

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

- Electrophoretic studies of water-soluble proteins of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) testes during ontogenesis** 505
 Etudes électrophorétiques des protéines solubles des testicules de vers à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.) pendant l'ontogenèse 511
 T.A. STOYKOVA, P.T. POPOV & D. GREKOV

- Electrophoretic analysis of nonspecific esterases in silkworm (*Bombyx mori* L.) male genital organs during ontogenesis** 515
 Analyse électrophorétique des estérases non spécifiques des organes génitaux mâles pendant l'ontogenèse chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.) 525
 T.A. STOYKOVA, P.T. POPOV & D. GREKOV

- Cellular features of the muga silkworm (*Antheraea assama* ww., Lepidoptera : Saturniidae) midgut and its possible impact on indoor rearing** 529
 Caractéristiques cellulaires de l'intestin moyen du ver à soie muga (*Antheraea assama* ww., Lepidoptera: Saturniidae) et leurs répercussions probables pour l'élevage en intérieur . . . 537
 S. DEY, N.K. HOOROO, N. BISWAS, A. RAGHUVARMAN & S. CHOUDHURY

- Isolated microspore culture in mulberry (*Morus* spp.)** 541
 Culture de microspores de mûrier (*Morus* spp.) 551
 S.P. CHAKRABORTI, K. VIJAYAN, B.N. ROY & B. SARATCHANDRA

Rapports techniques / Technical reports

- Effect of cortisone on the economic parameters of the silkworm, *B. mori* L.** 555
 Effet de la cortisone sur les paramètres économiques chez le ver à soie, *B. mori* L. 563
 K.S. GOUDAR & B.B. KALI WAL

- Comparative performance of robust and productive bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L. under high temperature conditions** 567
 Etude comparative des performances d'hybrides robustes et productifs de *Bombyx mori* L. sous des conditions de températures élevées 573
 N.SURESH KUMAR, C.M. KISHOR KUMAR, H.K. BASAVARAJA,
 N. MAL REDDY, N. RAMESH BABU & R.K DATTA

- Climatic variability in nine locations of North-east India and their effect on cocoon productivity of muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood)** 577
 Effet de la variabilité climatique sur la productivité du ver à soie muga (*Antheraea assama* Westwood) sur neuf sites du nord-est de l'Inde 593
 M. CHAUDHURI, S.S. SINGH, B. DAS, N.J. DHAR, B. BASUMATARY, D. GOSWAMI,
 K. DAS, A. BARAH, M. SAHU, L.N. KAKOTY, S.N. CHATTERJEE & T. MANDAL

- Nutritional disorders of mulberry (*Morus* spp.) III. Leaf nutrient guide for secondary nutrients** 599
 Désordres nutritionnels chez le mûrier (*Morus* spp.) III. Un guide des aliments des feuilles pour les substances nutritives secondaires 611
 B.K. SINGHAL, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R.K. DATTA

Variation in the population of nitrogen fixers and other microflora in the phylloplane and rhizosphere of mulberry (<i>Morus alba</i>) as influenced by shoot age and season	617
Variation dans les populations de fixateurs d'azote et autres microflore de la feuille et de la rhizosphère du mûrier (<i>Morus alba</i>) en fonction de l'âge des pousses et de la saison	625
P. SUDHAKAR, G.N. CHATTOPADHYAY, S.K. GANGWAR, J.K. GHOSH & B. SARATCHANDRA	

Use of anti-transpirants to preserve the mulberry leaves for young age silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., rearing and its impact on cocoon production	629
Utilisation d'anti-transpirants pour la conservation des feuilles de mûrier destinées à l'élevage de jeunes vers à soie, <i>Bombyx mori</i> L., et son impact sur la production de cocons	635
G.P. SINGH, M.T. HIMANTHRAJ, V.B. MATHUR, C.K. KAMBLE & R.K. DATTA	

Nitrogen fertiliser recommendation of mulberry (<i>Morus alba</i> L.) based on Mitscherlich-Bray concept	639
Recommandation concernant l'engrais azoté pour le mûrier (<i>Morus alba</i> L.) basée sur le concept de Mitscherlich-Bray	645
P.C. BOSE & S.K. MAJUMDER	

Note brève / Brief note

Nitrogen metabolism during the progressive embryonic development of <i>Samia cynthia ricini</i> Boisduval	647
Métabolisme de l'azote au cours du développement embryonnaire de <i>Samia cynthia ricini</i> Boisduval	653
B.L. KRISHNAPPA, D.N.R. REDDY & K.C. NARAYANASWAMY	

Bibliographie / Bibliography	657
---	------------

Mûrier / Mulberry	659
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	661
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	663
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	665
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	669
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	677
Glandes séricigènes / Silk glands	679
Soie / Silk	681

Instructions aux auteurs / Information for contributors

ELECTROPHORETIC STUDIES OF WATER - SOLUBLE PROTEINS OF MULBERRY SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) TESTES DURING ONTOGENESIS

T. A. STOYKOVA¹, P. T. POPOV², D. GREKOV³

1,2 "P. Hilendarski" University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgaria
3 Agricultural University, Plovdiv, Department of Animal Husbandry, Bulgaria.

*Studies were made on the ontogenetic changes in the water-soluble protein spectrum of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) testes by using polyacrylamide gel electrophoresis. Stage specificity was established. No interbred differences were found. Polymorphism in, at least, one of the protein loci was suggested.*

Keywords: *Bombyx mori* L., electrophoresis, proteins, testes.

INTRODUCTION

Organ and stage specific expression of proteins in mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) was established by a number of authors (Banno *et al.*, 1993-1994; Kawaguchi *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996). The studies concerning the change of protein spectrum of testes during ontogenesis are, however, limited (Kovalevskaya and Filipovich, 1970; Seong *et al.*, 1985) and only biochemical. That was the reason for our undertaking the present study.

MATERIALS AND METHODS

Through polyacrylamide gel electrophoresis, a total of 140 individuals of different families of silkworm races P14, P15, M1, T108 and B517 were investigated. A study was made on the spectrum of water-soluble proteins in testes of males at different stages of their individual development: larvae (2nd - 5th instar); spinning (s - period); pupae (day 1-2, 5-6, 8-10) and imago. For the 2nd - 5th instar larvae, both individual and mixed samples were used. At the subsequent stages of development, only individual samples were analysed.

The electrophoretic separation was made using 6 % and 7.5 % vertical polyacrylamide gel by a method described in our previous studies (Stoykova *et al.*, 1998). The water soluble proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R250 in 14 % trichloroacetic acid for 48 hours.

RESULTS

The electrophoretic analysis of testes in 7.5 % PAG showed a total of 26 protein fractions (testes protein - TP) from 2nd larval instar to imago, designated: TP A, TP B, TP C, TP D, TP E, TP F, TP G, TP H, TP I, TP J, TP K, TP L, TP M, TP N1, TP O, TP P, TP Q, TP R, TP S, TP T1, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y (Fig. 1, 2). In 6 % PAG, some of the fractions were missing (Fig. 3). Therefore, we shall discuss the results in 7.5 % PAG.

In extracts of 2nd larval instar testes, both in mixed and individual samples, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y showed low intensity (Fig. 1).

In mixed samples of extracts of 3rd larval instar testes, TP A, TP C, TP F, TP I, TP L, TP M, TP N1, TP Q, TP R, TP U, TP V, TP W, TP X and TP Y were expressed. The clearest in that period of the individual development were: TP L, TP M, TP U, TP W and TP Y. The intensity of all the rest protein bands was low. In individual extracts, we visualized TP U - distinct, and TP V, TP W, TP X, TP Y - with low intensity. We consider the lack of the other protein bands a result of low concentration and not of gene expression (Fig. 1).

In mixed samples of spectra of 4th instar larval testes, the occurrence of fractions TP E, TP G, TP H, TP O, TP P, TP S, TP T2 was observed, the last four of them being slightly expressed. The individual spectra of male glands in that period of larval development showed TP E, TP F, TP L, TP M, TP P, TP Q, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX and TP Y. The lack of the rest was probably due also to a low concentration (Fig. 1).

