ajoutés 0,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu, suivis par 2 ml de solution de carbonate de sodium à 20 %. Le mélange est remué vigoureusement et chauffé dans un bain marie bouillant pendant une minute. La solution est refroidie sous l'eau du robinet. Après, la solution est diluée avec de l'eau distillée pour augmenter le volume jusqu'à 12,5 ml. La densité optique est mesurée à 650 nm dans un colorimètre photoélectrique (Bray et Thorpe, 1954). La teneur phénolique totale est calculée en utilisant de l'acide caféique comme étalon.

Sucres solubles totaux et sucres réduits :

500 mg de poudre de feuille de ricin sèche sont broyées avec 10 ml de méthanol à 80 % en utilisant un mortier et un pilon. L'homogénat est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 minutes. Le surnageant est conservé et le culot est re-extrait deux fois avec le même volume de solvant. Le surnageant regroupé est partitionné avec un volume égal d'éther de pétrole dans une ampoule à décanter pour enlever les pigments de chlorophylle. La couche méthanolique est utilisée pour la détermination des sucres solubles et des sucres réduits.

Sucre solubles :

A 1 ml de l'échantillon ci-dessus, sont ajoutés 4 ml de réactif d'anthrone que l'on met dans un bain marie bouillant pendant 10 minutes. On laisse le mélange refroidir à température ambiante. La densité optique est mesurée à 625 nm dans un colorimètre photoélectrique (Yemm et Willis, 1954). La teneur en sucres solubles est calculée en utilisant du glucose comme étalon.

Sucres réducteurs :

Il sont estimés d'après la méthode de Miller (1972). A 3 ml d'une aliquote d'extrait sont ajoutés 3 ml de réactif d'acide dinitrosalicylique (DNS) et le mélange est chauffé pendant 5 minutes dans un

bain marie bouillant. Après le développement de la couleur, 1 ml de tartrate de potassium et sodium à 40 % (Sel de Rochelle) est ajouté quand le contenu des tubes est encore chaud. Plus tard, les tubes sont refroidis sous l'eau du robinet et la densité optique est mesurée à 575 nm. La quantité en sucres réducteurs est calculée en utilisant le glucose comme étalon.

Tous les résultats expérimentaux sont analysés de manière statistique en utilisant le test « t ».

RESULTATS ET DISCUSSION

Les dix différents composants biochimiques (chlorophylle totale, chlorophylle-a, chlorophylle-b, rapport chlorophylle a/b, acides aminés, proline, protéines, phénols, sucres solubles et sucres réduits) analysés dans les feuilles malades présentent une variation dépendant de leur infestation. Cependant, les trois infestations fongiques augmentent ou baissent les différents composants biochimiques. Les données (fig 1-10) s'avèrent significatives au seuil de $P < 0,05$.

Chlorophylle totale :

La maladie de la rouille n'est enregistrée que dans les feuilles épaisses tandis que la tâche et la flétrissure ne sont observées que dans les feuilles moyennes. Les infestations *Alternaria* et *Cercospora* réduisent toutes les deux la teneur en chlorophylle totale. La baisse est importante dans les feuilles infestées par *Alternaria* par rapport à celles qui sont saines. La baisse due à la rouille est insignifiante (fig. 1).

Chlorophylle-a : les trois infestations fongiques baissent la teneur en chlorophylle-a ; la baisse est radicale dans les feuilles infestées par *Cercospora* tandis que la rouille n'en baisse que légèrement le contenu (fig. 2).

Chlorophylle-b : *Alternaria* et *Cercospora* ont toutes les deux des effets similaires, c'est à dire qu'elles baissent le contenu en chlorophylle-b. La rouille a un effet négligeable (fig. 3).

Rapport chlorophylle a/b : les trois infestations réduisent le rapport, de manière radicale pour les feuilles infestées par *Cercospora* tandis que la rouille exerce un effet insignifiant (fig. 4).

Les trois infestations foliaires (*Alternaria*, *Cercospora* et la rouille) baissent le(s) contenu(s) en chlorophylle totale, chlorophylle a, chlorophylle-b tout comme le rapport a-b dans les feuilles de ricin de maturité différente. La baisse de la teneur en chlorophylle est peut-être due à l'inhibition de sa production par le(s) pathogène(s) (Pero et Main 1970) ou à des troubles métaboliques (Upadhyaya et Dwivedi, 1979) ou à l'activité en hausse de la chlorophyllase (Kaur et Deshpande, 1980). Des trois maladies, la rouille a un effet négligeable.

Acides aminés :

Les trois infestations fongiques réduisent la teneur en acides aminés des feuilles moyennes et épaisses (fig. 5). En général, bien que les trois pathogènes fongiques baissent la teneur en acides aminés, le contenu en proline en particulier n'augmente radicalement qu'avec *Cercospora* et le champignon de la rouille (fig. 6).

Raj Bhansali et coll., (1983) ont observé l'accumulation de proline libre dans les feuilles de canne à sucre infestées par *Colletotrichum falcatum* et ont pensé qu'une telle accumulation n'était pas nécessairement associée au stress hydrique. La baisse en acides aminés pourrait être due à leur utilisation dans la synthèse des protéines pendant l'interaction hôte-parasite (Chile et Vyas, 1983). Nagaraja (1985) a aussi signalé une augmentation et une baisse du contenu en proline dans les plantes infestées par *Strychnos nux-vomica*. Bien que la proline protège les plantes contre la sécheresse, on ne comprend toujours pas clairement la signification physiologique exacte de la hausse de la proline pendant l'agression biotique et abiotique.

Ensemble des protéines :

Les trois maladies fongiques étudiées baissent le contenu en protéines totales dans les feuilles moyennes et épaisses. La baisse due à *Cercospora* dans les feuilles moyennes et à la rouille dans les feuilles épaisses est presque la même (fig. 7).

Les trois pathogènes foliaires fongiques baissent la teneur en protéines totales, en fonction de la maturité de la feuille. Les protéines sont peut-être dégradées ou utilisées par les pathogènes à un taux plus rapide (Samborski et coll., 1958).

Ensemble des phénols :

Il y a eu une réduction hautement significative du contenu phénolique total dans les feuilles moyennes atteintes par *Alternaria* et *Cercosporora*. Tandis qu'on observe une hausse négligeable dans les feuilles épaisses atteintes par la rouille (fig. 8).

La baisse de la teneur en phénols totaux est significative avec les infestations *Alternaria* et *Cercospora* mais la rouille augmente la teneur de manière négligeable. L'augmentation de l'activité de la polyphénol oxydase entraîne l'oxydation des phénols et provoque la baisse du contenu phénolique (Vidyasekaran, 1974).

Sucres :

La teneur en sucres solubles augmente dans les feuilles moyennes et épaisses atteintes respectivement par *Alternaria* et la rouille tandis que l'infestation *Cercospora* réduit sensiblement la teneur (fig. 9). Il est intéressant d'enregistrer une augmentation radicale du contenu en sucres réduits et une réponse aux trois infestations fongiques dans les feuilles moyennes tout comme dans les feuilles épaisses (fig. 10).

Les teneurs en sucres solubles et en sucres réducteurs augmentent toutes les deux (sauf avec l'infestation *Cercospora*). Cela pourrait être dû à la baisse de l'activité photosynthétique (Thite et coll., 1980) ou à la hausse de l'activité de l'invertase et à la baisse de l'activité de la sucrose synthétase et de la p-sucrose-synthétase (Mitchell, 1992) tandis que la baisse est peut-être due à son utilisation par le pathogène.

Parmi les 10 constituants biochimiques analysés, seules les teneurs en proline et en sucres solubles augmentent avec l'attaque fongique, tandis que les huit autres composants diminuent. De tels changements chimiques post-infectieux altèrent généralement la qualité nutritionnelle des feuilles ce qui peut avoir un effet sur la croissance et le développement du ver eri quand il est nourri avec. Des essais d'élevage dans ce sens sont en cours pour tester l'effet du nourrissage du ver eri avec des feuilles malades sur le rendement en cocons et les caractères de qualité.

STUDIES ON REARING PERFORMANCE OF MUGA SILKWORM (*ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD) ON DIGHLOTI (*LITSAEA SALICIFOLIA* ROXB.)

B. GOGOI* & B. C. GOSWAMI

Department of Botany, Gauhati University, Guwahati - 781014, Assam, India.

Rearing performance of the silkworm is a measure said to evaluate the quality of the host plants. The muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood) was found on the dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) plants in their wild habitat more than once, although in the semi-domesticated condition muga silkworms are usually reared on Som (*Persea bombycina* King) and Soalu (*Litsaea monopetala* (Roxb.) Pers.). For the obvious reason of the wild nature of the muga silkworm, a rearing program of both the semi-domesticated and wild type muga silkworm on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) plant was undertaken and the feeding behaviour of the insect was studied carefully. The present study could not record any remarkable variations in the semi-domesticated muga silkworms on their fecundity, hatchability, E.R.R. and silk ratio per cent between dighloti and published data of som and soalu fed insects. Though the fecundity of the wild muga has been found to be comparatively lower, the hatchability, E.R.R. and silk ratio per cent have been significantly higher than for the cultivated type.

Keywords: Muga silkworm, rearing performance, *Litsaea salicifolia* Roxb.

INTRODUCTION

The lustrous golden yellow muga silk is a dominant natural product produced only in India in the North-Eastern states, particularly in the Brahmaputra valley of Assam. The muga silk is produced by the rarest muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood in the Brahmaputra valley of North-East India, which is most important and precious among the non-mulberry silkworms. The North-Eastern region of India is a peculiar biosphere where muga silkworm and its various host plants abundantly grow only in this eco-climatic region of the world. Therefore, muga silkworms and their various host plants are a unique wealth of the world.

The muga silkworm is a multivoltine, polyphagous and semi-domesticated insect which thrives very well only in the open air outdoor culture. It feeds on various primary, secondary and tertiary host plants. Som (*Persea bombycina* King) and Soalu (*Litsaea monopetala* (Roxb.) Pers.) are the two primary host plants of the muga silkworm. The most important among the secondary host plants is the dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) which is a small evergreen bushy shrub and is found abundantly in the natural habitat in Assam. The dighloti plant has some advantages for muga silkworm rearing because it suitably supports net rearing throughout the year. This plant offers other advantages such as: supervision is convenient due to its evergreen and bushy nature, it responds well to pruning, clonal propagation is easy through cuttings and air-layerings (Gogoi and Goswami, 1996) and the advantage of rearing the early stage, late hatched and weak worms. Dighloti is also authenticated as a primary food plant of the tetravoltine wild eri silkworm, *Philosamia cynthia* (Gogoi and Goswami, 1994). The

* Present address: Department of Botany, Sonari College, Sonari - 785690, Sibsagar, Assam, India.

wild bivoltine Kotkori muga (*Attacus atlas*) was also collected by us from the dighloti plant from the forest areas. The wild counterpart of *Antheraea assama* Westwood was found and collected from the forest exclusively from dighloti plants.

Despite tremendous potentialities offered by this plant for the development of the muga silk industry, the dighloti has been neglected so far due to lack of scientific information based on the feeding behaviour and rearing performance of the muga silkworm on it. The present investigation, therefore, was undertaken to study the feeding behaviour and rearing performance of both, the semi-domesticated *Antheraea assama* Westwood and its wild counterpart (found on dighloti in the wild habitat) on dighloti plants in the four different seasons of the year.

MATERIALS AND METHODS

Dighloti fed healthy cocoons of semi-domesticated muga silkworm have been collected from a private rearer from Sapekhathi, Assam and from its wild counterpart from the forest. The present experimental rearing was conducted on three years old dighloti plants during 1994 at a private dighloti farm at Sonari, in the Sibsagar district of Assam. Layings of both types were prepared by ourselves in domestic conditions. The established and normal open air rearing procedure was then followed for both the semi domesticated and wild type muga silkworm. Of course, nylon nets were used over the dighloti bushes to protect the silkworms from pests and predators. Two commercial broods namely Jethua (April/May) and Kotia (Oct./Nov.) and two seed broods i.e. Aherua (June/July) and Bhodia (Aug./Sept.) were studied for the semi-domesticated type and only Jethua (April/May) was studied for its wild counterpart because the emergence of male and female moths did not synchronise which created problems for mating to continue subsequent broods. During the study careful observations were made which were recorded, evaluated and analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

The rearing performance during different broods along with cocoon quality and meteorological data are presented in Table 1. The fecundity of dighloti fed semi-domesticated muga silkworm ranges between 150-250 eggs per laying. The fecundity of its wild counterpart was found to be 200 eggs per laying in the spring brood. The hatching percentage of the semi-domesticated type was found to be minimum in the summer brood i.e. 85.12% and maximum in the spring brood i.e. 95.30 %. The hatchability was recorded 98.11% for the wild type in the spring brood. The highest E.R.R. for the semi-domesticated has been recorded as 70.51% in the autumn brood followed by 65.52% in spring, 48.62% in late summer and 45.50% in summer. The E.R.R. has been recorded to be 75.25% for the wild type in the spring brood. The larval period of the domesticated silkworm was found to have varied in different seasons ranging from a minimum of 23 days in summer and a maximum of 32 days in spring. The wild silkworms however took 5 days less than the semi-domesticated worms in the spring season. The silk ratio per cent of the semi-domesticated type has been found to be the highest (9.28%) in the autumn season followed by 8.64% in spring, 8.14% in late summer and 7.76% in summer. The silk ratio percent of the wild type in the spring season has been recorded to be 10.34% which is significantly higher than the semi-domesticated type. The silk ratio per cent of dighloti fed male cocoons has been found to be higher in all the seasons studied.

S. N. Chaudhury (1981) reported that fecundity of som fed muga silkworm ranges between 200-250. J. K. Gogoi (1984) reported fecundity to range between 150-200 and Yadav and Goswami (1987) reported fecundity of som fed muga silkworm to range between 140-245 and that of the soalu fed muga silkworm to range between 100-205. It is clear from our present investigation that the fecundity of the dighloti fed muga silkworm is almost similar to that of the som and soalu fed muga silkworm. The highest hatchability i.e. 95.0% was recorded in the som fed muga silkworm in May/June by J. K. Gogoi (1984) and 80.00% in the Soalu fed muga silkworm in May/June by Yadav and Goswami (1987).

Table I. Rearing performance of semi-domesticated and wild muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood) in different seasons.Tableau I. Performance d'élevage du ver à soie muga semi-domestiqué et sauvage (*A. assama* Westwood) pendant différentes saisons.

Brood or season	Muga silkworm species	Fecundity (No. of eggs / laying)	Hatching (percent)	E.R.R. (percent)	Larval period (days)	Quality of cocoons / Qualité des cocons					
						Male / Mâle			Female / Femelle		
						C.W. (g)	S.W. (g)	S.R. (%)	C.W. (g)	S.W. (g)	S.R. (%)
Génération ou saison	Type de ver à soie muga	Fécondité (nbre. d'œufs par ponte)	Éclosion (pourcent)	E.R.R. (pourcent)	Durée larvaire (jours)						
<i>Jethua</i> or spring (April/may)	Wild / Sauvage	200	98.11	75.20	27	5.80	.60	10.34	7.95	.70	8.80
<i>Jethua</i> ou printemps (Avril/mai)	Semidomesticated / Semidomestiqué	250	95.30	65.25	32	5.55	.48	8.64	7.80	.60	7.69
<i>Aherua</i> or summer (June / July)	"	175	85.12	45.50	23	5.15	.40	7.76	7.50	.78	6.4
<i>Aherua</i> ou été (Juin/juillet)											
<i>Bhodia</i> or late summer (Aug./Sept.) "	"	150	90.23	48.62	24	5.40	.44	8.14	7.55	.52	6.88
<i>Bhodia</i> ou fin de l'été (Août/sept.)											
<i>Kotia</i> or autumn (Oct./Nov.)		205	94.50	70.51	25	5.60	.52	9.28	7.85	.65	8.28
<i>Kotia</i> ou automne (Oct./Nov.)											
Abiotic factors / Facteurs abiotiques											
Brood / season Covée / saison		Temperature (° C)		Relative humidity (%) Humidité relative						Rainy days Jours de pluie	
		Max.	Min.	Max.	Min.						
Spring (April/may) / Printemps (Avril / mai)		31.5	28.2	76.5	63.5					14	
Summer (June/July) / Été (Juin / juillet)		34.4	29.2	87.5	80.5					30	
Late summer (Aug./ Sept.) / Fin de l'été (Août/sept.)		32.5	27.5	90.1	81.5					28	
Autumn (Oct./nov.) / Automne (Oct./nov.)		26.5	18.5	84.5	68.5					13	

Abbreviations / Abréviations : E.R.R.: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage. C.W.: Cocoon weight / Poids du cocon. S. W.: Shell weight / Poids de la coque. S.R.: Silk ratio / Richesse soyeuse.