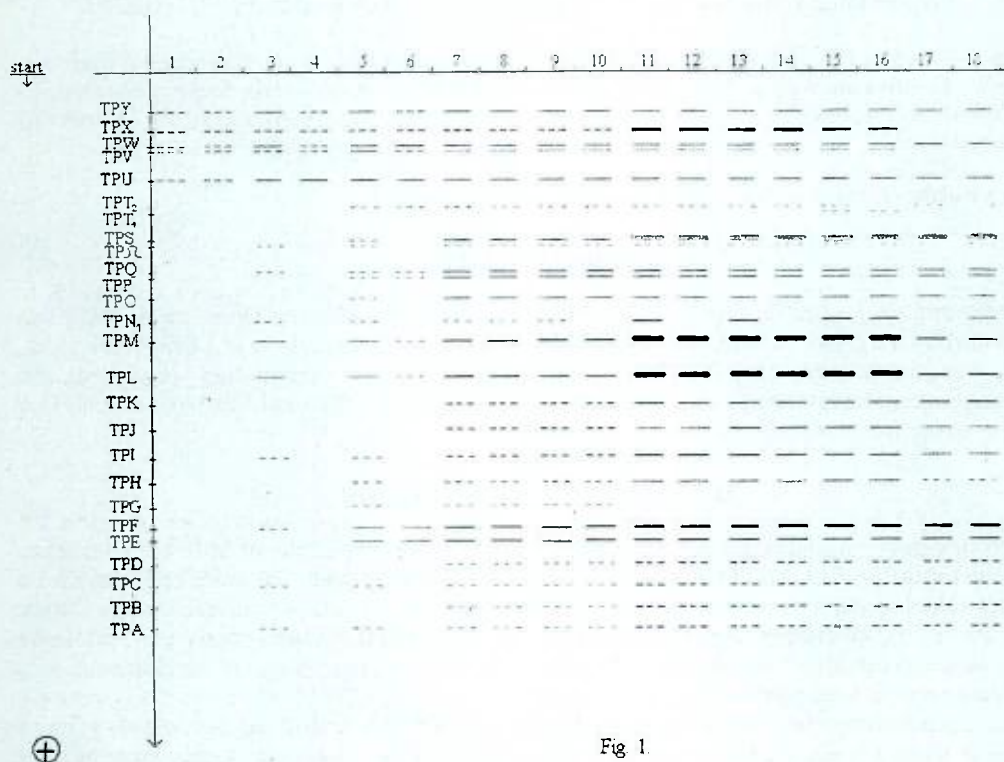


Fig 1

Fig. 1. Scheme of electrophoretic spectra of water soluble proteins of silkworm testes:

1, 2 - 2nd instar larvae; 3, 4 - 3rd instar larvae; 5, 6 - 4th instar larvae; 7, 8 - 5th instar larvae; 9, 10 - spinning larvae; 11, 12 - pupae 1-2 day; 13, 14 - pupae 5-6 day; 15, 16 - pupae 8-10 day; 17, 18 - imago; 1, 3, 5, and 7 - mixed samples; 2, 4, 6, 8 + 18 - individual samples.

Fig. 1. Schéma d'un spectre électrophorétique de protéines solubles de testicules de vers à soie :

1, 2 - 2nd stade larvaire ; 3, 4 - 3ème stade larvaire ; 5, 6 - 4ème stade larvaire ; 7, 8 - 5ème stade larvaire ; 9, 10 - larves fileuses ; 11, 12 - pupes jours 1 et 2 ; 13, 14 - pupes de 5 - 6 jours ; 15, 16 - pupes de 8-10 jours ; 17, 18 - imago ; 1, 3, 5 et 7 - échantillons mélangés ; 2, 4, 6, 8 + 18 - échantillons individuels.

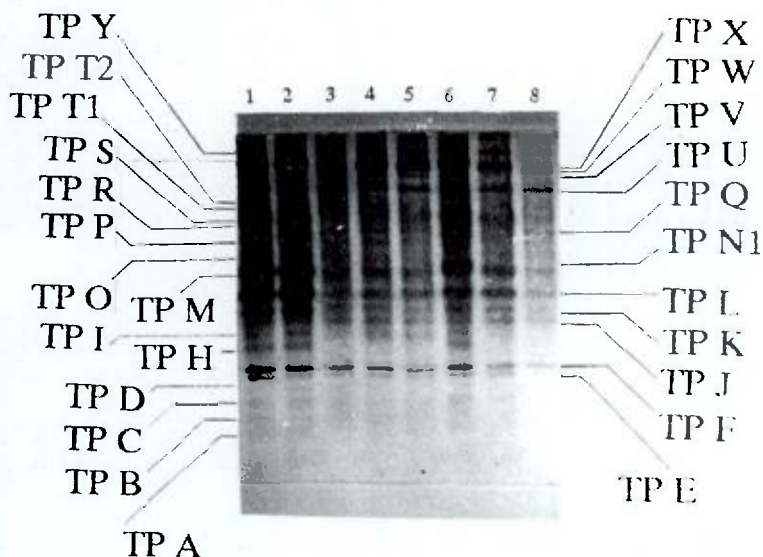


Fig. 2. Electrophoretic spectra of water soluble proteins of silkworm testes in 7.5 % PAG: 1, 2, 4, 5, 6, 7 - pupae; 3, 8 - imago.

Fig. 2. Spectre électrophorétique de protéines solubles de testicules de vers à soie sur gel de polyacrylamide à 7,5 % : 1, 2, 4, 5, 6, 7 - pupes ; 3, 8 - imagos.

In the spectrum of the 5th larval instar testes, in mixed and individual samples, we observed TP A, TP B, TP C, TP D, TP E, TP F, TP G, TP H, TP I, TP J, TP K, TP L, TP M, TP N1, TP O, TP P, TP Q, TP R, TP S, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y, of which TP E, TP F, TP L, TP M, TP U, TP W and TP Y as distinct.

In the period of spinning, no changes were established either in the number of protein fractions or in their intensity (Fig. 1).

In the spectrum of pupal testes, fractions TP F, TP L, TP M and TP N1 showed an increased intensity as against the larval stages studied. All the other bands, established in the larval period, were also more clearly expressed (Fig. 1, 2). Fraction TP G was not detected. In some pupae, only fraction TP T1 was found, in others - TP T2 and in third - both fractions together. These fractions were slight during the whole period of individual development. For the close location of fractions TP W and TP X and the higher intensity of TP X, fraction TP W in 7.5 % PAG was not always distinguishable. The electrophoretic spectrum in 6 % PAG, however, proved that TP W and TP X were closely located different protein bands (Fig. 3).

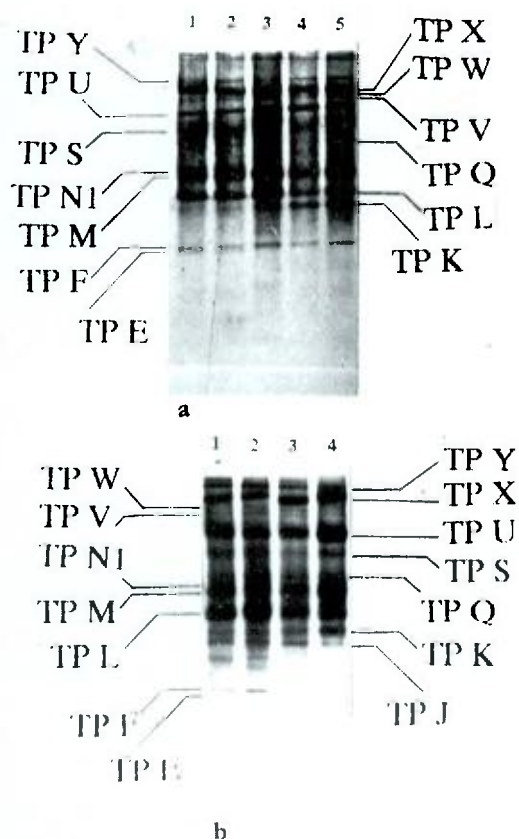


Fig. 3. Electrophoretic spectra of water-soluble proteins of silkworm testes in:

a. 7.5 % PAG: 1 + 5 - pupae.

b. 6 % PAG: 1 + 4 - pupae.

Fig. 3. Spectre électrophorétique de protéines solubles de testicules de vers à soie :

a. Gel de polyacrylamide à 7,5 % : 1 + 5 - pupes.

b. Gel de polyacrylamide à 6 % : 1 + 4 - pupes.

In the spectrum of imago testes, no fractions TP V and TP X were observed at either of the two gel concentrations (Fig. 2). Fraction TP N1 was less intensive, as well as the rest of the protein bands in the TP H - TP T area.

No interbred differences were established during the investigation.