But in our present investigation the highest hatching percentage was found to be 95.30% in April/May in the semi-domesticated type and 98.11% in the wild type. Yadav and Goswami (1987) reported 83.25% E.R.R. in soalu fed muga silkworms in May/June but the E.R.R. of the dighloti fed semi-domesticated muga silkworm has been recorded to be 70.51% in Oct./Nov. The silk ratio per cent has been reported highest i.e. 10.23% by Yadav and Goswami (1991) in som fed male cocoons in Oct./Nov. In our present investigation the silk ratio per cent has been found to be the highest in the wild type male cocoons i.e. 10.34% followed by 19.28% in the male cocoons of the semi-domesticated type. It has to be noted that since this study is a pioneering work on comparison between the rearing of the wild and of the semi-domesticated muga-silkworm, further study is needed to authenticate the results with statistical analysis which has not been presented in this work.

In the present investigation though certain variabilities on fecundity, hatchability, E.R.R. and silk ratio per cents from published data of som and soalu fed worms were compared in different seasons with that of dighloti fed muga silkworms the differences were not significant. So, it may well augur that the dighloti can be commercially raised and recommended as an apparently viable primary food plant of the muga silkworm particularly for rearing the autumn commercial brood, of course other parameters regarding silk production and quality have to be studied on dighloti fed muga silkworms. Dighloti plants can thus equally be used for seed cocoon production also. Moreover, the wild counterpart of *Antheraea assama* Westwood can be maintained on the dighloti plant in the germplasm bank for future breeding programs. The present study provides the basis for further investigation on the wild counterpart of the muga silkworm. It may facilitate the planning of muga silkworm breeding for further development of improved muga silkworm breeds.

REFERENCES

- CHAUDHURY S.N. (1981) Muga silk industry, 1st ed. 178, Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam, Guwahati, Assam, India.
- GOGOI J. K. (1984) A practical hand book of eri and muga culture. 1st ed., 217, published by R.K. Gogoi, Titabor, Assam, India.
- GOGOI B., GOSWAMI B.C. (1994) Studies on *Philosamia cynthia* a tetravoltine wild eri silkworm with special reference to its feeding behaviour on dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.), Proceedings of the Annual Technical Session, Assam Science Society, Guwahati, Assam, India, 50.
- GOGOI B., GOSWAMI B. C. (1996) Conservation of muga silkworm food plants with special reference to Dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.), Vasundhara, 1: 94-97.
- YADAV G.S., GOSWAMI B. C. (1987) Golden muga silk in Mizoram, Indian silk, XXVI(2), 14-15.
- YADAV G.S., GOSWAMI B.C. (1991) The association of cocoon weight and shell weight of muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood) during the commercial broods, J. Ecotoxicol. and Environ. Monit. 1(2), 110-116.

ETUDES DE LA PERFORMANCE D'ELEVAGE DU VER A SOIE MUGA (*ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD) SUR DIGHLOTI (*LITSAEA SALICIFOLIA* ROXB.)

B. GOGOI* & B. C. GOSWAMI

Department of Botany, Gauhati University, Guwahati - 781014, Assam, Inde.

La performance d'élevage du ver à soie est une mesure censée évaluer la qualité des plantes hôtes. Le ver à soie muga (*Antheraea assama* Westwood) a été trouvé plusieurs fois sur les plantes dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) dans son habitat sauvage, bien que dans les conditions semi-domestiquées les vers à soie muga sont en général élevés sur Som (*Persea bombycina* King) et Soalu (*Litsaea monopetala* (Roxb.) Pers). En raison de la nature sauvage du ver à soie muga, un programme d'élevage du ver à soie muga à la fois semi-domestiqué et sauvage a été entrepris sur la plante dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) et le comportement alimentaire de l'insecte a été étudié avec soin. Cette étude n'a pas permis d'enregistrer de variations remarquables entre les vers à soie semi-domestiqués élevés sur dighloti et les données publiées sur les insectes nourris sur Som et Soalu, en ce qui concerne la fécondité, l'éclosion, le taux effectif d'élevage (E.R.R) et la richesse soyeuse. Bien que la fécondité du muga sauvage ait été trouvée comparativement plus faible, l'éclosion, le taux effectif d'élevage et la richesse soyeuse sont significativement plus élevés que chez le type cultivé.

INTRODUCTION

La soie muga lustrée d'un jaune doré est un produit naturel dominant produit seulement dans les états du nord-est en Inde, en particulier dans la vallée du Brahmaputré dans l'Assam. La soie muga est produite par le ver à soie muga des plus rares, *Antheraea assama* Westwood, très important et très précieux parmi les vers à soie non mûrier, dans la vallée du Brahmaputré dans le nord-est de l'Inde. La région du nord est de l'Inde est une biosphère particulière où le ver à soie muga et ses plantes hôtes variées poussent abondamment seulement dans ces conditions éco-climatiques. Les vers à soie muga et leurs diverses plantes hôtes sont donc une richesse unique au monde.

Le ver à soie muga est un insecte polyvoltin, polyphage et semi-domestiqué qui se développe très bien uniquement à l'extérieur. Il se nourrit sur diverses plantes hôtes primaires, secondaires et tertiaires. Som (*Persea bombycina* King) et Soalu (*Litsaea monopetala* (Roxb.) Pers.) sont les deux plantes hôtes primaires du ver à soie muga. Parmi les plantes hôtes secondaires, la plus importante est le dighloti (*Litsaea salicifolia* Roxb.) qui est un petit arbuste buissonneux à feuilles persistantes, que l'on trouve abondamment dans l'habitat naturel de l'Assam. La plante de dighloti présente des avantages pour l'élevage du ver à soie muga parce qu'elle supporte l'élevage en filet pendant toute l'année. Cette plante offre d'autres avantages tels qu'une surveillance pratique à cause de sa nature buissonnante et de ses feuilles persistantes, une bonne réponse à la taille, une propagation clonale facile par boutures et marcottages (Gogoi et Goswami, 1996) et elle permet d'élever le premier âge, les éclosions tardives et les vers faibles. On a aussi authentifié le dighloti comme une plante hôte primaire du ver à soie cri sauvage tétramuant, *Philosamia cynthia* (Gogoi et Goswami, 1994). Le muga sauvage bivoltin Kotkori (*Attacus atlas*) a aussi été recueilli par nos soins sur la plante dighloti

* Adresse actuelle : Department of Botany, Sonari College, Sonari - 785 690, Sibsagar, Assam, Inde.

dans la forêt. L'équivalent sauvage d'*Antheraea assama* Westwood a été trouvé et recueilli dans la forêt exclusivement sur les plantes dighloti.

Malgré le potentiel énorme offert par cette plante pour le développement de l'industrie de la soie muga, le dighloti a été négligé jusqu'à présent à cause du manque d'information scientifique sur le comportement alimentaire et la performance d'élevage du ver à soie sauvage sur cette plante. La recherche actuelle a donc été entreprise pour étudier le comportement alimentaire et la performance d'élevage à la fois du ver à soie semi-domestiqué *Antheraea assama* Westwood et de son équivalent sauvage (trouvé sur dighloti dans l'habitat sauvage) sur les plantes dighloti pendant les quatre saisons de l'année.

MATERIELS ET METHODES

Des cocons sains du ver à soie muga semi-domestiqué nourri avec du dighloti ont été recueillis chez un éleveur privé à Sapekhati, dans l'Assam et ceux de son équivalent sauvage dans la forêt. L'élevage expérimental a été réalisé sur des plantes dighloti de trois ans en 1994 dans une ferme privée à Sonari, dans la région de Sibsagar dans l'Assam. Des pontes des deux types ont été préparées par nos soins dans des conditions domestiquées. La méthode d'élevage en plein air, normale et établie a ensuite été suivie à la fois pour le ver à soie semi-domestiqué et pour le muga de type sauvage. Bien sûr, des filets de nylon ont été utilisés sur les arbustes dighloti pour protéger les vers à soie des insectes nuisibles et des prédateurs. Deux générations de production en l'occurrence Jethua (avril/mai) et Kotia (oct./nov.) et deux générations de grainage c'est à dire Aherua (juin/juillet) et Bhodia (août/septembre) ont été étudiées pour le type semi-domestiqué et seule Jethua (avril/mai) a été étudiée chez son équivalent sauvage, parce que l'émergence des papillons mâles et femelles n'était pas synchronisée, ce qui a posé des problèmes pour l'accouplement pour continuer les générations successives. Pendant l'étude, des observations soignées ont été faites qui ont été enregistrées, évaluées et analysées.

RESULTATS ET DISCUSSION

La performance d'élevage des différentes générations tout comme la qualité du cocon et les données météorologiques sont présentées dans le Tableau I. La fécondité du ver à soie muga semi-domestiqué nourri avec du dighloti est comprise entre 150-250 oeufs par ponte. La fécondité de son équivalent sauvage est de 200 oeufs par ponte pour la couvée de printemps. On trouve que le taux d'éclosion du type semi-domestiqué est minimum pour la génération d'été, soit 85,12 % et maximum pour la génération de printemps soit 95,30 %. L'éclosion enregistrée pour le type sauvage dans la génération de printemps est de 98,11 %. Le taux effectif d'élevage (E.R.R.) le plus élevé pour le ver semi-domestiqué est enregistré à 70,51 % pour la génération d'automne, suivi par 65,52 % au printemps, 48,62 % à la fin de l'été et 45,50 % en été. On enregistre que le taux effectif d'élevage est de 75,25 % chez le type sauvage pour la génération de printemps. La durée larvaire du ver à soie domestiqué s'avère varier pendant les différentes saisons, allant d'un minimum de 23 jours en été à un maximum de 32 jours au printemps. Les vers à soie sauvages prennent cependant 5 jours de moins que les vers semi-domestiqués au printemps. La richesse soyeuse du type semi-domestiqué s'avère la plus élevée (9,28 %) à l'automne, suivie par 8,64 % au printemps, 8,14 % à la fin de l'été et 7,76 % en été. La richesse soyeuse du type sauvage au printemps est de 10,34 %, ce qui est sensiblement plus élevé que pour le type semi-domestiqué. Nous trouvons que la richesse soyeuse des cocons mâles nourris avec du dighloti est la plus élevée pour toutes les saisons étudiées.

S. N. Chaudhury (1981) a signalé que la fécondité du ver à soie muga nourri avec Som est comprise entre 200-250, J.K. Gogoi (1984) a rapporté une fécondité comprise entre 150-200 et Yadav et Goswami (1987) ont observé que la fécondité du ver à soie muga nourri avec Som était comprise entre 140-245 et que celle du ver à soie muga nourri avec Soalu était comprise entre 100-205. Il est clair d'après notre recherche, que la fécondité du ver à soie muga nourri avec du dighloti est presque similaire à celle du ver à soie muga nourri avec Som et Soalu. L'éclosion la plus élevée soit 95 % est

enregistrée pour le ver à soie muga nourri avec Som en mai/juin par J. K. Gogoi (1984) et 80 % pour le ver à soie muga nourri avec Soalu en mai/juin par Yadav et Goswami (1987).

Mais dans notre recherche, le pourcentage d'éclosion le plus élevé est de 95,30 % en avril/mai pour le type semi-domestiqué et de 98,11 % pour le type sauvage. Yadav et Goswami (1987) ont signalé 83,25 % de taux effectif d'élevage chez les vers à soie muga nourris avec Soalu en mai/juin mais le taux effectif d'élevage du ver à soie muga semi-domestiqué nourri sur dighloti est de 70,51 % en oct./nov. La richesse soyeuse la plus élevée soit 10,23 % a été observée par Yadav et Goswami (1991) chez les cocons mâles nourris avec Som en oct./nov. Dans notre recherche on trouve la richesse soyeuse la plus élevée chez les cocons mâles de type sauvage soit 10,34 %, suivie par 19,28 % pour les cocons mâles de type semi-domestiqué. On doit noter que, cette étude étant un travail de pionnier sur la comparaison entre l'élevage du ver à soie muga sauvage et semi-domestiqué, des études supplémentaires sont nécessaires pour authentifier les résultats avec une analyse statistique, qui n'a pas été réalisée dans cette étude.

Dans notre recherche, bien que certaines variabilités de la fécondité, de l'éclosion, du taux effectif d'élevage et de la richesse soyeuse provenant des données publiées sur les vers nourris avec Som et Soalu aient été comparées à celles concernant les vers à soie muga nourris avec le dighloti à différentes saisons, les différences n'étaient pas significatives. Ainsi, cela pourrait bien signifier que le dighloti pourrait être cultivé commercialement et recommandé comme plante hôte primaire viable du ver à soie muga, particulièrement pour l'élevage de la génération de production d'automne ; bien sûr d'autres paramètres concernant la production et la qualité de la soie doivent être étudiés concernant les vers à soie muga nourris sur dighloti. Les plantes dighloti pourraient ainsi être également utilisées pour la production de cocons de grainage. De plus, l'équivalent sauvage d'*Antheraea assama* Westwood pourrait être maintenu sur la plante dighloti dans une banque génétique pour des programmes de lignage ultérieurs. L'étude actuelle sert de base pour des recherches supplémentaires sur l'équivalent sauvage du ver à soie muga. Cela pourrait faciliter la planification du lignage du ver à soie muga pour le développement ultérieur de lignées améliorées du ver à soie muga.

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. MORI, A NEW BACTERIAL PATHOGEN OF MULBERRY

M. D. MAJI, S. M. H. QADRI & S. C. PAL*

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742101, W. B., India.

*A newly identified pathovar of *Xanthomonas* named *X. campestris* Pv. *mori* has been reported as a causal organism of bacterial leaf spot and leaf blight disease of mulberry (*Morus spp*) in West Bengal, a traditional silk producing state of India. The disease appeared at the onset of monsoon and caused damage to mulberry leaf area as well as quality. The disease is distributed throughout the sericultural belt of West Bengal. The pathogen is reported for the first time in the state.*

Keywords: *Morus spp*, mulberry disease, leaf spot, leaf blight, *Xanthomonas campestris* Pv. *mori*.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus spp*) is known to be affected by a number of foliage diseases caused by a variety of pathogens belonging to different groups of fungi, bacteria, mycoplasmas and viruses (Rangaswami *et al.*, 1978; Sastry, 1984; Sengupta *et al.*, 1990). Among these bacterial diseases have received relatively less attention in India. The occurrence of a bacterial leaf blight of mulberry in India caused by *Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens was first reported in the mid sixties from the Uttar Pradesh region (Sinha & Saxena, 1966). Later it was reported from Karnataka (Krishna Prasad & Siddaramaiah, 1978). The incidence of the disease in West Bengal caused by *Pseudomonas mori* was reported during the early nineties (Anonymous 1991-92, 1992-93, Teotia and Mandal, 1993). It is worthy to mention here in this context that this pathogen is presently renamed as *Pseudomonas syringae* Pv. *mori* (Boyer and Lambert 1893) Young *et al.*, 1978. The disease has been of seasonal occurrence and found to be prominent during the rainy season. Another bacterial leaf disease of mulberry in Korea was reported to be caused by *Xanthomonas campestris* (pammel) Dowson (Choi *et al.*, 1988). Of late, the same has also been reported from Derhadun in India (Pandey and Singh, 1989). But as a matter of fact, the pathovar level studies are not reported in want of systematic studies on bacterial pathogen causing leaf spot and blight in mulberry under Indian conditions. An attempt in this direction was, therefore, made and results are presented in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Surveys of central and state sericultural farms and farmers fields in sericultural belts of West Bengal were conducted during monsoon 1995. The disease causing bacteria was isolated from young leaves exhibiting characteristic disease lesions following isolation techniques standardised by the authors. Diseased portions of young leaves were cut out by sterile razor blade and surface sterilised by dipping in 70% ethyl alcohol for 10 seconds and immediately rinsed with three changes of sterile water. They were then transferred into sterilised Petri plates containing 2 ml sterile distilled water and

* Dept. of Botany, Visva Bharati, Santiniketan, India.

finely minced with a sterile needle and allowed to stand for 10 minutes. A loopful of suspension was streaked in petri plates containing nutrient agar which was incubated at 30° C in inverted position for 48 hrs in a BOD incubator.