DISCUSSION

The result obtained by us allow our suggestion that the protein bands, expressed in the spectrum of testes, were encoded by 25 loci with stage-specific expression. In the course of larval development, a gradual enrichment of the protein spectrum was observed (from 2nd to 5th larval instar) which was probably in result of the consecutive expression of protein loci in the period of gland growth.

Most intensive and distinct were the protein bands in the pupal period, which was probably due to the increased synthesis and accumulation of products from the gene action in the period of histogenesis and differentiation. The lack of fraction TP N1 from the spectra of some individuals

tested could be due to polymorphism at the respective locus (Tp N) which the presence of null allele, causing in homozygotes Tp NO/NO the lack of a protein product. The separate or combined expression of fractions TP T1 and TP T2 could be a result of diallelic codominant polymorphism at locus Tp T. For the very slight expression, the detection of polymorphism was made difficult and uncertain.

The results obtained by us differed from those of Kovalevskaya and Filipovich (1970), who established a total of 17 protein bands in the testes. The reason for these differences could be methodological. The differences we found in the number of protein bands in 6 % and 7.5 % PAG supported this suggestion. The fractions TP L and TP M, detected by us, corresponded to the MHPa and MHPb proteins from the group of 30 kDa proteins, observed by Seong *et al.* (1985).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the National Research Fund at the Ministry of Education, Science and Technology - Contract MU-OBE-3/97.

REFERENCES

- BANNO Y., TOCHIHARA S., KAWAGUCHI Y., DOIRA H. (1993) Hemolymph proteins during larval development of *Bombyx mori*: "Proteins of young larvae". J. Seric. Sci. Japan, 62(3), 187-194.
- BANNO Y., NODA K., KAWAGUCHI Y., KOGA K., DOIRA H. (1994) Linkage studies on a hemolymph protein named "Protein of young larvae - A4 (PYL-A4)" of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 63(4), 299-302.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KATSUMI K., DOIRA H., FUJII H. (1994) Haemolymph protein profiles in allatectomy-induced trimolters resemble those of a recessive trimolting mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol., 107B(4), 579-584.
- KOVALEVSKAYA N., FILLIPPOVICH Y. (1970) Sexual dimorphism in the content of soluble proteins in silkworm (*B. mori* L.) tissues and organs. Zhurnal Obshchei Biologii, 31(5), 620-629.
- PARK C., KIM H., PARK CH. (1996) Evidences for a stage-specific juvenile hormone binding protein in the hemolymph of the silkworm *B. mori* L.: identification and characterization by photoaffinity labeling and immunological analyses. Arch. Insect. Biochem. and Physiol., 33(2), 83-98.
- SEONG S., KWANG P., NAGATA M., YOSHITAKE N. (1985) Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. Arch. Insect Biochem. and Physiol., 2, 91-104.
- STOYKOVA T., POPOV P., GREKOV D. (1998) Genetic control of nonspecific esterases in mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) silk glands during ontogenesis. Sericologia, 38(2), 237-242.

ETUDES ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES SOLUBLES DES TESTICULES DE VERS A SOIE DU MURIER (*BOMBYX MORI* L.) PENDANT L'ONTOGENESE

T. A. STOYKOVA¹, P. T. POPOV², D. GREKOV³

1,2. "P. Hilendarski" University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgarie.

3. Agricultural University, Plovdiv, Department of Animal Husbandry, Bulgarie.

*Des études ont été réalisées sur les changements ontogénétiques du spectre des protéines solubles des testicules du vers à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.) à l'aide de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une spécificité selon le stade a été établie. Nous n'avons trouvé aucune différence entre différentes lignées. Les résultats suggèrent un polymorphisme dans au moins un des loci.*

INTRODUCTION

L'expression spécifique selon les organes et les étapes de développement des protéines chez les vers à soie (*Bombyx mori* L.) a été établie par de nombreux auteurs (Banno et coll., 1993-1994 ; Kawaguchi et coll., 1994 ; Park et coll., 1996). Les études concernant le changement du spectre des protéines des testicules pendant l'ontogénèse sont, cependant, limitées et seulement biochimiques (Kovalevskaya et Filipovitch, 1970 ; Seong et coll., 1985). C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Un total de 140 individus de familles différentes de races de vers à soie P14, P15, M1, T108 et B517 a été étudié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Une étude a été faite sur le spectre des protéines solubles des testicules aux différentes étapes de leur développement : les larves (2ème - 5ème stade larvaire) ; filage (s - période) ; pupes (1-2, 5-6, 8-10 jours) et adulte. Pour les 2ème - 5ème stades larvaires, nous avons utilisé des échantillons de larves individuelles ou mélangées. Lors des étapes suivantes du développement, seuls des échantillons individuels ont été analysés.

La séparation électrophorétique a été faite en utilisant un gel de polyacrylamide vertical à 6 % et 7,5 % par une méthode décrite dans nos études précédentes (Stoykova et coll., 1998). Les protéines solubles ont été visualisées par coloration avec le Coomassie Brilliant Blue R25 dans 14 % d'acide trichloracétique pendant 48 heures.

RESULTATS

L'analyse électrophorétique des testicules sur gel de polyacrylamide à 7,5 % montre un total de 26 fractions de protéines (protéines de testicules - PT) du 2ème stade larvaire jusqu'à l'imago, désignées par : TP A, TP B, TP C, TP D, TP E, TP F, TP G, TP H, TP I, TP J, TP K, TP L, TP M, TP N1, TP O, TP P, TP Q, TP R, TP S, TP T1, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y (Figs. 1, 2). Dans un gel de polyacrylamide à 6 %, certaines des fractions sont absentes (Fig. 3). Aussi, nous allons donc discuter les résultats obtenus avec 7,5 % de gel de polyacrylamide.

Pour les extraits de testicules du 2ème stade larvaire, les échantillons mélangés comme les individuels, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y donnent une faible intensité (Fig. 1).

Pour les extraits de testicules en échantillons mélangés du 3ème stade larvaire, TP A, TP C, TP F, TP I, TP L, TP M, TP N1, TP Q, TP R, TP U, TP V, TP W, TP X et TP Y sont exprimées. Les bandes les plus claires pour cette période de développement individuel sont : TP L, TP M, TP U, TP W et TP Y. L'intensité de toutes autres bandes de protéines est faible. Pour les extraits individuels, nous avons visualisé TP U distinctement et TP V, TP W, TP X, TP Y avec une faible intensité. Nous considérons le manque d'autres bandes de protéines comme étant le résultat d'une concentration faible et non de l'absence d'expression des gènes (Fig. 1).

Pour les spectres des échantillons mélangés des testicules du 4ème stade larvaire, la présence des fractions TP E, TP G, TP H, TP O, TP P, TP S, TP T2 a été observée, les quatre dernières d'entre elles étant légèrement exprimées. Le spectre individuel des glandes mâles pour cette période de développement larvaire montre TP E, TP F, TP L, TP M, TP P, TP Q, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX et TP Y. L'absence des autres est probablement due à une faible concentration (Fig. 1).

En ce qui concerne les spectres des testicules du 5ème stade larvaire, chez les échantillons individuels et mélangés, nous avons observé TP A, TP B, TP C, TP D, TP E, TP F, TP G, TP H, TP I, TP J, TP K, TP L, TP M, TP N1, TP O, TP P, TP Q, TP R, TP S, TP T2, TP U, TP V, TP W, TPX, TP Y, parmi lesquels TP E, TP F, TP L, TP M, TP U, TP W et TP Y sont apparus distinctement.

Pendant la période de filage, aucun changement n'a été établi aussi bien dans le nombre des fractions de protéines ou dans leur intensité (Fig. 1).

Pour le spectre des testicules de chrysalides, les fractions TP F, TP L, TP M et TP N1 sont plus intenses par rapport aux différents stades larvaires étudiés. Toutes les autres bandes, établies durant la période larvaire sont elles aussi, plus clairement exprimées (Figs. 1, 2). La fraction TP G n'a pas été détectée. Chez certaines pupes, seule la fraction TP T1 a été trouvée, chez d'autres, TP T2 et pour un troisième groupe, les deux fractions sont présentes. Ces fractions sont faibles pendant toute la période du développement individuel. Pour la localisation proche des fractions TP W et TP X et l'intensité plus importante de TP X, la fraction TP W sur 7.5 % de gel de polyacrylamide n'était pas toujours distinguables. Le spectre électrophorétique sur gel de polyacrylamide à 6 %, cependant, a prouvé que TP W et TP X constituaient des bandes de protéines proches (Fig. 3).