To study the pathogenicity, pure cultures of the bacterial isolates were grown for 48 hrs on YDC agar (1% yeast extract, 2% dextrose, 2% fine powder calcium carbonate and 2% agar) resuspended in sterile distilled water to obtain an estimated concentration of 2×10^8 cfu/ml (0.1 OD at 600 nm). Young, healthy vigorously growing S1 mulberry variety was inoculated with pathogen suspension on the lower surface of leaves with a hand sprayer. Control plants were sprayed with distilled water. Inoculated plants were enclosed in plastic bags for 48 hrs before they were transferred into a greenhouse for allowing the disease to develop.

In vitro, pathogenicity tests were also conducted with the pathogen under study with the leaves of mulberry and also the leaves of following locally available plants, *Aegle marmelos* Corr., *Amaranthus viridis* L., *Annona squamosa* L., *Artocarpus heterophyllus* Lamk., *Bauhinia purpurea* L., *Carica papaya* L., *Citrus aurantifolia* Swng., *Clerodendron vicosum* Vent., *Curcuma longa* L., *Ficus bengalensis* L., *Ficus hispida* L., *Geardenia jasmminoides* Ellis, *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Mangifera indica* L., *Momordica charantia* L., *Nyctanthos arbor tristis* L., *Piper bettle* L., *Psidium guajava* L., *Zizypus mauritiana* Lamk., following the modified detached leaf technique (Sukumar & Ramalingam, 1981).

Cultural characteristics of the pathogen were studied on different media i.e., nutrient agar, nutrient broth, potato dextrose agar, starch agar, glucose and sucrose nutrient agar, YDC agar, GYCA (0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 4% fine powder of calcium carbonate and 1.5% agar) and mulberry leaf extract agar (crushed mulberry leaves 20 g, agar 20 g and distilled water 1 l). Morphological, physio-biochemical characters of the isolates were studied following procedures reported by Dowson (1957), Stapp (1961) and Aneja (1993).

RESULTS AND DISCUSSION

Pathogenicity tests:

i) *In vivo*:

Water soaked angular spots appeared on lower surface of leaves after 72 hrs of inoculation with pure culture of the bacterial isolates obtained from diseased mulberry leaves. Later on spots also appeared on the upper surface. As disease progressed, these water soaked spots coalesced together. A slimy exudate was also found very often associated with the spots. Later they turned brownish surrounded by a yellow margin. The infected tissues within leaf become necrotic and shed off resulting into shot holes (Fig. 1). Young leaves get curled outward and distorted when infected severely. At an advanced stage, browning and yellowing of leaves was observed starting from the margin and ultimately leading to defoliation. Brown streaks also appeared on young stems. Disease causal organism reisolated from symptoms so developed was confirmed to be same as that isolated initially.

ii) *In vitro*:

Water soaked spots appeared only in the case of mulberry leaf after 72 hrs of inoculation whereas no disease symptoms appeared on the leaves of other plants tested.

Morphological cultural and physio-biochemical studies:

After 48 hrs of incubation at 30° C, small circular, entire, convex, yellow colonies appeared in nutrient agar. Cells were rod shaped ranging from 1.0 to 2.5 µm in length and 0.4-0.7µm in width predominantly single, gram negative and motile. Water insoluble yellow pigments were produced which are prominent in GYCA and YDC medium (Fig. 2). Mucoid growth was observed on PDA, starch agar and nutrient agar supplemented with 2% glucose or sucrose. The bacteria grew readily on mulberry leaf extract agar but growth improved when supplemented with 2% glucose or sucrose. Growth rate was moderate in nutrient broth turning it cloudy without pellicle or sediments. A temperature range of 25-30° C and RH of 95-100% with pH of 7.5 supported maximum growth of

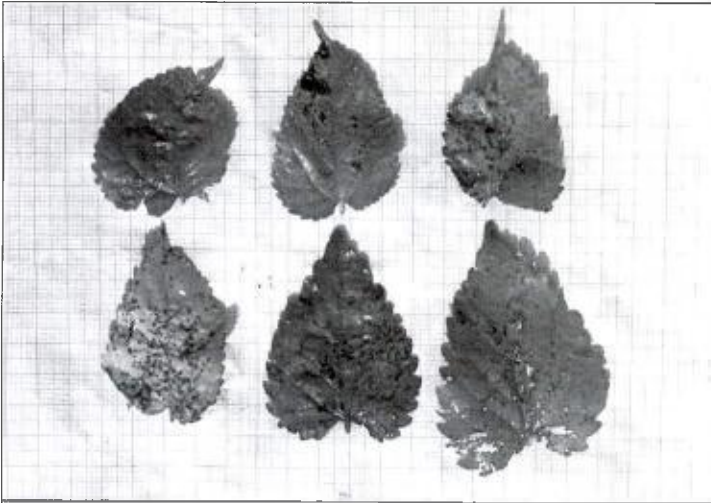


Fig. 1. Mulberry leaves showing typical symptoms caused by *X. campestris* P.v. *mori*.

Fig 1. Feuilles de mûrier présentant les symptômes typiques provoqués par X. Campestris P.v. mori.



Fig 2. Characteristics growth of *X. campestris* P.v. *mori* in YDC agar medium.

Fig 2. Caractéristiques de croissance de X. campestris P.v. mori dans un milieu d'agar YDC.

the bacteria. The thermal death point was observed at 55° C. It produced acid but no gas in glucose, sucrose, lactose, containing media. It was oxidase negative and catalase positive, could hydrolyse starch and casein and liquefy gelatine. The bacterium could not grow in the medium containing above 5% concentration of sodium chloride.

The bacteria isolated from leaf spot and leaf blight symptoms did not differ in cultural morphological and physiobiochemical aspects. These characteristics studied found to match with those of *Xanthomonas campestris* and that except mulberry the bacterium was not found pathogenic on any other plants tested here. Further the pathogen is not recognised in the list of Young *et al.*, (1978) in approved list of Skerman *et al.*, (1980) and also in ISSP list of Dye *et al.*, (1980). Therefore,

following the criteria assigned for nomenclature of a pathovar on the basis of its specificity to host plant from which first isolated (Starr 1983) the pathogen reported herein is proposed to be a new pathovar of *Xanthomonas campestris* and named as *X. campestris* Pv. *mori* causing a leaf disease in mulberry as discussed. The culture has been deposited at ICMP 13199 with International Collection of Micro-organisms from plants, Land Care Research New Zealand Ltd., Auckland, New Zealand.

REFERENCES

- ANEJA K. R. (1993) Experiments in microbiology, Plant Pathology and Tissue culture, Wiley Eastern Ltd. New Delhi, 471pp.
- ANONYMOUS (1991-92) Studies on the incidence of mulberry diseases and extent of damage. 99-100p in: Annual Research & Administrative report, Central Sericultural Research & Administrative report, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India.
- ANONYMOUS (1992-93) Studies on the incidence of mulberry diseases and extent of damage. 74-75p in: Annual Research & Administrative report, Central Sericultural Research & Administrative report, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India.
- BOYER G., LAMBERT F. (1893) Sur deux nouvelles maladies du mûrier C:R Hebd Seances Acad. Sci. 117, 342-343.
- CHOIS H., LEE K. G., CHOI Y. S., LEE E. J., KIM Y. T. (1988) Pathogenicity and bacteriological characterisation of *Xanthomonas campestris* from mulberry. Korean J. Plant Pathol. 4(2). 143-148.
- DOWSON W. J. (1957) Media (2nd ed) 37-76 pp in: Plant diseases due to bacteria. The syndics of the Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- DYE D. W., BRADBURY J. F., GOTO M., HAYWARD A. C., LELLIOTT R. A., SCHROTH M. N. (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Rev. of plant Pathol. 59, 153-168.
- KRISHNA PRASAD K. S., SIDDARAMAIAH A. L. (1978) Studies on the bacterial leaf blight of mulberry in Karnataka, Indian J. of Seric. 17(1), 61-63.
- PANDEY P. C., SINGH S. (1989) Three important diseases of mulberry in India. India J. of For. 12(4), 255-258.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C. R., JOLLY M. S. (1978) Diseases and Insects pests. 68-81 pp. In: Mulberry cultivation Vol. I: manual on sericulture, FAO of the United nations Rome.
- SASTRY C. R. (1984) Mulberry varieties, Exploitation and pathology. Sericologia, 24(3), 333-359.
- SENGUPTA K., PRADIP KUMAR, BAIG M., GOVINDAIAH (1990) Diseases of mulberry and their control 3-15pp. In: Hand book on pest and diseases control of mulberry and silkworm. United Nations, ESCAP, Bangkok.
- SINHA S. K., SAXENA S. E. (1966) First record of bacterial blight of mulberry in India caused by *Pseudomonas mori* (Boyer & Lambert) Stevens. Indian Phytopath 19, 318-319.
- SKERMAN V. B. D., MCGOWAN V., SNEATH P. H. A (1980) Approved lists of bacterial names. Int. J. of Sys. Bacteriolo. 30, 225-420.
- STAPP C. (1961) Methods of identifying plant pathogens. 26-44pp. In: Bacterial plant pathogens. Oxford Univ. Press, London.
- STARR M. P. (1983) The genus *Xanthomonas* 742-763 pp. In: The prokaryotes: a hand book on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer - verlag, New York.
- SUKUMAR J., RAMALINGAM (1981) Detached leaf technique to study leaf spot and other foliar diseases of mulberry. Indian Phytopath. 34(1), 100-101.
- TEOTIA R. S., MANDAL S. K. (1993) Bacterial leaf blight disease of mulberry. Indian Silk 32(6), 41-44.
- YOUNG J. M., DYE D. W., BRADBURY J. F., PANAGOPOULOS C. G., ROBBS C. F. (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. of Agric. Res. 21, 153-177.

XANTHONOMAS CAMPESTRIS PV. MORI, UN NOUVEAU PATHOGENE BACTERIEN DU MURIER

M. D. MAJI, S. M. H. QADRI & S. C. PAI.*

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742101, W. B., Inde

*Un nouveau pathovar de **Xanthomonas** appelé **X. campestris** Pv. **mori** a été identifié comme un organisme responsable de la tache de la feuille bactérienne et de la flétrissure du mûrier (**Morus** spp) dans le Bengal occidental, un état traditionnellement producteur de soie en Inde. La maladie est apparue au début de la mousson et cause des dégâts sur la surface foliaire du mûrier et affecte sa qualité. La maladie est présente dans toute la région séricicole du Bengal occidental. Le pathogène est signalé pour la première fois dans l'Etat.*

INTRODUCTION

On sait que le mûrier (*Morus* spp) est atteint par certaines maladies foliaires provoquées par plusieurs pathogènes appartenant à différents groupes de champignons, de bactéries, de mycoplasmes et de virus (Rangaswami et coll., 1978 ; Sastry, 1984 ; Sengupta et coll., 1990). Parmi elles, les maladies bactériennes ont reçu relativement moins d'attention en Inde. Les cas de flétrissure bactérienne de la feuille de mûrier en Inde provoquée par *Pseudomonas mori* Stevens (Boyer et Lambert) ont été signalés en premier au milieu des années soixante dans la région de l'Uttar Pradesh (Sinha et Saxena, 1966). Plus tard ils ont été signalés au Karnataka (Krishna Prasad & Siddaramaiah, 1978). L'incidence de la maladie provoquée par *Pseudomonas mori* dans le Bengal occidental a été signalée au début des années mille neuf cent quatre vingt dix (Anonyme 1991-92, 1992-93, Teotia et Mandal, 1993). Il est intéressant de préciser ici dans ce contexte que ce pathogène est maintenant renommé *Pseudomonas syringae* Pv. *mori* (Boyer et Lambert, 1893) Young et coll., 1978. La maladie se produit de manière saisonnière et domine pendant la saison des pluies. Une autre maladie bactérienne de la feuille de mûrier provoquée par *Xanthomonas campestris* Dowson a été signalée en Corée (Chois et coll., 1988). Récemment, la même a aussi été signalée à Derhadun en Inde (Pandey et Singh, 1989). Mais en fait, on ne relève pas d'études du niveau du pathovar, par manque d'études systématiques sur le pathogène bactérien, causant la tache et la flétrissure de la feuille chez le mûrier dans les conditions de l'Inde. Un essai a donc été fait dans cette direction et les résultats en sont présentés dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Des études ont été réalisées dans des élevages séricicoles centraux et gouvernementaux et dans les champs d'éleveurs dans les régions séricicoles du Bengal occidental pendant la mousson de 1995. La bactérie provoquant la maladie a été isolée sur de jeunes feuilles présentant les lésions caractéristiques de la maladie en utilisant des techniques d'isolement standardisées par les auteurs. Les parties malades des jeunes feuilles sont coupées avec une lame de rasoir stérile et stérilisées en surface, en les plongeant dans de l'alcool éthylique à 70 % pendant 10 secondes, puis en les rinçant

* Dept. of Botany, Visva Bharati, Santiniketan, Inde.

immédiatement trois fois dans de l'eau stérile. Elles sont ensuite transférées sur des boîtes de Petri stérilisées, contenant 2 ml d'eau distillée stérile et coupées finement avec une aiguille stérile, puis on les laisse reposer pendant 10 minutes. Les boîtes de petri contenant un agar agar, sont striées avec une anse et incubées à 30 ° C en position inversée pendant 48 heures dans un incubateur BOD.

Pour étudier la pathogénicité, des cultures pures d'isolats bactériens sont cultivées pendant 48 heures sur gélose YDC (1 %, d'extrait de levure, 2 % de dextrose, 2 % de poudre fine de carbonate de calcium et 2 % de gélose), resuspendues dans de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration estimée de 2×10^8 cfu/ml (0,1 OD à 600 nm). La variété de mûrier S1 jeune, saine et à croissance vigoureuse a été inoculée avec une suspension de pathogène sur la surface inférieure des feuilles avec un vaporisateur manuel. Les plantes témoins sont vaporisées avec de l'eau distillée. Les plantes inoculées sont enfermées dans des sacs plastique pendant 48 heures avant d'être transférées dans une serre, pour permettre à la maladie de se développer.

Des tests de pathogénicité *in vitro* sont réalisés avec le pathogène à l'étude avec des feuilles de mûrier et également avec des feuilles des plantes disponibles localement, *Aegle marmelos* Corr., *Amaranthus viridis* L., *Annona squamosa* L., *Artocarpus heterophyllus* Lamk., *Bauhinia purpurea* L., *Carica papaya* L., *Citrus aurantifolia* Swing, *Clerodendron vicosum* Vent., *Curcuma longa* L., *Ficus bengalensis* L., *Ficus hispida* L., *Geardenia jasminoides* Ellis, *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Mangifera indica* L., *Momordica charantia* L., *Nyctanthos arbor tristis* L., *Piper bettle* L., *Psidium guajava* L., *Zizypus mauritiana* Lamk, en suivant la technique modifiée de détachement de la feuille (Sukumar & Ramalingam, 1981).

Les caractéristiques culturales du pathogène ont été étudiées sur différents milieux tels que de l'agar agar, du milieu nutritif, de la gélose de dextrose de pomme de terre, de la gélose d'amidon, de l'agar agar de glucose et de sucrose, de la gélose YDC, du GYCA (0,5 % d'extrait de levure, 0,5 % de glucose, 4 % de poussière fine de carbonate de calcium et 1,5 % de gélose) et de la gélose d'extrait de feuille de mûrier (20 g de feuilles de mûrier écrasées, 20 g de gélose et 1 l d'eau distillée). Les caractères morphologiques et physio-biochimiques des isolats sont étudiés en suivant les procédures rapportées par Dowson (1957), Stapp (1961) et Aneja (1993).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tests de pathogénicité :

i) *In vivo* :

Des taches angulaires gorgées d'eau apparaissent sur la surface inférieure des feuilles 72 heures après l'inoculation avec une culture pure d'isolats bactériens, obtenue à partir de feuilles de mûrier malades. Plus tard des taches apparaissent aussi sur la surface supérieure. Alors que la maladie progresse, ces taches gorgées d'eau se fondent ensemble. Un suintement gluant est très souvent associé aux taches. Par la suite elles se colorent en marron et en jaune sur les bords. Les tissus infestés de la feuille se nécrosent, rétrécissent et forment des trous (Fig. 1.). Les jeunes feuilles se recourbent sur l'extérieur et se déforment lorsqu'elles sont gravement atteintes. A un stade avancé, on observe une coloration marron et jaune des feuilles, qui commence au bord et qui finalement entraîne une défoliation. Des rayures marron apparaissent aussi sur les tiges jeunes. L'organisme responsable de la maladie réisolé sur les symptômes qui se sont développés ainsi s'avère être le même que celui isolé au début.

ii) *In vitro* :

Après 72 heures d'inoculation, les taches gorgées d'eau n'apparaissent que sur les feuilles de mûrier tandis qu'aucun symptôme de la maladie n'est relevé sur les feuilles des autres plantes testées.

Etudes morphologiques et physio-biochimiques :

Après 48 heures d'incubation à 30 ° C, des petites colonies circulaires, entières, convexes et jaunes apparaissent sur l'agar agar. Les cellules sont bacilliformes, d'une longueur entre 1,0 et 2,5 µm et d'une largeur entre 0,4 et 0,7 µm et en grande partie isolées, gram négatives et motiles. Des pigments

jaunes insolubles dans l'eau qui sont dominants en milieu GYCA et YDC (Fig. 2) apparaissent. On observe une croissance mucoïde sur PDA, sur gélose d'amidon et sur agar agar enrichi avec 2 % de glucose ou de sucrose. Le taux de croissance est modéré sur le milieu nutritif qui se trouble, sans pellicule ou sédiment. Une température comprise entre 25-30 ° C et une humidité relative entre 95-100 % avec un pH de 7,5 entraîne une croissance de bactéries maximale. Le point de mort thermique est observé à 55 ° C. La culture produit de l'acide mais pas de gaz dans les milieux, contenant du glucose, du sucrose et du lactose. Elle est négative en oxydase et positive en catalase et peut hydrolyser l'amidon et la caséine et liquéfier la gélatine. Les bactéries ne croissent pas dans le milieu contenant une concentration en chlorure de sodium supérieure à 5 %.

Les bactéries isolées sur les symptômes de la tâche et de la flétrissure de la feuille ne diffèrent pas de par leurs aspects morphologiques et physiobiochimiques. On relève que leurs caractéristiques correspondent à celles de *Xanthomonas campestris* et que la bactérie est pathogène sur le mûrier mais non pas sur les autres plantes testées ici. De plus on ne reconnaît pas le pathogène dans la liste de Young et coll., (1978), dans la liste approuvée de Skerman et coll., (1980) et dans la liste ISSP de Dye et coll., (1980). Ainsi, compte tenu des critères de définition de la nomenclature des pathovars, en fonction de leur spécificité par rapport à la plante hôte où il est isolé en premier (Starr, 1983), nous pensons que le pathogène observé ici est un nouveau pathovar de *Xanthomonas campestris*, qui provoque une maladie de la feuille de mûrier telle qu'elle a été décrite ici et que nous proposons d'appeler *X. campestris* Pv. mori. La culture a été déposée à l'ICMP 13199 auprès de l'*International Collection of Micro-organisms from plants*, Land Care Research New Zealand Ltd., Auckland, Nouvelle-Zélande.

STUDIES ON SEED LONGEVITY AND GERMINATION IN *HETEROPANAX FRAGRANS*

R. KUMAR, GARGI*

Regional Sericulture Research Station, Jorhat-785002, Assam, India.

*An experiment was conducted to test the germination behaviour and longevity of **Heteropanax fragrans** seeds preserved for longer duration. The germination percentage in macroseeds was 92.10 against 4.16 in microseeds when sown after the 4th day of harvest. Microseeds took a longer period for germination than macroseeds. Only 10.56 per cent of the seeds germinate after 330 days of storage in a refrigerator as compared to 4.4% on the 120th day of storage at room temperature.*

Keywords: *Heteropanax fragrans*, germination, longevity, storage.

INTRODUCTION

Heteropanax fragrans is a perennial, semi hardwood plant belonging to the Araliaceae family. It is found as naturally grown all over the states of Assam, Arunachal Pradesh and Meghalaya up to an elevation of 3000 feet (Kenji Lal *et al.*, 1984). Its foliage is used as food for the eri silkworm (*Philosamia ricini*) and is reported to be equally good vis à vis castor leaves in terms of its nutritive value (Anonymous, 1992). Cultivation of *Heteropanax* as a food plant of the eri silkworm is preferred over castor due to its perennial and woody nature also it can withstand pollarding to enhance the availability of foliage. This factor reduces the cost of cultivation involved in growing castor annually. Cultivation of *Heteropanax* is done through seedlings raised in nurseries. The information of the effect of seed storage on germination which is one of the vital factors in raising a nursery is lacking in this genus. Therefore, the present study was made on seed germination under prolonged storage.

MATERIALS AND METHODS

Ripened fruits were harvested in the last week of February 1992 from the plants grown in the garden of the Regional Sericulture Research Station, Jorhat, Assam. Immediately after the harvest, fruits were kept under shade for two days before removing the seeds. Each fruit contains two unequal seeds. The small one is termed as micro and the bigger one as macro seed. Only macroseeds were taken for storage studies as the germination was very poor in microseeds. Seeds were immediately kept in screw cap vials in a dessicator containing calcium chloride. One such set was kept at room temperature and the other one in a refrigerator at a temperature of $8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ throughout the studies. Germination studies were carried out at regular intervals up to 13 months from the date of storage in enamel trays filled with a mixture of farmyard manure, sand and soil in 1:1:1 proportion. Each set contained 50 seeds and was replicated 6 times. The data was analysed statistically. The maximum and minimum temperature ranged between 21.5 to 30°C and 9.7 to 25°C respectively during the study period.

* Present address: Purvanchal Sericulture Development Project, Central Silk Board, S-8/ 114-49, Indira Nagar, Khajuri, Varanasi - 221002, India.

RESULTS AND DISCUSSION

Fruits are glaucous initially but ultimately turn glabrescent. They are compressed at right angles to septum and are 5 mm to 7 mm by 7 mm to 10 mm in size. The average seed set was 78.8 percent. The weight of 100 microseeds ranged between 1.737 to 1.848 g as compared to 2.369 to 2.494 g in macroseeds. Macroseeds start germinating on the 5th day of sowing when sown on the 4th day of fruit harvest. The germination was 92.15 percent. On the other hand, the time taken for initial germination in microseed was 7 days and it was only 4.16 percent. Similar results have been reported by Bhagat *et al.*, (1993) in *Aesculus indica* colber and concluded that heavier seed weight classes performed significantly better in terms of germination, survival, seedling height and seedling dry weight than lighter seed weight classes.

The germinating percentage initially fell slowly in the seeds stored at room temperature and was 65.63% on the 20th day of storage (Table 1). The further decline in germination was sharp and only 15.63 percent of the seeds germinate on the 60th day of storage. The seeds ceased to germinate on the 150th day of storage. The present study is in agreement with those of Raja Rama *et al.*, 1992 in *Machilus bombycina*. According to them, seeds stored at room temperature show 5% germination within one month.

Table 1. Germination behaviour of seeds of *H. fragrans* during different storage periods.

Tableau 1. Comportement de germination des graines de *H. fragrans* pendant différentes périodes de stockage.

Treatment	Germination after days of storage (in percent)										
Traitement	Germination après les jours de stockage (en pourcentage)										
	0	20	30	60	90	120	150	210	270	330	390
Seeds stored at room temperature <i>Graines stockées à température ambiante</i>	92.15 ± 1.23	65.63 ± 1.15	50.55 ± 1.05	15.63 ± 1.1	8.15 ± 1.04	4.4 ± 0.98	0.0 0.00				
Seeds stored at 8 °C in a refrigerator <i>Graines stockées à 8 °C au réfrigérateur</i>	92.15 ± 1.23	80.65 ± 1.2	70.67 ± 1.11	59.33 ± 1.1	45.21 ± 1.09	42.00 ± 1.05	39.9 ± 1.02	35.05 ± 0.97	33.11 ± 0.93	10.56 ± 0.84	0.0 ± 0.0

± denotes standard deviation / ± indique l'écart type.

Seeds kept in a refrigerator lose their viability gradually but not uniformly as evident from the germination test. It was 59.35% on the 60th day as compared to 15.63% in seeds kept at room temperature. Seeds lose their viability and failed to germinate on the 390th day of storage. Long term storage under low temperature has been reported early in several genera (Justice and Bass, 1979). However, our studies are in contrast to the findings of Saha *et al.* 1994, wherein the authors have stated that the seeds of *Heteropanax* sown within 3 to 4 days of harvest show better germination and loose complete viability after one week at room temperature. This might be due to improper seed storage during their studies as the storage temperature and the seed moisture content are the most important factors affecting seed longevity (Justice and Bass, 1979).

Thus, the present findings will help in preserving seeds for a longer period to raise nurseries at a suitable time.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1992) Annual report of Regional Sericulture Research Station, Central Silk Board, Jorhat, Assam.
- BHAGAT S., SINGH O., SINGH V. (1993) Effect of seed weight on germination, survival and initial growth of Horse chestnut (*Aesculus indica* Colbr.) in the nursery. Indian For. 119(8) 627-629.
- JUSTICE O. L., BASS L. N. (1979) Principle and practice of seed storage. Castle House Publication Ltd. Great Britain. 1979 pp 26-27.
- KENJILAL U. N., KENJILAL P. C., DAS A. (1984) Flora of Assam. Vol. II. Periodical Export Book Agency, New Delhi. 110032, pp 343-364.
- RAJARAM, SENGUPTA A. K., DEVNATHM (1992) Studies on the germination behaviour and longevity of Som (*Machilus bombycina*) seeds. Sericologia 32(3) 523-525.
- SAHA L. M., CHANDA S., SINGH M. K., PRASAD D. N. (1994) Technique and economics of raising Kesseru nursery by seed propagation. Indian Silk Feb. 94, 11-13.

ETUDES SUR LA LONGEVITE ET LA GERMINATION CHEZ *HETEROPANAX FRAGRANS*

R. KUMAR & GARGI*

Regional Sericulture Research Station, Jorhat - 785002, Assam, Inde.

Une expérience a été réalisée pour tester le comportement de germination et la longévité des graines de *Heteropanax fragrans* conservées pendant une longue durée. Le pourcentage de germination chez les macro-graines s'élève à 92,10 contre 4,16 chez les micro-graines quand on les sème après le 4^{ème} jour de récolte. Les micro-graines nécessitent une période plus longue que les macro-graines pour la germination. Seules 10,56 % des graines germent après 330 jours de stockage dans un réfrigérateur alors que 4 % germent après 120 jours de stockage à température ambiante.

INTRODUCTION

Heteropanax fragrans est une plante vivace, semi feuillue appartenant à la famille des Araliaceae. Elle pousse naturellement dans tous les états de l'Assam, d'Arunachal Pradesh et du Meghalaya jusqu'à 3000 pieds (Kenji Lal et coll., 1984). Son feuillage est utilisé comme nourriture pour le ver à soie eri (*Philosamia ricini*) et l'on a signalé qu'il convenait aussi bien que les feuilles de ricin en termes de valeur nutritive (Anonyme, 1992). La culture d'*Heteropanax* comme plante hôte du ver à soie eri est préférée à celle du ricin à cause de sa nature vivace et ligneuse, elle peut aussi être écimée pour améliorer la quantité de son feuillage. Ce facteur diminue le coût de culture par rapport à la culture annuelle de ricin. La culture d'*Heteropanax* se fait par semis en pépinières. L'information manque pour ce genre sur l'effet du stockage des graines sur la germination, l'un des facteurs vitaux pour la culture en pépinière. L'étude actuelle sur la germination des graines en stockage prolongé a donc été entreprise.

MATERIELS ET METHODES

Les fruits mûrs sont récoltés pendant la dernière semaine de Février 1992 chez des plantes cultivées dans le domaine de la *Regional Sericulture Research Station*, Jorhat, Assam. Immédiatement après la récolte, les fruits sont conservés à l'ombre pendant deux jours avant que les graines ne soient enlevées. Chaque fruit contient deux graines inégales. La petite est dénommée micro et la grande graine macro. Seules les macro-graines sont prises pour les études de stockage, la germination étant très faible chez les micro-graines. Les graines sont immédiatement conservées dans des fioles aux bouchons à pas de vis dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium. Un tel lot est gardé à température ambiante et un autre dans un réfrigérateur à une température de $8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant la durée des études. Les études de germinations sont réalisées à intervalles réguliers jusqu'à 13 mois après la date de stockage dans des plateaux en émail remplis d'un mélange de fumure, de sable et de terre dans les proportions 1:1:1. Chaque lot contient 50 graines et est répété six fois. Les données sont

* Adresse actuelle : Purvanchal Sericulture Development Project, Central Silk Board, S-8/ 114-49, Indira Nagar, Khajuri, Varanasi - 221002, Inde.

analysées de manière statistique. Les températures maximum et minimum sont comprises entre 21,5 à 30 ° C et 9,7 à 25 ° C respectivement pendant la période d'étude.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les fruits sont fripés au début mais deviennent lisses par la suite. Ils sont comprimés en angles droits par rapport au septum et mesurent 5 mm à 7 mm par 7 mm à 10 mm. Le rendement moyen en graines est de 78,8 pour-cent. Le poids de 100 micro-graines est compris entre 1,737 et 1,848 g comparé à 2,369 à 2,494 g pour les macro-graines. Les macro-graines commencent à germer au 5ème jour de semilles, quand on les sème le 4ème jour après la récolte des fruits. La germination est de 92,15 pour-cent. En revanche, le temps pris pour la germination au début est de 7 jours chez une micro-graine et la germination n'est que de 4,16 pourcent. Des résultats similaires ont été signalés par Bhagat et coll., (1993) chez *Aesculeus indica* colber et ils en ont conclu que les classes de graines de poids plus lourd donnent de meilleurs résultats en termes de germination, de survie, de hauteur de semis et de poids sec du semis que les classes de graines de poids plus léger.

Le pourcentage de germination baisse légèrement au début chez les graines stockées à température ambiante et est de 65,63 % au 20ème jour de stockage (Tableau I). Le déclin supplémentaire de la germination est brutal et seulement 15,63 % des graines germent au 60ème jour de stockage. Les graines cessent de germer au 150ème jour de stockage. L'étude actuelle est en accord avec celles de Raja Rama et coll., 1992 chez *Machilus bombycina*. Selon eux, les graines stockées à température ambiante présentent 5 % de germination après un mois.

Les graines stockées dans un réfrigérateur perdent peu à peu leur viabilité mais pas uniformément, comme le prouve le test de germination. Elle est de 59,35 % au 60ème jour comparée à 15,63 % pour les graines conservées à température ambiante. Les graines perdent leur viabilité et ne réussissent pas à germer au 390ème jour de stockage. Le stockage à long terme à faible température a été signalé chez plusieurs genres (Justice et Bass, 1979). Cependant, nos études contrastent avec les observations de Saha et coll., 1994, dans lesquelles les auteurs ont affirmé que les graines d'*Heteropanax* semées 3 ou 4 jours après la récolte présentent une meilleure germination et perdent leur viabilité complète en l'espace d'une semaine à température ambiante. Cela est peut être dû à un mauvais stockage des graines pendant leurs études, la température de stockage et la teneur en humidité de la graine étant les facteurs les plus importants ayant un effet sur la longévité de la graine (Justice et Bass, 1979).

Ainsi, les conclusions actuelles permettront de conserver des graines plus longtemps pour réaliser des pépinières à une période adaptée.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	535
General sericulture	
Mûrier	539
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	545
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	549
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	553
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	557
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	563
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	565
Silkworms: silk glands	
Soie	567
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portuguais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Silk market situation in Italy.

Situation du marché de la soie en Italie.

ANONYMOUS

1998 Indian Silk, Vol 37(5), 29. (E)

Silk industry in France.

L'industrie de la soie en France.

ANONYMOUS

1998 Indian Silk, Vol. 37(3), 29.(E)

Silk market in Germany.

Le marché de la soie en Allemagne.