Dans le spectre des testicules d'imagos, aucune fraction TP V et TP X n'a été observée sur les deux concentrations de gel (Fig. 2). La fraction TP N1 est moins intense, comme le reste des bandes de protéines dans la zone de TP H - TP T.

Aucune différence entre les lignées n'a été établie pendant cette étude.

DISCUSSION

Le résultat que nous avons obtenu nous permet de suggérer que les bandes de protéines exprimées dans les testicules sont codées par 25 loci avec une expression étape-spécifique.

Pendant le développement larvaire, un enrichissement graduel du spectre des protéines a été noté (à partir du 2ème jusqu'au 5ème stade larvaire) ce qui est probablement le résultat d'une expression consécutive des protéines pendant la période de la croissance des glandes.

Les bandes de protéines les plus intenses et distinctes ont été observées lors de la période pupale, ce qui est probablement dû à l'augmentation de synthèse et l'accumulation de produits de l'action des gènes pendant la période d'histogénèse et de différenciation. L'absence de fraction TP N1 du spectre de certains individus testés peut être due au polymorphisme des locus respectifs (TP N), la présence d'allèle nul, causant chez les homozygotes TP NO/NO un manque de protéine. L'expression séparée ou combinée des fractions TP T1 et TP T2 peut être le résultat d'un polymorphisme diallélique co-dominant pour le locus TP T. Avec la faible expression, la détection de polymorphisme s'est avérée difficile et incertaine.

Les résultats que nous avons obtenu diffèrent de ceux de Kovalevskaya et Filipovich (1970), qui ont établi un nombre total de 17 bandes de protéines pour les testicules. La raison de ces différences peut être d'ordre méthodologique. Les différences que nous avons découvertes dans le nombre des bandes de protéines avec 6 % et 7,5 % de gel de polyacrylamide renforce cette suggestion. Les fractions TP L et TP M que nous avons détectées, correspondent aux protéines MHPa et MHPb du groupe de protéines 30 kDa, noté par Seong et coll. (1985).

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF NONSPECIFIC ESTERASES IN SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) MALE GENITAL ORGANS DURING ONTOGENESIS

T. A. STOYKOVA¹, P. T. POPOV², D. GREKOV³

1. 'P. Hilendarski' University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgaria.
2. 'P. Hilendarski' University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgaria.
3. Agricultural University, Plovdiv, Department of Animal Husbandry, Bulgaria.

*Studies were made on the testicular esterase spectra of larvae (2nd-5th instar), spinning larvae, pupae and imago of seven races and two F1 hybrids of mulberry silkworm *Bombyx mori* L. Analysis was made on the esterase spectrum of the seminal vesicle with spermatid ducts in adults of four races, too. Polyacrylamide, and starch gel electrophoresis, was used. The products of 6 esterase loci in the testes and 5 in the seminal vesicle with spermatid ducts were established. There was a tendency for gene expression dynamics during ontogenesis.*

Keywords: *Bombyx mori* L., electrophoresis, esterases.

INTRODUCTION

The genetic determination of esterase isoenzymes was studied by electrophoretic methods in different insect species (Ogita, 1965; Narang *et al.*, 1971; Gartside, 1980; Ivanova, 1991; Ivanova *et al.*, 1994, 1995).

A number of authors investigated the esterase spectrum in different tissues and organs of the mulberry silkworm *Bombyx mori* (Eguchi *et al.*, 1965, 1967; Kai, 1972; Kai *et al.*, 1973; Filippovich *et al.*, 1974, 1977; Konicheva *et al.*, 1975; Nassirillaev *et al.*, 1977; Egorova *et al.*, 1979; Kai *et al.*, 1982; Krishnamurthy *et al.*, 1984; Xu, 1987). By using different electrophoretic methods, they established various numbers of esterase fractions in the separate organs: from 2 to 12 - in the haemolymph; from 2 to 7 - in the midgut; 4 - in the silk glands and the fat body; from 3 to 5 - in the integument; from 4 to 5 - in the ovaries (Eguchi *et al.*, 1965, 1966, 1975; Kai, 1972; Minina *et al.*, 1974; Konicheva *et al.*, 1977, 1979; Egorova *et al.*, 1977, 1979; Vassilleva, 1979; Eremina, 1985; Yoshitake - by Azizov, 1989).

Eguchi *et al.*, (1965, 1966), Egorova *et al.*, (1985), Yoshitake (by Azizov, 1989), Shabalina (1990) and He (1995) assumed the presence of different numbers of esterase genes and alleles.

Almost no investigations were made on esterase spectra of testes and seminal vesicles with spermatid ducts in silkworms (Eguchi *et al.*, 1965).

In our references, we did not find any data on genetic determination of esterase isoenzymes in the male genital organs or on gene expression changes in the course of silkworm individual development. That was the reason for our undertaking the present study.

MATERIAL AND METHODS

Studies were made on the testes of 110 individuals from seven *B. mori* L. races, marked as: B517, T108, M1, P14, P15, 19, and 20, and the F1 hybrids P14 × P15 and P15 × P14. Individuals of different families were selected. Analysis was made on the esterase spectra of testes at different stages of silkworm development: larvae -2nd-5th instar; spinning larvae; pupae 1-2 day, 5-6 day, 8-9 day; and imago. In the 2nd, 3rd and 4th larval instars, both individual and mixed (4-5 individuals) samples of testes were studied. At the subsequent ontogenetic stages, only individual samples were analyzed. An electrophoretic analysis was made on the seminal vesicle with spermatid ducts of 13 adults of breeds P14, P15, B517 and M1.

The investigated organs were isolated through dissection. They were carefully cleared from the fat body, washed in distilled water and crushed by quartz sand in 0.8 M trisphosphate buffer with pH = 6.7 -for polyacrylamide gel electrophoresis, or in distilled water - for starch gel electrophoresis. The extraction proceeded for 18 hours at 4°C. Before application, the extracts were centrifuged at 5,000 rpm for 45 min for polyacrylamide gel separation, and 4,000 rpm for 30 min -for starch-gel separation.

The extracts were analysed for total protein concentration by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as a standard as follows:

Testes:

2nd instar -0.34 µg/µl for individual samples, 1.8 µg/µl for mixed samples; 3rd instar - 0.53 µg/µl for individual samples, 2.5 µg/µl for mixed samples; 4th instar - 0.6 µg/µl for individual samples, 3.5 µg/µl for mixed samples; 5th instar - 5µg/µl; spinning period - 5.5 µg/µl; pupae 1-2 day - 7 µg/µl; pupae 5-6 day - 8 µg/µl; pupae 8-9 days - 2.7 µg/µl; imago -1.8 µg/µl.

Seminal vesicle with spermatid ducts: 0.35 µg/µl.

10 µl of each sample being applied into the gel. The electrophoretic separation was conducted on:

1. A polyacrylamide gel with pH = 8.9 and concentrations of 6 %, 6.5 %, 7.5 % and 10 % at current intensity of 4.5 mA/cm for 3 hours. A 3.3 % concentrating polyacrylamide gel with pH = 6.7 and 0.05 M tris-0.2 M glycine electrode buffer with pH = 8.3 were used. The nonspecific esterases were visualized in 1 M phosphate buffer with pH = 7.0. 1-and 2- naphthylacetate were used as substrates and Fast blue BB salt as a dye. The stained plates were fixed in a 14 % trichloroacetic acid for 2 hours and stored in 7 % acetic acid.

2. A horizontal starch gel at concentration of 13 % (Smithies, 1955, modified by Dobrovolov, 1973) and current intensity of 2.5 mA/cm for 5 hours. A 1.5 M tris-0.3 M citrate electrode buffer with pH = 8.0 and 0.12 M tris-0.02 M citrate gel buffer with pH = 8.0 were used. The nonspecific esterases were revealed in 1.1 M tris-chloride buffer with pH = 8.0 to which 1- and 2- naphthylacetate were added as substrates and Fast red TR salt as a dye. The starch plates were differentiated in 5 % acetic acid.

RESULTS

1. Polyacrylamide gel

In the testicular spectra of individuals from the tested breeds and F1 hybrids, a total of 6 esterase fractions were registered during their individual development and marked in descending order of their anodic mobility, as follows: EST A, EST B, EST C, EST D, EST E and EST F (Figs. 1, 2, 3).

In individual samples of 2nd instar testes, a fraction with a weak esterase activity (EST C) was detected. In the mixed samples of the same instar, EST A and EST D fractions (very weak), were visualized in addition. The lack of these two esterase bands in the individual spectrum of the male sex glands, was probably due to the very low concentration.

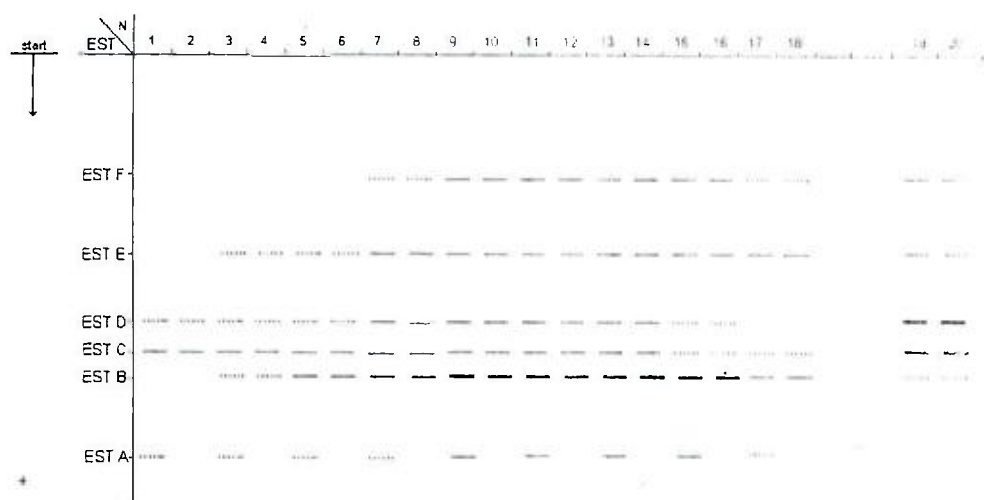


Fig. 1. Esterase spectra of silkworm testes (1-18) and a seminal vesicle with spermatid ducts (19-20) in PAGE and changes in ontogenesis.

Fig. 1. Spectre des estérases de testicules de vers à soie (1-18) et de vésicule séminale avec conduits spermatiques (19-20) en PAGE et changements au cours de l'ontogénèse.

1-2: 2nd larval instar / 2nd stade larvaire

3-4: 3rd larval instar / 3ème stade larvaire

5-6: 4th larval instar / 4ème stade larvaire

7-8: 5th larval instar / 5ème stade larvaire

9-10: Spinning larvae / larves fileuses

11-12: Pupae 1-2 day / pupes 1-2 jours

13-14: Pupae 5-6 day / pupes 5-6 jours

15-16: Pupae 8-10 day / pupes 8-10 jours

17-18: Adults / adultes

19-20: Seminal vesicle with spermatid ducts / Vésicule séminale avec conduits spermatiques

In the mixed samples of testes from 3rd instar larvae, beside the already expressed esterase bands, EST B and EST E were slightly seen, too. In the individual spectrum of testes, EST C and EST D were expressed during that period of ontogenesis. The rest were lacking probably for the above mentioned reason.

In individual and mixed samples of 4th instar larval testes, EST A, EST B, EST C, EST D, and EST E were observed, most intensive of them being EST B and EST C.

In the last - 5th larval instar, EST F began to be visualized as weak, too. At that stage, EST B, EST C and EST E were clear and intensive (Fig. 1). In the spinning and pupal periods, no changes in the number of esterase fractions were established. The EST B intensity sharply increased (Figs. 1, 2). Prior to flight (Pupae 8-10 day), EST C and EST D became strongly weakened (Fig. 3). In the individual imago samples, the EST B intensity decreased (Fig. 3). In the spectrum of the adult male sex glands, no EST D was registered. EST A and EST F became weakened, too. EST C and EST E retained their intensity from the end of the pupation period (Fig. 1).

Most intensive were the esterase fractions in the testicular spectra of pupae 1-2 and pupae 5-6. At the larval (2nd - 5th instar) and imago stages, the esterase activity in gonads was lower. It is seen that at all investigated individual development stages, EST A was absent from the spectra of some individuals from all tested breeds and hybrids (Figs. 1, 2, 3).

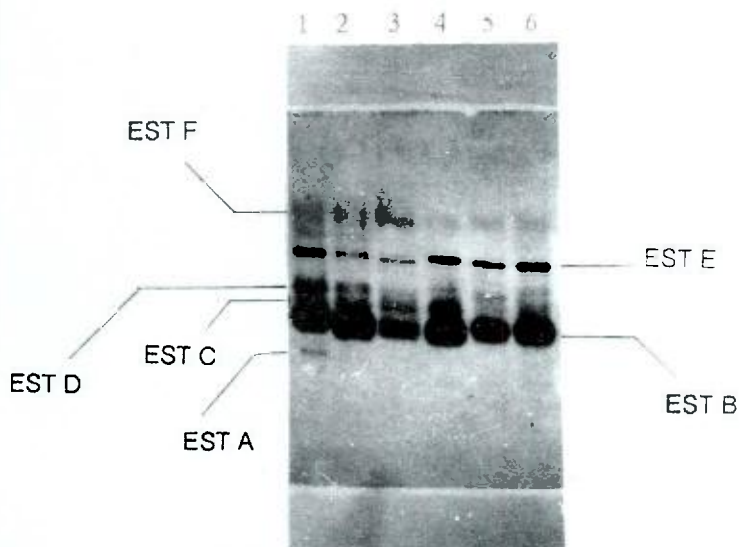


Fig. 2. Esterase spectra of silkworm testes in 6.5 % PAGE.

Fig. 2. Spectre des estérases de testicules de vers à soie en PAGE à 6,5 %.

1-2: T108, Pupae 5-6 day / pupes 5-6 jours
3: M1, Pupae 1-2 day / pupes 1-2 jours
4: M1, Pupae 5-6 day / pupes 5-6 jours
5-6: P14 x P15, Pupae 8-10

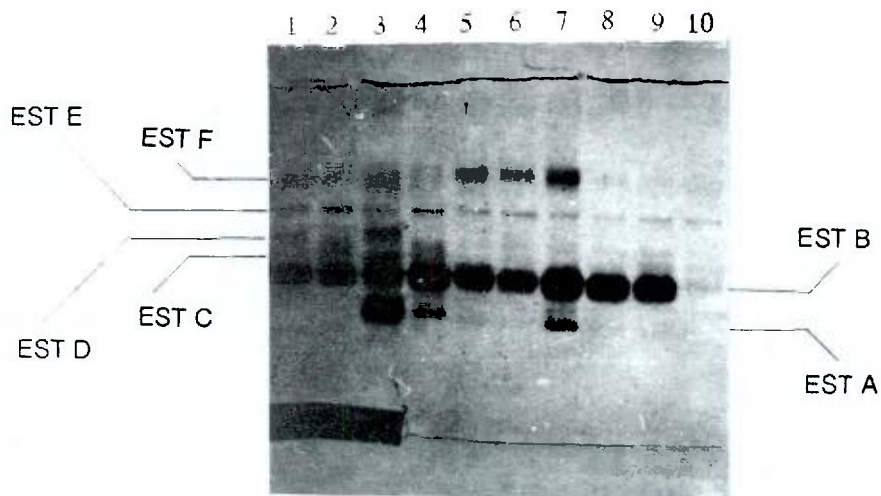


Fig. 3. Esterase spectra of silkworm testes in 6 % PAGE.

Fig. 3. Spectre des estérases de testicules de vers à soie sur PAGE à 6 %.

1-4: M1, Pupae 5-6 / pupes 5-6.
5-7: T108, Pupae 8-10 / pupes 8-10.
8-9: B517, Pupae 8-10 / pupes 8-10.
10: P14, Adult / adulte

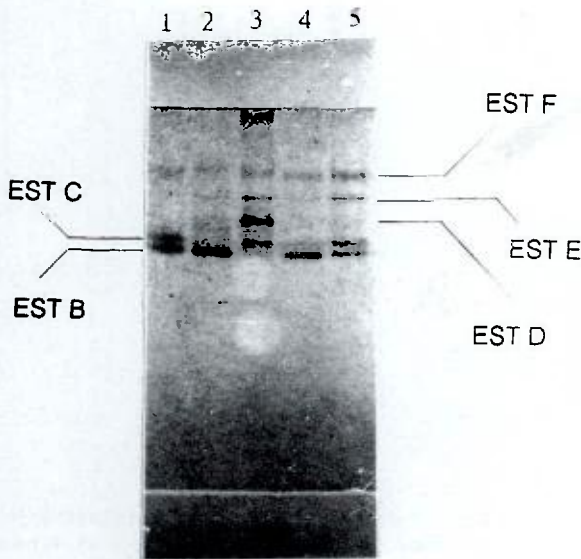


Fig. 4. Esterase spectra of silkworm testes (1-2, 4-5) and a seminal vesicle with spermatid ducts (3) in 10 % PAGE.