ANONYMOUS

1998 Indian Silk, Vol. 37(4), 28. (E)

Silk products of Madhya Pradesh.

Produits de soie de Madhya Pradesh.

BHAGWAT S.S.

Rajiv Gandhi Gramodyog Mission, Bhopal, Madhya Pradesh, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(6-7), 84-86. (E)

Sericulture in China and India : A Comparision.

Sériculture en Chine et en Inde : une comparaison.

DANDIN S.B.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560 062, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(4), 5-9. (E)

Mulberry cultivation technology for Manipur.

Technologie de la culture du mûrier pour le Manipur.

IBOHAL SINGH N., SRIVASTAV P.K.

RTRS, Imphal, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(12), 9-12. (E)

Labour employment under different mulberry farm holdings - A comparative study.

Utilisation du travail dans différentes exploitations de mûriers. Une étude comparative.

JAYARAM H. *et al.*

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 52-56. (E)

Studies on adoption of sericultural innovations at farmers' level in Tamil Nadu: An empirical analysis.

Etudes sur l'adoption d'innovations pour la sériculture au niveau des fermiers au Tamil Nadu : une analyse empirique.

LAKSHMANAN S. *et al.*

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 44-47. (E)

Silk and milk = participation of farm youth.

Soie et lait = participation à la jeunesse des fermes.

LAKSHMI RAJU D., NATARAJU M.S.

University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(12), 15-17. (E)

Non-mulberry silkworms - Some biotechnological perspectives.

Vers à soie non-mûriers - Des perspectives biotechnologiques.

NAGARAJU J., REDDY D.

Seribiotech Research Laboratory, No.8, West of Chord road, Bangalore 560 086, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(6-7), 43-47. (E)

A legend : Arjuna - More than a Tasar food plant.

Une légende : Arjuna - Plus qu'une plante comestible pour le Tasar.

PATRO K.B.G., MOHANTY A.

E.S.S., Potangi, Koraput, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(12), 23-24. (E)

Sericulture in "God's own Country".

Sériculture au "pays de Dieu".

PHILIP T.

REC, Angamaly, Kerala, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(5), 20-23. (E)

Prospects of sericulture in Bijapur district of Karnataka.

Perspectives de sériculture dans le district de Bijapur au Karnataka.

PRAKASH B.G., DOLLI S.S.

Regional Research Station and Agri-College, Bijapur, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(4), 19-20. (E)

Karnataka : Economics of rainfed sericulture in recurrent drought-prone areas.

Karnataka : Economie de la sériculture non irriguée dans les zones fréquemment touchées par la sécheresse.

RAJESH B., AFSHAN I.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(3), 11-17. (E)

Muga culture in Coochbehar.

Culture du mûrier à Coochbehar.

SAHA R. *et al.*

REC, Coochbehar, West Bengal, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(12), 25. (E)

Uses, yield and nutritive value of mulberry (*Morus alba*) trees for ruminants in the semi-arid areas of central Tanzania.

Utilisations, rendement et valeur nutritive des mûriers (*Morus alba*) pour les ruminants en zone semi-aride en Tanzanie centrale.

SHAYO C.M.

Zonal Research and Training Centre, Livestock Production Research Inst., PO Box 202, Mpwappwa, Tanzania.

1997 Tropical Grasslands, Vol. 31(6), 599-604. (E)

Non-mulberry sericulture in India.

Sériciculture non mûrier en Inde.

SHETTY K.K., SAMSON M.V.

Central Silk Board, BTM Layout, Madiwala, Bangalore 560 068, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(6-7), 21-25. (E)

Potentials of mulberry sericulture in Assam.

Potentiels pour la sériciculture mûrier en Assam.

SINGH R.N., DEORI S., BORPUJARI P., MUKHERJEE P.K.

Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(4), 10-12. (E)

Wild silk research in India : past, présent and future.

Recherche sur la soie sauvage en Inde: passé, présent et futur.

SINHA B.R.R.Pd.

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

1998 Indian Silk, Vol. 37(6-7), 27-33,42. (E)

Utilisation of bye-products in silk industry.

Utilisation des sous-produits dans l'industrie de la soie.

SONWALKAR T.N.

Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(4), 24-27. (E)

Technological practices of sericulturists in non-traditional region of Karnataka.

Pratiques séricoles dans une région non-traditionnelle du Karnataka.

SRINIVASA G., DODDAGADAD C.B., JAYARAM H., GEETHADEVI R.G.

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

1998 Indian J. Seric., Vol. 37(1), 57-60. (E)

Conservation and sustainable exploitation of ecoraces in Madhya Pradesh.

Conservation et exploitation durable d'écotypes en Madhya Pradesh.

TIWARI S.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Katghora, Bilaspur, Madhya Pradesh, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(3), 18-22. (E)

West Bengal : winter hardy mulberry variety : a need.

Bengale Ouest : variété de mûrier résistant à l'hiver : un besoin.

VIJAYAN K. *et al.*

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(3), 6-8. (E)

Mûrier

Mulberry

***Morus* species (mulberry): in vitro culture, micropropagation, and the formation of mulberrofuran, kuwanol, and other secondary metabolites.**

Espèces de *Morus* (mûrier) : culture in vitro, micropropagation, et formation de furan ,de kuwanol et autres métabolites secondaires.

BAJAJ Y.P.S., IVANICKA J., UEDA S.

1998 Biotechnol. Agric. For., Vol.41, 261-285. (E)

Soil fertility status and correlations among fertility parameters in mulberry garden soils.

Etat de fertilité des sols et correlations entre les paramètres de fertilité dans les sols des champs de mûriers.

BONGALE U.D., LINGAIAH

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 062, India.

1998 Indian J. Seric., Vol. 37(1), 81-84. (E)

Macro and micronutrient status of mulberry garden soils in a bivoltine seed area.

Etats macro et micronutritifs des sols des champs de mûriers dans une zone de production de vers à soie bivoltins.

BONGALE U.D., LINGAIAH

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 062, India.

1998 Indian J. Seric., Vol. 37(1), 73-75. (E)

Vertical distribution of nitrogen fractions in mulberry garden soils.

Distribution verticale d'azote dans les sols des plantations de mûriers.

BONGALE U.D., LINGAIAH

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 062, India.

1998 Indian J. Seric., Vol. 37(1), 48-51. (E)

Effect of foliar application of secondary and micronutrients on growth, yield and quality parameters of mulberry.

Effet de l'application foliaire de micro-nutriments sur la croissance, le rendement et les paramètres de qualité du mûrier.

CHIKKALINGAIAH, GANGAPPA E., RAMESH S., RAO A.M.

1997 Mysore j. Agric. Sci., Vol 31(3), 209-212. (E)

Effect of foliar application of secondary and micronutrients on growth, yield and quality parameters of mulberry.

Effet de l'application foliaire de micro-nutriments sur la croissance, le rendement et les paramètres de qualité du mûrier.

CHIKKALINGAIAH, GANGAPPA E., RAMESH S., RAO A.M.

1997 *Mysore j. Agric. Sci.*, Vol 31(3), 209-212. (E)

Rapid diagnosis of mulberry dwarf mycoplasma-like organisms using a polymerase chain reaction procedure.

Diagnostic rapide des organismes du type mycoplasme du nanisme du mûrier par PCR.

DAI Q., LIU B., HE P., HE F., WU H., CHEN Z., LIU P.

1997 *Shandong Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, Vol. 32(3), 337-341. (E)

Genetic divergence in the mulberry.

Divergence génétique chez le mûrier.

FOTADAR P.K. *et al.*

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 180-185. (E,c)

Screening of mulberry genotypes against major fungal diseases and insect pest under field conditions.

Criblage des génotypes de mûrier contre les principales maladies fongiques et les insectes nuisibles en conditions naturelles.

FOTADAR R.K., DHAR A., DANDIN S.B.

Research Extension Centre, Regional Sericultural Research Station, Kathua - 184 101, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 40-43. (E)

Appropriate timing of insecticide application using total effective temperature of mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker.

Rythme approprié d'application d'insecticide en utilisant la température efficace pour la pyrale du mûrier, *Glyphodes pyloalis* Walker.

IKEGAMI T., FUSEGI T.

Sericultural research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki, 308-0125, Japan.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol.6, 11-17.(J)

SEM studies on the hyphal interactions between a biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and a mycopathogen *Fusarium solani* causing root rot disease in mulberry.

Etudes SEM sur les interactions fongiques entre un agent de biocontrôle *Trichoderma harzianum* et un mycopathogène *Fusarium solani* causant le pourrissement des racines chez le mûrier.

KUMAR V., SHARMA D.D., BABU A.M., DATTA R.K.

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 17-20. (E)

Observations on the morphological characters of mulberry gall-midge in North Guangdong.

Observations des caractères morphologiques de la galle du puceron de mûrier dans le nord du Guangdong.

MA X. *et al.*

Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 141-143. (C,e)

Phytoestrogens and floral development in dioecious *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. and *Morus rubra* L. (Moraceae).

Phytoestrogènes et développement floral chez *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. dioïque et *Morus rubra* L. (Moraceae).

MAIER C.G.A., CHAPMAN K.D., SMITH D.W.

1997 *Plant Sci. (Shannon Ireland)*, Vol. 130(1), 27-40. (E)

Comparative evaluation of S41 and M5 mulberry genotypes (*Morus spp.*). I. Effect of plant spacings and methods of leaf harvest on leaf yield and leaf moisture content.

Evaluation comparative des génotypes de mûriers S41 et M5 (*Morus spp.*). I. Effet de l'espacement des plantes, des méthodes de récolte des feuilles et du taux d'humidité des feuilles.

MALLIKARJUNAPPA R.S. *et al.*

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 062, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 29-32. (E)

Improvement of economic characters of mulberry silkworm, *Bombyx mori*, by a phytohormone, abscisic acid.

Amélioration des caractères économiques des mûriers pour vers à soie, *Bombyx mori*, par une phytohormone, l'acide abscissique.

NAIR K.S., TRIVEDI K., MAGADUM S.B., DATTA R.K.

1997 *J. Entomol. Res.*, Vol. 21(4), 343-349. (E)

Primary sensitization to *Morus alba*.

Première sensibilisation à *Morus alba*.

NAVARRO A.M. *et al.*

1997 *Allergy*, Vol. 52, 1144. (E)

Mulberry leaves chemical composition and inhibition of high blood sugar level.

Composition chimique des feuilles de mûrier et inhibition du niveau élevé de sucre dans le sang.

NODA S.

1998 *Shokuhin to Kagaku*, Vol. 40(2), 102-108. (E)

Historical views of pharmacological effects of mulberry leaves.

Historique des effets pharmaceutiques des feuilles de mûrier.

NODA S.

1998 *Shoku no Kagaku*, Vol. 241, 84-90. (E)

Mulberry leaf tea for preventing diabetes mellitus.

Thé aux feuilles de mûrier pour prévenir des méfaits du diabète.

NODA S.

1998 *Food Style* 21, Vol. 2(5), 50-55. (E)

Usefulness of mulberry 1-deoxynojirimycin for maintaining human health.

Utilité de la 1-deoxynojirimycine du mûrier pour le maintien de la santé humaine.

NODA S.

1997 *Shokuhin Kogyo*, Vol. 40(24), 60-66. (E)

Sprouting of winter buds, growth of branches and yield of mulberry fields in 1997.

Production de bourgeons en hiver, croissance des branches et rendement des champs de mûriers en 1997.

OHYAMA H., HIDA Y., NAGASE N.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 48-52. (J)

Relation between planting density and yield in mulberry fields.

Relation entre la densité de plantation et la production dans les champs de mûriers.

OHYAMA H., TOMITA K., YONEDA M., ARIGA T., TERAYAMA H., MEZAWA H. *et al.*

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-0125, Japan.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol.6, 24-30. (J)

Sprouting behaviour of som.

Le bourgeonnement chez *Machilus bombycina* king.

RAM R.

Central Tasar Research and Training Institute, Research Extension Centre, Palampur, Himachala Pradesh, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(4), 21-22. (E)

Eco-friendly approach for management of Root Knot.

Approche écologique de la gestion du nématode de la racine.

SHARMA D.D.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(4), 15-16. (E)

On - farm evaluation of cultural and chemical methods for the control of root-knot nematode disease of mulberry.

Evaluation des méthodes culturales et chimiques pour le contrôle de la maladie du nématode de la racine du mûrier.

SHARMA D.D., CHANDRASHEKAR D.S., SRIKANTASWAMY K. *et al.*

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 61-63. (E)

Management of zinc in mulberry.

Gestion du zinc dans les mûriers.

SINGHVI N.R. *et al.*

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(12), 13-14. (E)

Foliar characters and constituents in spontaneus hybrid genotypes of *Terminalia* (Pentaptera).

Caractères et constituants foliaires chez les génotypes hybrides spontanés de *Terminalia* (Pentaptera).

SRIVASTAV P.K., SINHA U.S.P., THANGAVELU K.

Regional Tasar Research Station, Mantripokhari, Imphal - 795 002, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 76-78. (E)

Seed germination in *Machilus bombycina* (Lauraceae).

Germination des graines chez *Machilus bombycina* (Lauraceae).

SRIVASTAVA A., SINGH K., SINGH R., DAS P.K., SIDDIQUI A.A., RAGHUVANSHI S.S.

Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow - 226 007, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 70-72. (E)

Optimisation of phosphorus availability in mulberry gardens.

Optimisation de la disponibilité de phosphore dans les mûraies.

SUBBA SWAMY M.R. *et al.*

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(5), 15-17. (E)

Clear winged moth: Infestation on mulberry.

Le papillon aux ailes claires : Infestation des mûriers.

SUBRAMANYA K.S.K., LAKSHMINARAYANA T.K.

Department of Sericulture, Government of Karnataka, Koppa, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(4), 13-14. (E)

Evaluation of mulberry (*Morus spp.*) genotypes for yield under Rayalaseema conditions of Andhra Pradesh.

Evaluation du rendement de génotypes de mûriers (*Morus spp.*) sous les conditions de Rayalaseema en Andhra Pradesh.

SUJATHAMMA P., DANDIN S.B.

Department of Sericulture, Sri Padmavathi Mahila Visvavidyalayam, Tirupati - 517 502, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 13-16. (E)

Breeding for triploid mulberry varieties in India.

Reproduction des variétés de mûriers triploïdes en Inde.

VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P.

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 1-7. (E)

Evaluation of triploid mulberry genotypes. I. Morphological and anatomical studies.

Evaluation des génotypes de mûriers triploïdes. I. Etudes morphologiques et anatomiques.

VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P., DOSS S.G., TIKADER A., ROY B.N.

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 64-67. (E)

Transformation of mulberry cotyledons by cecropin gene and regeneration of transgenic plants resistant to *Pseudomonas solanacearum* Dowson.

Transformation des cotylédons des mûriers par le gène de cécropine et régénération des plants transgéniques résistant à *Pseudomonas solanacearum* Dowson.

WANG Y. *et al.*

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 136-140. (C,e)

Studies on a new insecticide (Synphonate) to control mulberry geometrid (*Hemerophila atrilineata* Butler).

Etudes sur un nouvel insecticide (Synphonate) pour contrôler les géométrides du mûrier (*Hemerophila atrilineata* Butler).

WU F. *et al.*

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 131-135. (C,e)

Techniques of trapping and killing *Aseria orientalis* Motschulsky in mulberry.

Techniques de piégeage et de suppression d'*Aseria orientalis* Motschulsky chez le mûrier.

YANG G. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 186-187. (C)

Induction of nitrate non-utilizing mutants of mulberry anthracnose fungi, *Colletotrichum acutatum* and *Glomerella cingulata*, and their pathogenicity.

Induction de mutants de champignons de l'anthracnose du mûrier n'utilisant pas de nitrates, *Colletotrichum acutatum* et *Glomerella cingulata*, et leur caractère pathogène.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(3), 205-210. (J,e)

Annual development of mulberry anthracnose caused by *Colletotrichum dematium* in relation to position of leaves in tree.

Développement annuel de l'anthracnose du mûrier causée par *Colletotrichum dematium* en relation avec la position des feuilles sur l'arbre.

YOSHIDA S., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(4), 327-332. (J,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Silkworm assay for *Bacillus thuringiensis* formulations using diet incorporation.

Essai sur le ver à soie de formulations de *Bacillus thuringiensis* utilisant l'incorporation dans les aliments.

ASANO S., ISAWA T., SEKI A.