Fig. 4. Spectre d'estérase de testicules de vers à soie (1-2, 4-5) et d'une vésicule séminale avec conduits spermatiques sur PAGE à 10 %.

- 1: T108, 5th instar larvae / 5ème stade larvaire
- 2: P15, Pupae 8-10 / pupes 8-10
- 3: M1, Adult / adulte
- 4: T108, Adult / adulte
- 5: P14, Adult / adulte

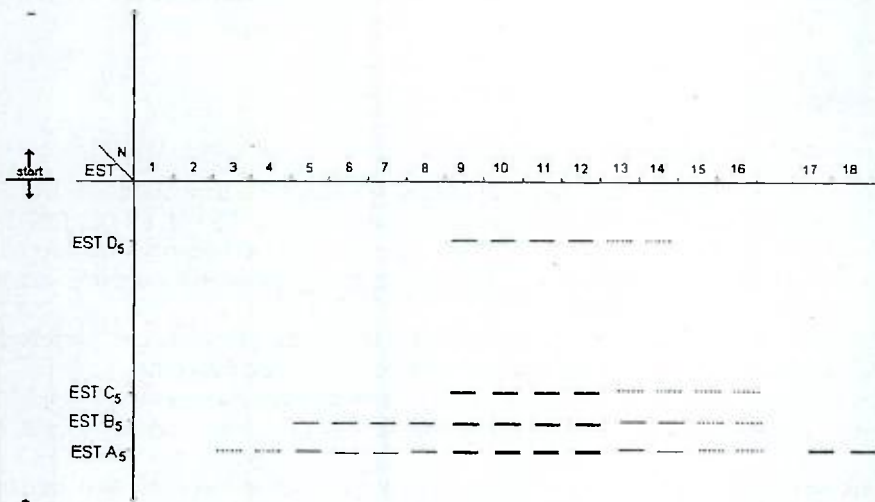


Fig. 5. Esterase spectra of silkworm testes (1-16) and a seminal vesicle with spermatid ducts (17-18) on a 13 % starch gel and changes in ontogenesis.

Fig. 5. Spectre des estérases de testicules de vers à soie (1-16) et d'une vésicule séminale avec conduits spermatiques (17-18) sur du gel d'amidon et changements au cours de l'ontogénèse.

- 1: 2nd larval instar / 2ème stade larvaire. 2: 3rd larval instar / 3ème stade larvaire. 3-4: 4th larval instar / 4ème stade larvaire
- 5-6: 5th larval instar / 5ème stade larvaire. 7-8: spinning larvae / larves fileuses. 9-10: pupae 1-2 / pupes 1-2. 11-12: pupae 5-6 / pupes 5-6. 13-14: pupae 8-10 / pupes 8-10. 15-16: Adults / Adultes. 17-18: Seminal vesicle with spermatid ducts / Vésicule séminale avec conduits spermatiques.

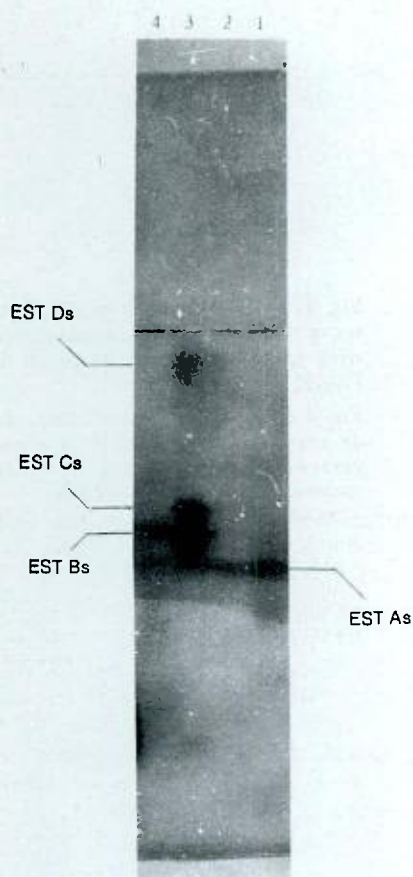


Fig. 6. Esterase spectra of silkworm testes (1, 2) and a seminal vesicle with spermatid ducts (3, 4) on a 13 % starch gel.

Fig. 6. Spectre des estérases de testicules de vers à soie (1, 2) et de vésicules séminales avec conduits spermatiques (3, 4) sur du gel d'amidon à 13 %.

1: T108, 5th instar larvae / 5ème stade larvaire

2: P14, pupae 5-6 / pupes 5-6

3: B517, adult / adulte

4: P14, adult / adulte

In the esterase spectra of all individual samples of seminal vesicles with spermatid ducts, five of the fractions observed in the testicular band spectrum were established, i.e., EST B, EST C, EST D, EST E, and EST F (Fig. 1, 4). A marked gradual decrease in the testis EST C intensity was observed at the stage of Pupae 8-10 and Adult, which coincided with its strong expression in the seminal vesicle with spermatid ducts at that period.

No differences among the studied races were established at the present investigations. Therefore, the F1 hybrids did not differ either from their initial parent breeds or among each other.

No differences were established in the results obtained by electrophoretic separation on 6 %, 6.5 %, 7.5 % and 10 % polyacrylamide gel in terms of number and intensity of esterase fractions (Figs 2, 3, 4).

With the exception of EST A, all our results obtained in a polyacrylamide gel confirmed the data of Eguchi *et al.*, (1965) for 5 esterase fractions in pupal testes, obtained by using agarose gel electrophoresis. These differences could be of methodological character.

2. Starch gel

By starch gel electrophoretic analysis of individual testis extracts of 2nd, 3rd and 4th instar larvae, no esterase fractions were visualized, which is probably due to the low concentration. In the mixed samples, the presence of a very weak esterase fraction in the anodic part of the plates (EST As) was seen as late as in the 4th instar (Fig. 5).

In the individual testicular spectrum at the 5th larval instar and the period of spinning, EST As and EST Bs were slightly visualized.

In the electrophoretic spectrum of the pupal male sex glands, these esterase bands were intensive and clear. Beside them, two more fractions with anodic mobility, marked as EST Cs - intensive, and EST Ds - weak, were observed during that period (Figs 5,6).

In the Adult spectrum EST As, EST Bs and EST Cs were slightly visualized.

In extracts of seminal vesicle with spermatic ducts, the most rapidly migrating to the anode band EST As was established (Figs 5, 6).

In the course of the starch gel electrophoretic analysis conducted by us, no esterase fractions with catode mobility were detected in the spectra of the tested tissues.

In the cited literature, we did not find any data about esterase spectra of the organs studied by us on starch gel, which made it impossible for us to make any comparisons.

All these results show a stage specificity in the esterase spectra of mulberry silkworm (*B. mori* L.) testes.

DISCUSSION

Our results from the studied organs allow an assumption that the nonspecific esterases of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) testes are coded by six loci: Est A, Est B, Est C, Est D, Est E and Est F. Products of four of them were established by starch-gel electrophoresis, too.

Eguchi *et al.* (1965) assumed the existence of direct or indirect hormonal control on esterase activity. According to Minina *et al.* (1974) there is a correlation between the number and activity of 'enzyme forms' during ontogenesis, and the physiological and biochemical processes developing in the mulberry silkworm organism. The stage specificity in the esterase spectra of testes in our study confirmed these opinions. That is the reason for our assumption that the stage specificity of gene expression is connected with the processes of formation, growth and functional activity of male sex glands. In the spectrum of the seminal vesicle with spermatic ducts we found the products of 5 esterase loci: Est B, Est C, Est D, Est E and Est F, which is probably result of the functional and morphogenetic link among the male genital organs.

CONCLUSIONS

1. By electrophoretic analysis it was established the activity of 6 esterase loci in the mulberry silkworm (*B. mori* L.) testes.
2. Products of 5 of them were established in the seminal vesicle with spermatic ducts in adults.
3. A stage-specific gene expression of the esterase loci was observed.

REFERENCES

- AZIZOV T. (1989) Upon the phylogenesis and differentiation in silkworm races. *Shelk*, 2, 10-12 (Russian).
- DOBROVOLOV I. (1973) Microelectrophoresis in starch gel. *Proceedings of NIORS, Varna*, 12, 157-162.
- EGOROVA T., NALETOVA E., LEZHENKO S.E., KENSHAEV B., NASSIRILLAIEV U. (1979) Esterases as markers in the determination of parent couples for crossing in silkworm breeding. *Shelk*, 6, 8-9 (Russian).
- EGOROVA T., NALETOVA E., NASSIRILLAIEV U. (1985) Polymorphic system of silkworm haemolymph esterase as a criterion in the development of a program for crossing parent couples. *Insect Biochemistry, M.*, 54-62 (Russian).

- EGOROVA T., VASSILLEVA L., SANKINA T., NASSIRILLAIEV U., FILIPPOVICH J. (1977) Studies on the enzymatic activities of soluble proteins in tissues of different silkworm (*B. mori* L.) races. *Journal of General Biology*, 3, 447-463 (Russian).
- EGUCHI M., YOSHITAKE N., KAI H. (1965) Type and inheritance of blood esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Jap. J. Genetics*, 40(1), 15-19.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1966) Genetic studies on isozymes of the integument esterase in the silkworm, *B. mori* L. *Japan J. Genetics*, 41(4), 267-273.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1967) Interrelation of nonspecific esterase zymograms among various tissues in the silkworm, *B. mori* L. *Japan J. Seric. Sci.*, 36(3), 193-198.
- EGUCHI M., IWAMOTO A. (1975) Changes in protease, esterase, and phosphatases in the alimentary canal of the silkworm during metamorphosis - *Insect Biochemistry*, 5, 495-507.
- EREMINA O. (1985) Studies on the effect of permethrin upon the esterase spectrum of some insects - *Insect Biochemistry*, 83-86 (Russian).
- FILIPPOVICH J., EGOROVA T., ZJABREVA E., KLUNOVA S., ZHUKOVA N., KONICHEVA A., KUTUZOVA N., OSTAPENKO V., SANKINA T. (1974) Molecular principles of silkworm heterosis - 3rd World Congress of Biochemistry. Scientific announcement. Vol. 1, Riga, 72.
- FILIPPOVICH J., EGOROVA T., NASSIRILLAIEV U., GRJABINA I. (1977) On the perspectives of using biochemical markers in silkworm genetics and breeding. *Proceedings of the Middle-Asiatic Research Institute in Sericulture*, 11, 130-145 (Russian).
- GARTSIDE D. (1980) Similar allozyme polymorphism in honey bees (*Apis mellifera*) from different continents - *Experientia*, 36(6), 649-650.
- HE J. (1995) Studies on the inheritance of deletion type of the blood esterase isoenzymes in the silkworm, *Bombyx mori* L. - *Sericologia*, 35(1), 17-24.
- IVANOVA E. (1991) Studies on the electrophoretic spectra of the nonspecific esterases during the ontogenic course of *Apis mellifera* - *Scientific Works of the P. Hilendarski University of Plovdiv*, 29/6, 248-251 (Bulgarian).
- IVANOVA E., POPOV P. (1994) Electrophoretic patterns of the esterase isozymes of honey bees *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) 10th Balkan Biochemical Biophysical Days, Varna, J. 10, p. 402 - poster summary.
- IVANOVA E., POPOV P. (1996/1997) Electrophoretic studies of nonspecific esterases during the ontogenetic course of domestic bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera; Apidae*) in Bulgaria - *Genetics and Breeding*, v. 28, 1-2, 13-16.
- KAI H., HASEGAVA K. (1972) Electrophoretic protein patterns and esterase zymograms in ovaries and mature eggs of *B. mori* in relation to diapause - *J. Insect Physiol.*, 18, 133-142.
- KAI H., HASEGAVA K. (1973) An esterase in relation to yolk cell lysis at diapause termination in the silkworm, *B. mori* - *J. Insect Physiol.*, 19(4), 799-801.
- KAI H., KAWAIT T., KIYOMOTO T. (1982) Effect of suboesophageal ganglion removal on activities of six esterase A members in different tissues of *Bombyx* pupae, *J. Fac. Agric., Tottori Univ.*, 176, 28-37.
- KONICHEVA A., EGOROVA T., FILIPPOVICH J. (1975) Studies on some haemolymph enzymes in different silkworm races - *Proceedings of the Moscow State Pedagogical Institute*, 18, 157-171 (Russian).
- KONICHEVA A., EGOROVA T., FILIPPOVICH J. (1977) Studies on the esterase activity in the haemolymph of different silkworm races - *Proceedings of the Moscow State Pedagogical Institute*, 19, 36-39 (Russian).
- KONICHEVA A., EGOROVA T., FILIPPOVICH J. (1979) A complex assessment of silkworm races according to the soluble proteins and some enzymes - *Insect Biochemistry*, 21, 68-73 (Russian).
- KRISHNAMURTHY N., RAMESH S., RAJASECARASETTY M. (1984) Developmental profiles in the isozymes of **a** and **b** esterases in the embryogenesis of silkworm *Bombyx mori* - *Curr. Sci. (India)*, 53(5), 281-284.
- LOWRY O., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- MININA N., FILIPPOVICH J. (1974) Enzymatic forms in the tissues of initial silkworm races and the hybrids obtained therefrom. Proceedings of the Moscow State Pedagogical Institute, 17, 5-31 (Russian).
- NARANG S., KITZMILLER J. (1971) Esterase polymorphism in a natural population of *Anopheles punctipennis*. I. Genetic analysis of the esterase A-B system. J. Hered., 62(5), 259-265.
- NASSIRILLAIEV U., EGOROVA T., SANKINA T., MIRZAEVA G. (1977) Studies on the enzymatic activity of the soluble proteins of wintering eggs and the haemolymph of caterpillars. Shelk, 2/73, 8-10 (Russian).
- OGITA Z., KASAI T. (1965) Genetico-biochemical analysis of specific esterases in *Musca domestica*. Japan J. Genetics, 40(3), 173-179.
- SHABALINA A. (1990) Esterase genetic polymorphism in haemolymph of larvae *Bombyx mori* L. - Comptes-rendus de l'Académie Bulgare des Sciences, 43(9), 105-108.
- SMITHIES O. (1955) Zone electrophoresis in starch gel. Proceedings of NIORS, Varna, XII: 157-162.
- VASSILLEVA L., EGOROVA T., NALETOVA E. (1979) Substrate and inhibitor analysis of silkworm haemolymph esterases - Insect Biochemistry, 21, 43-52 (Russian).
- XU J., SONG H. (1987) A study on esterase isozyme of silkworm (*Bombyx mori*) embryo. Sericologia, 27(2), 309-314.

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES ESTERASES NON SPECIFIQUES DES ORGANES GENITAUX MALES PENDANT L'ONTOGENESE CHEZ LE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.)

T. A. STOYKOVA¹, P. T. POPOV², D. GREKOV³

1. 'P. Hilendarski' University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgarie.
2. 'P. Hilendarski' University of Plovdiv, Department of Genetics, Bulgarie.
3. Agricultural University, Plovdiv, Department of Animal Husbandry, Bulgarie.

*Des études ont été réalisées sur les spectres d'estérase des testicules de larves du 2ème au 5ème stade larvaire, de larves fileuses, de chrysalides et d'imagos de sept races différentes et deux hybrides F1 de vers à soie *Bombyx mori* L. Une analyse a été réalisée sur le spectre des estérases de la vésicule séminale avec les conduits spermatisques chez des adultes de quatre races différentes. Nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ainsi que sur gel d'amidon. Nous avons repéré les produits de 6 loci d'estérases chez les testicules et de 5 chez la vésicule séminale avec les conduits spermatisques. Il existe une dynamique de l'expression des gènes au cours de l'ontogenèse.*

INTRODUCTION

La détermination génétique des isoenzymes de l'estérase a été étudiée par des méthodes électrophorétiques chez différentes espèces d'insectes (Ogita, 1965; Narang et coll., 1971; Gartside, 1980; Ivanova, 1991; Ivanova et coll., 1994, 1995).