1997 *Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi*, Vol. 41(4), 187-194. (E)

Efficacy of carbendazim as an anti-microsporidial agent and its influence on the growth and cocoon characters of silkworm *Bombyx mori* L.

Efficacité du carbendazim comme agent anti-microsporidien et son influence sur la croissance et sur les caractéristiques du cocon du ver à soie *Bombyx mori* L.

CHANDRA A.K. *et al.*

1995 *Insect Sci. Its Appl.*, Vol. 16(2), 233-235. (E)

Determination of ammonium oxalate in Muscardine silkworm by oscillographic potentiometric titration.

Détermination de l'oxalate d'ammonium chez le ver à soie par dosage oscillographique potentiométrique.

DING Y., WU Q.

1997 *Fenxi Shiyanshi*, Vol. 16(5), 14-16. (E)

Studies on optimum pH values of artificial diet at different developmental stages of silkworm (*Bombyx mori*).

Etudes de la valeur optimale du pH d'un aliment artificiel à différents stades de développement du ver à soie (*Bombyx mori*).

HUANG J., XU J., LU S., MIAO Y.

1997 *Zhejiang Nongye Daxue Xuebao*, Vol. 23(2), 179-183. (E)

Methods in preparation and preservation of antibody derived from egg yolk, against silkworm virus.

Méthodes de préparation et de conservation d'anticorps dirigés contre des virus du ver à soie dérivés du jaune d'oeuf.

IKEGAMI T., KOBAYASHI N.

Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-0125, Japan.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 6-10. (J)

The occurrence of fungus disease with *Hirsutella satumaensis*, parasite on the silkworm larvae, at sericultural farm.

L'existence d'une maladie fongique due à *Hirsutella satumaensis*, parasite de la larve du ver à soie, dans les fermes sérícolas.

IKEGAMI T., KOBAYASHI N.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 34-36. (J)

Near infrared spectrophotometric recognition of chrysalis sex in silkworm cocoons.

Reconnaissance du sexe des chrysalides dans les cocons de vers à soie par spectroscopie en proche infra-rouges.

JIN T., LIU L., TANG X., PAN S.

1997 *Fenxi Ceshi Xuebao*, Vol. 16(1), 32-37. (E)

Effects of agricultural chemicals "BAROCK", "MORGAN" against growth of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des produits agricoles chimiques "BAROCK" et "MORGAN" contre la croissance des vers à soie, *Bombyx mori*.

KOBAYASHI N.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 37-39. (J)

Effects of agricultural chemicals within Propiconazole against growth of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des produits chimiques agricoles à Propiconazole contre la croissance des vers à soie, *Bombyx mori*.

KOBAYASHI N.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 31-33. (J)

Assessing of disinfection effect of chlorine and chlorine compound disinfectants on *Nosema bombycis* spores.

Evaluation des effets de la désinfection par le chlore et les composés chlorés désinfectants sur les spores de *Nosema bombycis*.

LU X. et al.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 191-192. (C)

Water utilization by two bivoltines races of silkworm *Bombyx mori* L.

Utilisation de l'eau par deux lignées bivoltines de ver à soie *Bombyx mori* L.

NAIK P.R., DELVI M.R.

Department of Zoology, University of Mysore, Mysore - 570 006, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 8-12. (E)

Comparative study of hybrid silkworm in 1997.

Etude comparative de vers à soie hybrides en 1997.

OHYAMA H.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 53-55. (J)

Mulberry production techniques corresponding to ultra multiple rearing silkworm.

Techniques de production de mûriers correspondant à la diversité d'élevages du ver à soie.

OHYAMA H., TOMITA K., IIDA Y., NAGASE N.

Sericultural research Institute, Ibaraki Agricultural center, Sekijo, Makabe, Ibaraki 308-0125, Japan.

1998 *Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent.*, Vol. 6, 18-23. (J)

Suchi : A new disinfectant.

Suchi : un nouveau désinfectant.

PATIL C.S., SHARADAMMA P., VENKATESH C.M.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(4), 17-18. (E)

The nutritive effects of Sinafort-B on *Bombyx mori* L.

Les effets nutritifs de Sinafort-B chez *Bombyx mori* L.

SAHA B.N., KHAN A.R.

1997 *Entomol*, Vol. 22(1), 29-34. (E)

Virulence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of non-permissive cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Virulence de l'infection du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* sur les culture de cellules non permissives du ver à soie, *Bombyx mori*.

SAKURAI M., SHIKATA M., SANO Y., HASHIMOTO Y., MATSUMOTO T.

Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(3), 211-216. (J,e)

Resham Jyothi-A wide spectrum bed disinfectant.

Resham Jyothi-Un désinfectant à large spectre pour litière.

SAMSON M.V. et al.

SSTL, Kodathi, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(3), 9-10. (E)

Production of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* and their utility for selection of pebrine infection in *Bombyx mori* L.

Production d'anticorps monoclonaux contre *Nosema bombycis* et leur utilité pour la sélection des infections à la pébrine chez *Bombyx mori* L.

SHAMIN M. et al.

1997 *J. Immunology*, Vol. 18(4), 357-370. (E)

Studies on cocoon shapes in different crosses of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes des formes de cocons chez différents hybrides de ver à soie *Bombyx mori* L.

SINGH R., KALPANA G.V., SUDHAKARA RAO P., AHSAN M.M.

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 85-88. (E)

Induction of tolerance in silkworm, *Bombyx mori* L. to BmNPV infection by application of selection pressure.

Induction de la tolérance vis à vis de l'infection par le BmNPV chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. par pression de sélection.

SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J.

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore - 641 003, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 79-80. (E)

Protein A linked latex antisera, test for detection of infectious flacherie of silkworm *Bombyx mori* L. caused by *Bombyx mori* infectious flacherie virus.

Test par antisera contre la protéine A liés au latex pour la détection de la flacherie causée par le virus de la flacherie infectieuse chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SIVAPRASAD V., RENU S., NATARAJU B., DATTA R.K.

1997 *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 35(11), 1203-1207. (E)

Uzipowder: A new chemical formulation.

Poudre Uzi : Une nouvelle formulation chimique.

VEERANNA G., NIRMALA M.R.

Karnataka State Sericulture Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(5), 18-19. (E)

Studies on pebrine infection in silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'infection par la pébrine chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

WANG Y. *et al.*

Suzhou University, Suzhiu 212018, China.

1998 Canye Kexue, Vol. 24(3), 156-161. (C,e)

Studies on control of transovarian transmission of *Nosema bombycis* by hot and dry air treatment.

Etudes du controle de la transmission transovarienne de *Nosema bombycis* par traitement à air chaud et sec.

XU X. *et al.*

South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China.

1998 Canye Kexue, Vol. 24(3), 149-155. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Epidemic of seasonal ataxia in Nigeria following ingestion of the African silkworm *Anaphe venata*: role of thiamine deficiency?

Epidémie d'ataxie saisonnière au Nigéria suite à l'ingestion du ver à soie africain *Anaphe venata* : rôle de la déficience en thiamine ?

ADAMOLEKUN B., MAC CANDLESS D., BUTTERWORTH R.

1997 *Metab. Brain Dis.*, Vol. 12(4), 251-258. (E)

Global scenario of wild silks.

Scénario général pour les soies sauvages.

AKAI H.

1030-34 Miyawada, Fujishiro-machi, Ibaraki 300-05, Japan.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(6-7), 18-20. (E)

Monstrosity in *A. mylitta* D.

Monstruosité chez *A. mylitta* D.

ALAM M.O., MOHANTA B.K.

Central Tasar Research and Training Institute, Bangriposi, India.

1998 *Indian Silk*, Vol.37(4), 23. (E)

Dimorphism in chromosome number of *Samia cynthia walkeri* in China.

Dimorphisme dans le nombre de chromosomes chez *Samia cynthia walkeri* en Chine.

BANNO Y., SONG F., KAWAGUCHI Y., KOGA K., XIANG Z.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 2, 11-13. (E)

Coloured wild silkworm larvae.

Larves de vers à soie sauvages colorées.

DAS P.K.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(6-7), 26. (E)

Oak Tasar in India : problems and prospects.

Tasar du Chêne en Inde: problèmes et perspectives.

JOLY M.S.

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

1998 Indian Silk, Vol. 37(6-7), 35-37. (E)

Abnormal tasar cocoons.

Cocons Tasar anormaux.

MOHANTY P.K., BEHERA B.

P.G. Department of Zoology, Utkal UNIVERSITY, Vanivitar, Bhubaneswar, Orissa, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(8), 30-31. (E)

Sal Borer: A menace to sal forest and Tasar culture.

Coléoptère térébrant : une menace pour les forêts et l'élevage du Tasar.

MOHANTY P.K., BEHERA B., DHAL A., PANDIT J.K.

Department of Zoology, Utkal University, Bhubaneswar, India.

1998 Indian Silk, Vol 37(5), 24-26. (E)

Biodiversity of wild silkworms.

Biodiversité des vers à soie sauvages.

NARASIMHANNA M.N.

Central Silk Board, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(6-7), 48-50. (E)

Rearing condition of the Japanese Oak Silkworm, *Antheraea yamamai* in Sericultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center.

Conditions d'élevage du ver à soie japonais du Chêne, *Antheraea yamamai* à l'Institut de recherche séricicole, au centre agricole d'Ibaraki.

NOGUCHI Y.

1998 Bull. Seric. Res. Inst. Ibaraki Agric. Cent., Vol. 6, 40-47. (J)

3rd internationale conference on wild silkmooths - Global cooperation for wild silk development.

3ème conférence internationale sur les vers à soie sauvages. Coopération globale pour le développement de la soie sauvage.

RAMESHA M.N., KIRSUR M.V.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 Indian Silk, Vol. 37(8), 5-12. (E)

Mating under nylon net in tropical tasar grainage.

Accouplement sous filet de nylon pour le grainage du Tasar tropical.

RATH S.S., SINHA B.R.R.P.

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

1998 Indian Silk, Vol. 37(5), 27-28. (E)

Bio-chemical alterations in rust affected leaves of tapioca - An important food plant of eri silkworm.

Alterations biochimiques des feuilles de tapioca affectées par la rouille. Une importante plante hôte pour les vers à soie eri.

SHREE M.P., CHANDRAMMA

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore - 560 056, India.

1998 Indian J. Seric., Vol. 37(1), 68-69. (E)

Manure and fertilizers for muga food plants.

Fumure et fertilisants pour les plantes nourricières muga.

SIDDIQUI A.A., BASUMATARI B.K., LAL B., DAS P.K.

P-3 Basic Seed Farm, Majra, Dehradun, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(8), 27-29. (E)

Ecoraces of indian wild silkmooths.

Ecoraces de vers à soie sauvages indiens.

SINHA B.R.R.Pd.

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

1998 *Indian Silk*, Vol.37(6-7), 38. (E)

Non-mulberry host plant maintenance : needs.

Maintien des plantes hôtes non-mûrier: besoins.

SINHA S.S.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(6-7), 39-42. (E)

Effect of uzi fly *Blepharipa zebina* (Walker) on the hemolymph free amino acids of tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury.

Effet de la mouche uzi *Blepharipa zebina* (Walker) sur les acides aminés libres de l'hémolymph du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury.

SINHA U.S.P., BANERJEE N.D., SINGH R.N., SINHA S.S.

1997 *Proc. Natl. Acad. Sci., India, sect. B*, Vol. 67(2), 133-136. (E)

Tiwari grainage tray : a breakthrough in Taser seed preparation.

Claie de grainage Tiwari : une avancée pour la préparation des graines de Tasar.

TIWARI S.K.

Central Tasar Research and Training Institute, Bilaspur, M.P., India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(12), 18-22. (E)

Comparative study of metabolism of carbohydrates in non mulberry silkworms, *Philosamia ricini* (Boisduval) and *Antheraea assama* (Westwood).

Etude comparative du métabolisme des carbohydrates chez les vers à soie non mûriers, *Philosamia ricini* (Boisduval) et *Antheraea assama* (Westwood).

UNNI B.G., CHOUDHURY A.

1997 *J. Entomol. Res.*, Vol. 21(3), 259-266. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *E. coli*.

Purification et caractérisation d'une soie d'araignée recombinante exprimée chez *E.coli*.

ARCIDIACONO S., MELLO C., KAPLAN D., CHELEY S., BAYLEY H.

1998 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 49(1), 31-38. (E)

Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhydrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae.

Deux mutations clés dans le domaine de spécificité des hôtes du gène p143 du virus de la polyèdrose nucléaire d'*Autographa californica* sont nécessaires pour tuer les larves de *Bombyx mori*.

ARGAUD O., CROIZIER L., LOPEZ-FERBER M., CROIZIER G.

1998 *J.Gen. Virol.*, Vol. 79, 931-935. (E)

Cytogenetical analysis of chromosomal aberration due to translocation between the 23rd and 25th linkage groups in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse cytogénétique de l'aberration chromosomique due à la translocation entre les 23e et 25e groupes de liaison chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

BANNO Y., KAWAGUCHI Y., DOIRA H.

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

1993 *Hereditas*, Vol. 118, 259-263. (E)

Aberrant meiotic behavior of chromosomes due to reciprocal translocation in the EDs mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.

Comportement méiotique anormal des chromosomes dû à la translocation réciproque chez les mutants EDs de vers à soie, *Bombyx mori*.

BANNO Y., SAKAIDA Y., NAKAMURA T., KAWAGUCHI Y., KOGA K., DOIRA H.

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

1996 *Hereditas*, Vol. 125, 25-29. (E)

Construction of GST,6XHis fusion expression baculovirus transfer vectors.

Construction de GST,6XHis, vecteurs baculovirus de transfert et d'expression.

GONG C. *et al.*

School of Sericulture Sci., Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 162-169. (C,e)

Efficient production of recombinant protein in *Spodoptera frugiperda*/AcNPV system utilising silkworm hemolymph.

Production efficace de protéine recombinante dans le système *Spodoptera frugiperda*/AcNPV utilisant l'hémolymph de ver à soie.

HA S.H., PARK T.H.

1997 *Biotechnol. Lett.*, Vol. 19(11), 1087-1091. (E)

Molecular cloning of a new type of cDNA for pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage moléculaire d'un nouveau type d'ADNc pour le neuropeptide activateur de la biosynthèse de phéromone chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

KAWANO T., KATAOKA H., NAGASAWA H., ISOGAI A., SUZUKI A.

1997 *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Vol. 61, 1745-1747. (E)

Cloning and expression of fibroin C subunit as a fusion protein in *Escherichia coli*.

Clonage et expression de la sous-unité C de fibroïne comme protéine de fusion chez *Escherichia coli*.

LI H., CAI Z., SHI H., YU T., HUANG W.

1998 *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, Vol. 19(4), 564-567. (E)

The p95 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus: temporal expression and functional properties.

Le gène p95 du virus de la polyhédrose nucléaire de *Bombyx mori* : expression temporelle et propriétés fonctionnelles.

LU M., SWEVERS L., IATROU K.

1998 *J. Virol.*, Vol. 72, 4789-4797. (E)

Microheterogeneity in the polyhedrin gene of *Bombyx mori*, a cytoplasmic polyhedrosis virus.

Microhétérogénéité dans le gène de la polyédrine de *Bombyx mori*, un virus de la polyédrose cytoplasmique.

MIYAJIMA S. *et al.*

Faculty of Engineering, Mie University, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 287-294. (J,e)

Cloning, sequencing and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin.

Clonage, séquençage et expression du récepteur de *Bombyx mori* aux toxines insecticides CryIA(a) de *Bacillus thuringiensis*.

NAGAMATSU Y. *et al.*

1998 *Biosci. Biotechnol., Biochem*, Vol. 62(4), 727-734. (E)

Isolation of a mariner-like sequence containing a complete open reading frame for transposase from *Attacus atlas* and its phylogenetic relationships within the Ditrysia of Lepidoptera.

Isolement à partir d'*Attacus atlas* d'une séquence de type "mariner" contenant une phase de lecture ouverte pour la transposase et ses relations phylogénétiques à l'intérieur des Lepidoptères.

NAKAJIMA Y., HASHIDO K., SHIINO T., HAYASHI T., TSUCHIDA K.

Gene Research Center, University of the Ryukyus, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 271-278. (J,e)

Clustering of polyvoltine strains of the silkworm *Bombyx mori* by image processing method: Significance of cocoon size and weight variables.

Groupement des races polyvoltines de ver à soie *Bombyx mori* par traitement d'image : signification des variables taille des cocons et poids.

RAMA MOHANA RAO P., NAKADA T.

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

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 33-39. (E)

DNA transfection in the ecdysteroid-responsive gv1 cell line from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Transfection d'ADN dans une lignée cellulaire gv1 du sphinx du tabac, *Manduca sexta* sensible à l'ecdystéroïde.

RIDDIFORD L.M., LAN Q.

Department of Zoology, University of Washington, Box 351800, Seattle, Washington 98195-1800, USA.

1996 *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, Vol. 33, 615-621. (E)

Sperm-mediated gene transfer in the silkworm, *Bombyx mori*.

Transfert de gène par le sperme chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

SHAMILA Y., MATHAVAN S.

1998 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 37(2), 168-177. (E)

Involvement of the DNA replication-related element (DRE) and DRE binding factor (DREF) in transcriptional regulation of the *Bombyx* U PCNA gene.

Participation de l'élément relié à la réplication de l'ADN (DRE) et du facteur de liaison DRE (DREF) dans la régulation transcriptionnelle du gène U PCNA de *Bombyx*.

TAKAHASHI Y. *et al.*

1997 *J. Biochem.*, Vol. 122, 1215-1223. (E)

Cloning and characterization of a mariner-like element in the silkworm *Bombyx mori*.

Clonage et caractérisation d'un élément semblable à l'élément "mariner" chez le ver à soie *Bombyx mori*.

TOMITA S., SOHN B., TAMURA T.

1997 *Genes Genet. Syst.*, Vol. 72(4), 219-228. (E)

Structure of genes for cecropin A and an inducible nuclear protein that binds to the promoter region of the genes from the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure des gènes de cécropine A et d'une protéine nucléaire inductible qui se lie à la région du promoteur des gènes chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

YAMANO Y. *et al.*

1998 *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Vol. 62(2), 237-241. (E)

Cloning and analysis of MAR (Matrix attachment region) from *Bombyx mori* genome.

Clonage et analyse de MAR (région d'attache matricielle) du génome du *Bombyx mori*.

ZHOU C. *et al.*

1998 *Zhongguo Kexue Jishu Daxue Xuebao*, Vol. 28(1), 16-20. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Stereochemistry of 11-desaturation and inhibitors of 10,12-desaturation in the biosynthesis of bombykol, sex pheromone of the female silkworm moth, examined with deuterated precursors.
Stéréochimie de la désaturation en 11 et des inhibiteurs de désaturation en 10,12 dans la biosynthèse de bombycol, phéromone sexuelle du papillon du ver à soie femelle, examinée avec des précurseurs deutérés.

ANDO T., IKEMOTO K., OHNO R., YAMAMOTO M.
1998 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 37(1), 8-16. (E)

Analysis of precocious metamorphosis induced by application of an imidazole derivative to early third instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse de la métamorphose précoce induite par l'application d'un dérivé d'imidazole chez les larves de 3ème âge du ver à soie *Bombyx mori*.

GU S., CHOW Y.
1997 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 36(4), 349-361. (E)

The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*.

Le processus d'assimilation d'ammonium chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

HIRAYAMA C., KONNO K., SHINBO H.
1997 *J. Insect Physiol.*, Vol. 43, 959-964. (E)

Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme.

Caractérisation de l'aminopeptidase N de la membrane pileuse de l'intestin moyen de la larve du ver à soie, *Bombyx mori* comme une enzyme de zinc.

HUA G., TSUKAMOTO K., TAGUCHI R., TOMITA M., MIYAJIMA S., IKEZAWA H.
1998 *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1383, 301-310. (E)

Bombycin, an insect insulin-related peptide which has a prothoracicotropic activity.

La Bombycine, un peptide d'insecte apparenté à l'insuline qui a une activité prothoracicotrope.

IWAMI M.
1998 *Seikagaku*, Vol. 70(4), 305-308. (E)

Insect hormone, bombyxin, sharing a common precursor with insulin.

La bombyxine, partage un précurseur commun avec l'insuline.

IWAMI M., MOTO K.
1998 *Kagaku to Seibutsu*, Vol. 36(1), 8-10. (E)

The effects of environment in mounting stage on cocoon fluorescent colour and reelability.

Les effets de l'environnement au stade de la montée sur la couleur fluorescente des cocons et la dévidabilité.

JING X.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 195-196. (C)

Production and activation of humoral lectin protein in *Bombyx mori*.

Production et activation d'une protéine de lectine humorale chez *Bombyx mori*.

KATO Y., NAKAMURA T., TAKEUCHI T.

Tezukayama College, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 319-326. (J,e)

Synthesis and precocious metamorphosis inducing activity of 3-pyridyl ethers.

Synthèse et métamorphose précoce induite par l'activité des éthers 3-pyridyl.

KUWANO E., SHIMIZU M., SHIMAZU K., NAKAZAWA S., SUZUKI K.

1998 *Pestic. Sci.*, Vol. 52(3), 251-257. (E)

Isolation and purification of lysozyme from the Chinese oak silkworm pupae.

Isolement et purification de lysozyme à partir de la chrysalide du ver à soie chinois du chêne.

LOU L., YAO R., HUANG Z.

1997 *Gongye Weishengwu*, Vol. 27(1), 21-24. (E)

Heterogeneity of odorant-binding proteins in the antennae of *Bombyx mori*.

Hétérogénéité des protéines fixatrices d'odeur chez les antennes de *Bombyx mori*.

MAIDA R., PROEBSTL T., LAUE M.

1997 *Chem. Senses*, Vol. 22(5), 503-515. (E)

Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*.

Les Eicosanoïdes sont les médiateurs de l'induction de gènes d'immunité chez le corps adipeux du ver à soie, *Bombyx mori*.

MORISHIMA I., YAMANO Y., INOUE K., MATSUO N.

1997 *FEBS Lett.*, Vol. 419, 83-86. (E)

Identification of the *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin.

Identification du récepteur de l'intestin moyen aux toxines insecticides CryIA(a) du *Bacillus thuringiensis* chez *Bombyx mori*.

NAGAMATSU Y. et al.

1998 *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, Vol. 62(4), 718-726. (E)

Precocious metamorphosis in *Bombyx mori* larvae and diapause termination in pharate first-instar larvae of *Antheraea yamamai* induced by 1-substituted imidazoles.

Métamorphose précoce chez la larve du *Bombyx mori* et conclusion de la diapause au premier stade larvaire chez *Antheraea yamamai* induite par un substitut d'imidazoles.

NAKAMURA A., SAGISAKA A., SAKAGUCHI M., SUZUKI K., KUWANO E.

1998 *Nippon Noyaku Gakkaishi*, Vol. 23(2), 117-122. (E)

Extraction and preparation technique of silkworm chrysalis (*Bombyx mori* L.) pupa chitin and chitosan.

Extraction et préparation de chitine et de chitosan à partir des chrysalides de vers à soie (*Bombyx mori* L.).

NI H., CHEN H., YANG Y., TAO L.

1998 *Hubei Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, Vol. 20(1), 94-96. (E)

Development changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori*.

Changements de teneur en hormone juvénile dans l'hémolymphe et synthèse in vitro par les corpora allata du ver à soie, *Bombyx mori*.

NIIMI S., SAKURAI S.

1997 *J. Insect Physiol.*, Vol. 43, 875-884. (E)

Structural study on silkworm eclosion hormone fragment (1-34) in solution by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Etudes structurales sur le fragment (1-34) de l'hormone d'éclosion du ver à soie en solution par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire protonique.

NOSAKA A., KANAORI K., UMEMURA I., TAKAI M., FUJITA N.

1998 *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 6(4), 465-472. (E)

Application methods and toxic effects of an imidazole derivative, Triflumizole, in *Bombyx mori*.

Méthodes d'application et effets toxiques d'un dérivé d'imidazole, Triflumizole, chez *Bombyx mori*.

OCHI H., KIUCHI M.

Uwajima Central Regional Agricultural Extension Center, 7-1 Tenjintyo, Ehime, 798-8551 Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(4), 303-310. (J,e)

Mechanism of maturation of *Bombyx mori* sperm and its inducer, initiatorin.

Mécanisme de maturation du sperme du *Bombyx mori* et son inducteur, l'initiatorine.

OSANAI M.

1998 *Kagaku to Seibutsu*, Vol.36(2), 130-137. (E)

Establishment of a cell line from pupal ovary of *Philosamia cynthia ricini* and its susceptibility to nuclear polyhedrosis virus.

Etablissement d'une lignée cellulaire à partir de l'ovaire de *Philosamia cynthia ricini* et sa sensibilité au virus de la polyèdrose nucléaire.

PU Q., HU M., LU W.

1997 *Wuhan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, Vol. 43(2), 221-226. (E)

Effect of antijuvénile hormone KK-42 and subsequent application of JH on female reproductive system of tropical tasar silkmoth, *Antheraea mylitta*.

Effet de l'hormone anti juvénile KK-42 et des applications consécutives de JH sur le système de reproduction des femelles du papillon tasar tropical, *Antheraea mylitta*.

RAVIKUMAR G., OJHA N.G., THANGAVELU K.

1997 *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 35(10), 1135-1137. (E)

Thyroxine influence on different non-specific adenosine triphosphatase activities in fat body of *Bombyx mori* during development.

Influence de la thyroxine sur les différentes activités non spécifiques de l'adénosine triphosphatase chez le corps adipeux de *Bombyx mori* pendant son développement.

REDDY K.D., CHAUDHURI A.

1998 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 37(3), 191-196. (E)

Developmental expression of Ultraspiracle proteins in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval life and the onset of metamorphosis.

Expression des protéines Ultraspiracle dans l'épiderme du sphinx du tabac, *Manduca sexta*, pendant sa vie larvaire et le début de sa métamorphose.

RIDDIFORD L.M. *et al.*

Department of Zoology, University of Washington, Box 351800, Seattle, Washington 98195-1800, USA.

1997 *Dev Genes Evol*, Vol. 207, 381-388. (E)

Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis.

Régulation du facteur de transcription E75 par la 20-hydroxyecdysone et l'hormone juvénile dans l'épiderme du sphinx du tabac, *Manduca sexta*, pendant les mues larvaires et la métamorphose.

RIDDIFORD L.M. *et al.*

Department of Zoology, University of Washington, Box 351800, Seattle, Washington 98195-1800, USA.

1998 *Developmental Biology*, Vol. 193, 127-138. (E)

The ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene of *Autographa californica* nucleopolydovirus alters the molt and metamorphosis of a non-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Le gène de l'UDP-glucosyl transférase du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* modifie la mue et la métamorphose d'un insecte non-cible, le ver à soie, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

SANO Y., HASHIMOTO Y., MATSUMOTO T.

1998 *J. Gen. Virol.*, Vol. 79, 1547-1551. (E)

Juvenile hormone mimics and silk productivity.

Mimétiques d'hormone juvénile et productivité de soie.

SASHINDRAN NAIR K., TRIVEDI K., CHINYA P.K.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(8), 23-25. (E)

Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduced the major storage carbohydrates in the silkworm, *Bombyx mori*.

La Bombycine, un peptide d'insectes apparenté à l'insuline, réduit les réserves majeures d'hydrates de carbone chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

SATAKE S. *et al.*

1997 *Comp. Biochem. Physiol., Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 118B, 349-357. (E)

Purification and characterization of sepiapterin deaminase from the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation de la sépiaptérine-désaminase du ver à soie *Bombyx mori*.

SAWADA H. *et al.*

1998 *Pteridines*, Vol. 9(1), 18-21. (E)

Identification and characterization of a novel polypeptide in the CNS of *Bombyx mori* during pupal-adult transformation.

Identification et caractérisation d'un nouveau polypeptide dans le CNS de *Bombyx mori* durant la transformation larve - adulte.

SHANAVAS A., DUTTA-GUPTA A., MURTHY C.R.K.

1997 *Entomon.*, Vol. 22(1), 1-6. (E)

Identification, characterization, immunocytochemical localization and developmental changes in the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the CNS of *Bombyx mori* during postembryonic development.

Identification, caractérisation, localisation immunocytochimique et changements au cours du développement dans l'activité de la protéine kinase II calcium/calmoduline dépendante dans le CNS de *Bombyx mori* pendant le développement post-embryonnaire.

SHAVANAS A., DUTTA-GUPTA A., MURTHY C.R.K.

1998 *J. Neurochem.*, Vol. 70, 1644-1651. (E)

Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*.

Contrôle neuroendocrine de la sécrétion de l'hormone de diapause chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

SHIMIZU I., AOKI S., ICHIKAWA T.

1997 *J. Insect Physiol.*, Vol. 43, 1101-1109. (E)

Carbachol-induced protein phosphorylation in the brain-corpora cardiacum-corpora allatum complex of the silkworm, *Bombyx mori*.

Phosphorylation des protéines induite par le carbachol dans le complexe cerveau-corpora cardiacum-corpora allatum du ver à soie, *Bombyx mori*.

SHIRAI Y., SAKAMURA Y., SUMIDA M., AIZONO Y.

1997 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 32, 573-581. (E)

Morphological changes in the nervous system of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) during metamorphosis.

Changements morphologiques dans le système nerveux du ver à soie, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) pendant la métamorphose.

SIVA PRASAD S., MURALI MOHAN P.

Department of Zoology, S.V. University, Tirupati - 517 502, India.

1998 *Indian J. Seric.*, Vol. 37(1), 21-28. (E)

The orphan receptor BmHNF-4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains.

Le récepteur orphelin BmHNF-4 du papillon *Bombyx mori* : expression ovarienne et zygotique de deux ARNm isoformes codant des polypeptides avec des domaines d'activité différents.

SWEVERS L., IATROU K.

1998 *Mech. Dev.*, Vol. 72(1/2), 3-13. (E)

Studies on chitosan prepared from silkworm pupae as materials for microcapsule.

Etudes sur le chitosan préparé à partir des chrysalides de vers à soie comme matériel pour microcapsules.

TAI N. *et al.*

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

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 170-174. (C,e)

Preparation of chitosan from silkworm pupae and using chitosan as support of enzyme immobilization.

Préparation de chitosan de chrysalides de vers à soie et utilisation de chitosan comme support d'immobilisation d'enzyme.

TAI N., JI X., YUAN Z., ZHUANG D.

1997 *Tianran Chanwu Yanjiu Kaifa*, Vol. 9(2), 48-52. (E)

Autolytic activation mechanism of *Bombyx* acid cysteine protease (BCP).

Mécanisme d'activation autolytique de la protéase à cystéine de *Bombyx mori* (BCP).

TAKAHASHI S.Y., YAMAMOTO Y., WATABE S., KAGEYAMA T.

1997 *Biochem. Mol. Biol. Int.*, Vol. 42(3), 591-600. (E)

Expression of antibacterial protein genes in ligated larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Expression des gènes de protéines antibactériennes chez la larve ligaturée du ver à soie, *Bombyx mori*.

TANAI K., YAMAKAWA M.

1998 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 33(1), 179-183. (E)

Effect of juvenile hormone analogs R77 and W328 on the silkworm *Bombyx mori* L.

Effets des analogues d'hormone juvénile R77 et W328 sur le ver à soie *Bombyx mori* L.

TRIVEDI K., SHIVAKUMAR G.R., MAGADUM S.B., NAIR K.S., DATTA R.K.

1996 *J. Trop. Agric.*, Vol. 34(1), 76-78. (E)

Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*.

Existence de la sérine-racémase dépendante du pyridoxal 5' phosphate chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

UO T., YOSHIMURA T., SHIMIZU S., ESAKI N.

1998 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 246, 31-34. (E)

Ultrastructural changes of median neurosecretory cells in the brain of *antheraea yamamai* during metamorphosis.

Changements ultrastructuraux des cellules neurosécrétrices médianes dans le cerveau d'*antheraea yamamai* pendant la métamorphose.

WANG Y. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 193-194. (C)

Changes in protein synthesis and cellular morphology in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori* during larval-pupal metamorphosis.

Variations de la synthèse de protéines et de la morphologie cellulaire chez le corps adipeux du ver à soie, *Bombyx mori* durant la métamorphose larvo-nymphe.

XU Y.-S., KANKE E., KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya 321, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(3), 223-230. (J,e)

Insect antibacterial proteins: Regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics.

Protéines antibactériennes de l'insecte : les mécanismes régulateurs de leur synthèse et possibilité comme nouveaux antibiotiques.

YAMAKAWA M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(3), 163-182. (J,e)

Cytocidal effects of cecropin D from chinese oak silkworm on human Adenocarcinoma of rectum.

Effets de destruction cellulaire de la cécropine D du ver à soie chinois du chêne sur l'adénocarcinome du rectum chez l'homme.

ZHANG W. *et al.*

Institute of Molecular Biology, The First Military Medical College, Guangzhou, 510318, China.

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 144-148. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Cell differentiation of embryonic midgut of *Antheraea yamamai*.

Différenciation cellulaire de l'intestin moyen embryonnaire d'*Antheraea yamamai*.

BABA H., KUWABARA N., IWASHITA Y.

Utsunomiya Junior, College High School, 1-35 mutsumi, Utsunomiya, Tochigi 320-0865, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 279-286. (J,e)

Inheritance and characteristics of a novel low-temperature sensitive gray-egg mutation in *Bombyx mori*.

Hérédité et caractéristiques d'une nouvelle mutation des oeufs gris sensibles à une faible température chez *Bombyx mori*.

BANNO Y., KAWAGUCHI Y. *et al.*

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 265-270. (J,e)

Comparison of chorion structure of eggs from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae) and their first filial generation.

Comparaison de la structure du chorion des oeufs de *Bombyx mori* et *Bombyx mandarina* (Lepidoptera : Bombycidae) et leur première génération filiale.

BANNO Y., KAWAGUCHI Y., KOGA K., KAWARABATA T., DOIRA H.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 31(3), 407-415. (E)

Effects of local irradiation of heavy ion microbeam on the embryogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des irradiations locales par micro-rayons d'ions lourds sur l'embryogénèse chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

KIGUCHI K., YAMASAKI S., KOBAYASHI U., WATANABE H.

1997 *JAERI-Rev.*, Vol. 97-015, 45-47. (E)

Analysis of chorion proteins of *Bombyx mandarina* in comparison with those of *Bombyx mori*.

Analyse des protéines de chorion chez *Bombyx mandarina* en comparaison avec celles de *Bombyx mori*.

SAKAGUCHI B., SUGAHARA K., NINAKI O., GOLDSMITH M.R., KAWAGUCHI Y.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(3), 197-203. (J,e)

Resistance of eggs of different silkworm varieties to cold-storing.

Résistance au froid des oeufs de différentes variétés de vers à soie.

WU D. *et al.*

1998 *Canye Kexue*, Vol. 24(3), 188-190. (C)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Approaching to the mysteries of silk formation. Why are the fibrous structures different in domestic and wild silkworms?

Approche des mystères de la formation de la soie. Pourquoi les structures des fibres sont-elles différentes entre les vers à soie sauvages et les domestiques ?

AKAI H.

1997 *Kagaku to Seibutsu*, Vol. 35(12), 871-877. (E)

Changes in H⁺ translocating vacuolar type ATPase in the anterior silk gland cell of *Bombyx mori* during metamorphosis.

Variations de l'ATPase de translocation vacuolaire dans la cellule de la glande séricigène antérieure chez *Bombyx mori* pendant la métamorphose.

AZUMA M., OHTA Y.

1998 *J. Exp. Biol.*, Vol. 201, 479-486. (E)

Silk and sequence.

Soie et séquence.

CALVERT P.

Department of Materials Science and Engineering, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA.

1998 *Nature*, Vol. 393, 309-311. (E)

Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions".

Les protéines de soie mineures de la glande ampoulaire de l'araignée contiennent de nouvelles séquences répétées et des zones d'espacement hautement conservées ne ressemblant pas à la soie.

COLGIN M., LEWIS R.V.

1998 *Protein Sci.*, Vol. 7(3), 667-672. (E)

Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptors isoforms. Ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands.

Expression spécifique du tissu et du stade de deux isoformes du récepteur d'ecdysone chez le ver à soie. Transcription dépendante de l'ecdystéroïde dans les glandes séricigènes antérieures en culture.

KAMIMURA M., TOMITA S., KIUCHI M., FUJIWARA H.

1997 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 248, 786-793. (E)

Preparation and characterization of silk gland ribosome from *Bombyx mori*.

Préparation et caractérisation des ribosomes de la glande séricigène de *Bombyx mori*.

NOMURA T. *et al.*

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokita 3-1531, Ueda-shi, Nagani-ken 386-8567, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(4), 311-318. (J,e)

Characterization of the P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*.

Carctérisation du gène P25 de la soie et des éléments d'insertion associés chez *Galleria mellonella*.

YANG C. *et al.*

1998 *Gene*, Vol. 209, 157-165. (E)

Subunit composition of silk fibroin.

Composition d'une sous-unité de la fibroïne de soie.

YU O. *et al.*

1997 *Gaofenzi Xuebao*, Vol. 5, 629-632. (E)

The P25 component of *Galleria* silk.

Le composant P25 de la soie de *Galleria*.

ZUVOREC M. *et al.*

1998 *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 257(3), 264-270. (E)

Soie

Silk

Morphology and crystal structure of a recombinant silk-like molecule, SLP4.

Morphologie et structure cristalline d'une molécule de soie recombinée, SLP4.

ANDERSON J.P.

1998 Biopolymers, Vol. 45(4), 307-321. (E)

Immobilisation of thorium on fibroin by polyacrylonitrile (PAN).

Immobilisation du thorium sur la fibroïne par le polyacrylonitrile (PAN).

ASLANI M.A.A., AKYIL S., ERAL M.

1997 Waste Manage.(Oxford), Vol. 17(1), 87-89. (E)

Relationship between pH value and permeability of pharmaceuticals through fibroin protein membrane.

Relation entre la valeur du pH et la perméabilité des produits pharmaceutiques à travers une membrane de fibroïne.

CHEN J., LIU G., SHEN Z.

1997 Gongneng Gaofenzi Xuebao, Vol. 10(3), 387-392. (E)

Studies on chitosan-fibroin blend membranes. 1/ Structure of the blend membranes and improvement of the water absorption and the mechanical property of fibroin.

Etudes sur les membranes mélangées de fibroïne et de chitosan. 1/ Structure des membranes mélangées, amélioration de l'absorption d'eau et propriétés mécaniques de la fibroïne.

CHEN X., LI W., ZHONG W., LU Y., YU T.

1998 Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao, Vol. 19(2), 300-304. (E)

The aluminium (III) sensitivity of chitosan-silk fibroin complex membrane on swelling and its application on chemical value for the separation of isopropanol-water mixture.

Sensibilité à l'aluminium (III) d'une membrane de fibroïne de soie et chitosan complexés et conséquences sur la valeur chimique pour la séparation d'un mélange isopropanol-eau.

CHEN X., LI W., ZHONG W., YU T.

1997 J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem., Vol. A34(12), 2451-2460. (E)

Characterization of silk produced in Japan during the 12th century.

Caractérisation de la soie produite au Japon durant le 12e siècle.

CHUJO R.

1996 J. Macromolecular Science, Vol A33, 1805. (E)

Structure of *Bombyx mori* fibroin based on solid-state NMR orientational constraints and fiber diffraction unit cell parameters.

Structure de la fibroïne de *Bombyx mori* basée sur les contraintes d'orientation en NMR à l'état solide et paramètres cellulaires de diffraction de la fibre.

DEMURA M., MINAMI M., ASAKURA T., CROSS T.A.

1998 *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120(6), 1300-1308. (E)

Structure of uniaxially aligned ¹³C labeled silk fibroin fibers with solid state ¹³C-NMR.

Structure des fibres de fibroïne marquées au ¹³C alignées sur un axe par ¹³C-NMR à l'état solide.

DEMURA M., YAMAZAKI Y., ASAKURA T.

1998 *J. Mol. Struct.*, Vol. 441(2/3), 155-163. (E)

Elongate cavities and skin-core structure in *Nephila* spider silk observed by electron microscopy.

Cavités allongées et structure de peau de la soie chez l'araignée *Nephila* observées par microscope électronique.

FRIESCHE S., MAUNSBACH A.B., VOLLRATH F.

1998 *J. Microsc. (Oxford)*, Vol. 189(1), 64-70. (E)

Effect of the chemical modification of the arginyl residue in *Bombyx mori* silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells.

Effets des modifications chimiques des résidus arginyl dans la fibroïne de soie de *Bombyx mori* sur la fixation et la croissance des fibroblastes.

GOTOH Y., TSUKADA M., MINOURA N.

1998 *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 39(3), 351-357. (E)

Efficacy of proteases on degumming of dupion silk.

Efficacité des protéases pour le décreusage des douppions de soie.

GULRAJANI M.L., SEN S., SORIA A., SURI M.

1998 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 23(1), 52-58. (E)

Physical properties of fibroin-blended polyurethane films.

Propriétés physiques des films de fibroïne mélangée au polyuréthane.

IIZUKA E., SAWADA K., MOTOJIMA K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(3), 217-221. (J,e)

Study on the silk fibroin powder and morphology.

Etude sur la poudre de fibroïne de soie et sa morphologie.

ITO T., TOSE M.

1996 *Shiken Kenkyu Hokoku, Fukushima-ken Haiteku Puraza*, Vol. 1996, 201-205. (E)

Determination of the critical conditions for fiber formation by the fibroin of natural silk by polarization-optical methods.

Détermination des conditions critiques pour la formation de fibres de fibroïne de soie naturelle par les méthodes de polarisation optique.

KHOLMUMINOV A.A., KHOLMATOVA Y.N., VORONINA T.V.

1997 *Chem. Nat. Compd.*, Vol. 33(4), 481-484. (E)

Kinetic characteristics of swelling and solubility of natural silk fibroin in salt solutions.

Caractéristiques cinétiques des gonflements et de la solubilité de la fibroïne de soie naturelle dans des solutions salines.

KHOLMUMINOV A.A., KHOMATOVA Y.N., VORONINA T.V., KABULOV B.D.

1997 *Dokl. Akad. Nauk Resp. Uzb.*, Vol. 2, 35-37. (E)

A microfabricated wet-spinning apparatus to spin fibers of silk proteins.

Un appareil microfabriqué de filage à la vapeur pour filer les fibres de protéines de soie.

LIVAK O., BLYS A., SHAH N., JELINSKI L.W.

1998 *Macromolecules*, Vol. 31, 2947-2951. (E)

Science of fibers. 5/ Silk.

Science des fibres. 5/ Soie.

MAEKAWA T.

1998 *Nippikyo Janaru*, Vol. 20(2), 161-170. (E)

Raman spectroscopic studies of silk fibroin from *Bombyx mori*.

Etudes en spectroscopie Raman de la fibroïne de soie de *Bombyx mori*.

MONTI P., FREDDI G., BERTOLUZZA A., KASAI N., TSUKADA M.

1998 *J. Raman Spectrosc.*, Vol. 29(4), 297-304. (E)

Dyeing principle and technique for traditional India silks.

Principe et technique de teinture des soies indiennes traditionnelles.

NAGANO G.

1998 *Sen'i Seihin Shohi Kagaku*, Vol. 39(3), 159-167. (E)

Immobilization of horse radish peroxidase with a regenerated silk fibroin membrane and its application to a tetrathiafulvalene-mediating H₂O₂ sensor.

Immobilisation de la peroxydase du raifort sur une membrane de fibroïne de soie régénérée et ses applications comme capteur de H₂O₂.

QIAN J. *et al.*

1997 *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 12, 1213-1218. (E)

Adiabatic compressibility studies of mulberry silk in different solvents.

Etudes de la compressibilité adiabatique de la soie dans différents solvants.

RAJAGOPALAN S., SHARMA S.J.

1998 *Acoust. Lett.*, Vol. 20(9), 191-194. (E)

Brocades of Banaras - A luminous chapter in indian fabrics.

Brocarts de Banaras - Un chapitre lumineux des tissus indiens.

SINHA R.K.

Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 37(5), 5-14. (E)

Waxes studies on silk fibers treated with acid (blue) and metal complex (brown) dyes.

Etudes des cires sur les fibres de soie traitées avec des colorants acides (bleues) et des colorants de complexes de métaux (marron).

SOMASHEKARAPPA H. *et al.*

1997 *Polymer*, Vol. 39(1), 209-213. (E)

Substructure from the ordered region of *Bombyx mori* silk fiber.

Sous-structure de la région ordonnée de la fibre de soie de *Bombyx mori*.

SONTHISOMBAT A., SPEAKMAN P.T.

1997 *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 25(4), 637. (E)

Recent trends and developments in silk reeling.

Nouvelles tendances et développements dans le dévidage de la soie.

SONWALKAR T.N.

Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(12), 26-29. (E)

Examination of silk fibers from a deep ocean site: SEM, EDS and DSC.

Examen des fibres de soie provenant d'un site océanique profond : SEM, EDS et DSC.

SRINIVASAN R., JAKES K.A.

1997 *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 462. (E)

FT-IR study of conformation transition of silk fibroin induced by intermolecular hydrogen bonds.

Etude FT-IR de la transition conformationnelle de la fibroïne de soie induite par des liaisons hydrogène intermoléculaire.

SUN Y., LIU Y., MA M., SHAO Z., CHEN X., YU T.

1998 *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, Vol 19(1), 135-138. (E)

Edge extraction analysis of the wave-forms corresponding to neighboring cleanness and neatness statuses on the surface forms of raw silk threads with fuzzy rules.

Analyse d'extraction des formes ondulatoires correspondant à la propreté et à la netteté des surfaces du fil de soie grège par la méthode des ensembles flous.

TAJIMA F., ZHANG J., ISHIGURO Y.

Faculty of Education and Human Sciences, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(3), 191-195. (J,e)

Phase separation structure in poly(vinyl alcohol)/silk fibroin blend films.

Structure de la phase de séparation dans un film du mélange polyvinyl-alcool et fibroïne de soie.

TANAKA K., TANIGAMI T., YAMAMURA K.

1998 *Polym. Int.*, Vol. 45(2), 175-184. (E)

Comparative structural characterization of naturally and synthetically spun fibers of *Bombyx mori* fibroin.

Caractérisation structurelle comparative des fibres de fibroïne de *Bombyx mori* filées naturellement et artificiellement.

TRABBIC K.A., YAGER P.

1998 *Macromolecules*, vol. 31(2), 462-471. (E)

The crystal structure of *Bombyx mori* silk fibroin at the air-water interface.

La structure cristalline de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* à l'interface air - eau.

VALLUZZI R., GIDO S.P.

1997 *Biopolymers*, Vol. 42, 705-717. (E)

Structures and physical properties of poly (vinyl alcohol)/sericin blend hydrogel membranes.

Structures et propriétés physiques des membranes de mélange poly vinyl/séricine.

WANG S., GOTO Y., OHIKOSHI Y., NAGURA M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386-8567, Japan.

1998 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 67(4), 295-302. (J,e)

Glucose oxidase immobilized by silk fibroin and its application in FIA system.

La glucose-oxydase immobilisée sur la fibroïne de soie et ses applications dans le système FIA.

XU Y. *et al.*

1997 Yaowu Shengwu Jishu, Vol. 4(3), 129-132. (E)

The absorbing rate of moisture for silk fabric comparing to other fabrics made from various fibers.

Le taux d'absorption d'humidité des tissus de soie comparée à d'autres tissus faits à partir de fibres variées.

YAMADA A.

Yokohama Center for Quality Control and Consumer Service, 5-57, Kita-Naka dori, Naka-ku, Yokohama, Japan.

1998 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 67(4), 333-340. (J,e)

The absorbing rate of moisture for silk fabrics in various atmospheric conditions.

Le taux d'absorption d'humidité des tissus de soie dans différentes conditions atmosphériques.

YAMADA A.

Yokohama Center for Quality Control and Consumer Service, Kita-Naka dori 5-57, Naka-ku, Yokohama, Japan.

1998 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 67(4), 341-346. (J,e)

Permeation of acid dyes through fibroin membranes.

Perméation de colorants acides à travers les membranes de fibroïne.

YOSHIDA D., JUN W., SUGIHARA H., HAMADA K., ISHIWATARI T., MISUISHI M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Japan.

1998 J. Seric. Sci. Jpn, Vol.67(3), 183-189.(J,e)