De nombreux auteurs ont réalisé des recherches sur le spectre des estérases de différents tissus et organes du ver à soie *Bombyx mori* (Eguchi et coll., 1965, 1967; Kai, 1972; Kai et coll., 1973; Filippovich et coll., 1974, 1977; Konicheva et coll., 1975; Nassirillaev et coll., 1977; Egorova et coll., 1979; Kai et coll., 1982; Krishnamurthy et coll., 1984; Xu, 1987). En utilisant des méthodes électrophorétiques différentes, ils ont établis un nombre différent de fractions d'estérases selon les organes : de 2 à 12 dans l'hémolymphe ; de 2 à 7 dans l'intestin moyen ; 4 dans les glandes séricigènes et le corps gras ; de 3 à 5 dans le tégument ; de 4 à 5 dans les ovaires (Eguchi et coll., 1965, 1966, 1975 ; Kai, 1972; Minina et coll., 1974 ; Konicheva et coll., 1977, 1979 ; Egorova et coll., 1977, 1979 ; Vassilleva, 1979 ; Eremina, 1985 ; Yoshitake - par Azizov, 1989).

Eguchi et coll., (1965, 1966), Egorova et coll. (1985), Yoshitake (par Azizov, 1989), Shabalina (1990) et He (1995) ont supposé la présence d'un nombre différent de gènes et d'allèles d'estérases.

Pratiquement aucune recherche n'a été effectuée sur le spectre d'estérase chez les testicules et les vésicules séminales avec les conduits spermatisques chez le ver à soie (Eguchi et coll., 1965).

Nous n'avons trouvé aucune donnée sur la détermination génétique des isoenzymes de l'estérase chez les organes génitaux mâles ou sur les changements d'expression des gènes lors du développement du ver à soie. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Les études ont été réalisées sur les testicules de 110 individus à partir de sept races de *B. mori* L., nommées : B517, T108, M1, P14, P15, 19, et 20, et des hybrides F1 : P14 × P15 et P15 × P14. Nous

avons sélectionné des individus des différentes familles. Une analyse a été effectuée sur le spectre des estérases des testicules à différentes étapes du développement du ver à soie : larves du 2ème au 5ème stade larvaire ; larves fileuses ; pupes de 1 à 2 jours, 5 à 6 jours, 8 à 9 jours et imagos. Lors des 2ème, 3ème et 4ème stades larvaires, nous avons étudié des échantillons d'individus séparés ainsi que des échantillons mélangés (4-5 individus). Lors des étapes ontogénétiques suivantes, seuls des échantillons individuels ont été analysés. Une analyse électrophorétique a été réalisée sur la vésicule séminale avec les conduits spermatiques de 13 adultes des élevages P14, P15, B517 et M1.

Les organes étudiés ont été isolés par dissection. Ils ont été délicatement nettoyés des corps gras et lavés dans de l'eau distillée puis broyés avec du sable de cristal dans un tampon trisphosphate à 0,8 M à un pH = 6,7 pour une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou de l'eau distillée pour une électrophorèse sur gel d'amidon. L'extraction s'est poursuivie pendant 18 heures à 4°C. Avant l'application, les extraits ont été centrifugés à 5 000 tpm pendant 45 minutes en vue de la séparation sur gel de polyacrylamide, et à 4 000 tpm pendant 3 minutes pour la séparation sur gel d'amidon.

Les échantillons ont été analysés pour connaître la concentration en protéines par la méthode de Lowry et coll. (1951) avec de la serumalbumine bovine comme standard, de la façon suivante :

Les testicules :

2ème stade larvaire : 0,34 µg/µl pour les échantillons d'individus ; 1,8 µg/µl pour les échantillons mélangés ; 3ème stade larvaire : 0,53 µg/µl pour les échantillons d'individus ; 2,5 µg/µl pour les échantillons mélangés ; 4ème stade larvaire : 0,6 µg/µl pour les échantillons d'individus ; 3,5 µg/µl pour les échantillons mélangés ; 5ème stade larvaire : 5 µg/µl ; période de filage : 5,5 µg/µl ; pupes de 1-2 jours : 7 µg/µl ; pupes de 5-6 jours : 8 µg/µl ; pupes de 8-9 jours : 2,7 µg/µl ; imago : 1,8 µg/µl.

Vésicule séminale avec conduits spermatiques : 0,35 µg/µl.

10 µl de chaque échantillon ont été déposés sur le gel. La séparation électrophorétique a été menée sur :

1. Un gel de polyacrylamide à pH = 8,9 et des concentrations à 6 %, 6,5 %, 7,5 % et 10 % sous une intensité de courant de 4,5 mA/cm pendant 3 heures. Nous avons utilisé un gel de polyacrylamide concentré à 3,3 % avec un pH = 6,7 et un tampon d'électrodes à 0,05 M de glycine et 0,2 M de tris à pH = 8,3. Les estérases non spécifiques ont été visualisées dans un tampon phosphate 1 M à pH = 7,0. Du naphthylacétate 1 et 2 ont été utilisés comme substrats et le sel Fast blue BB comme colorant. Les plaques colorées ont été fixées dans l'acide trichloracétique à 14 % pendant 2 heures et stockées dans de l'acide acétique à 7 %.

2. Un gel d'amidon horizontal concentré à 13 % (Smithies, 1955 modifié par Dobrovolsky, 1973), et une intensité de courant de 2,5 mA/cm pendant cinq heures. Nous avons utilisé un tampon d'électrodes de citrate à 1,5 M tris-0,3 M à pH = 8,0 et un autre à 0,12 M tris-0,02 M à pH = 8,0. Les estérases non spécifiques ont été révélées dans un tampon tris-HCl 1,1 M à pH = 8,0 auquel du naphthylacétate 1 et 2a ont été ajoutés comme substrats, le sel Fast red TR comme colorant. Les plaques d'amidon ont été révélées dans de l'acide acétique à 5 %.

RESULTATS

A. Gel de polyacrylamide

Sur les spectres des testicules d'individus des lignées testées et des hybrides F1, un total de 6 fractions d'estérases a été enregistré pendant leur développement individuel et noté dans l'ordre décroissant de leur mobilité anodique : EST A, EST B, EST C, EST D, EST E et EST F (Figs. 1, 2, 3).

En ce qui concerne les échantillons individuels des testicules du 2ème stade larvaire, une fraction avec une activité estérase faible (EST C) a été détectée. Pour les échantillons mélangés du même stade

larvaire, on distingue en plus les fractions EST A et EST D (très faibles). L'absence de ces deux bandes estérases chez les spectres individuels des glandes sexuelles mâles est probablement due à leur très faible concentration.

En ce qui concerne les testicules des échantillons mélangés du 3ème stade larvaire, on distingue EST B et EST E très légèrement en plus des bandes déjà décrites. Pour le spectre des testicules, EST C et EST D sont exprimés pendant cette période de l'ontogénèse. Les autres sont absentes.

Pour les échantillons individuels et mélangés des testicules de vers à soie du 4ème stade larvaire, nous observons EST A, EST B, EST C, EST D, et EST E, les plus importantes étant EST B et EST C.

A la fin du 5ème stade larvaire, on distingue EST F faiblement. A ce stade, EST B, EST C et EST E sont nettes et intenses (Fig. 1). Pour les périodes de filage et de nymphose, nous n'observons aucun changement en ce qui concerne le nombre de fractions estérases. L'intensité de EST B augmente fortement (Figs. 1, 2). Avant le papillon (nymphes de 8-10 jours), l'intensité de EST C et EST D est fortement diminuée (Fig. 3). Chez les échantillons d'imagos individuels, l'intensité de EST B a diminué (Fig. 3). Sur les spectres des glandes sexuelles des mâles adultes, EST D n'est pas présente. EST A et EST F deviennent faibles. EST C et EST E gardent l'intensité de la fin de la période de nymphose (Fig. 1).

Les fractions d'estérases sur les spectres de testicules de nymphes de 1-2 et 5-6 jours sont les plus marquées. Au stade larvaire (2ème - 5ème âge) et imago, l'activité estérase dans les gonades est plus faible. Nous avons remarqué que pour toutes les étapes de développement individuel étudiées, EST A est absente des spectres de certains individus des hybrides testés (Figs. 1, 2, 3).

Sur les spectres estérases de tous les échantillons individuels de vésicules séminales avec conduits spermatiques, cinq des fractions observées chez les testicules sont présentes, c'est à dire, EST B, EST C, EST D, EST E, et EST F (Figs. 1, 4). Une diminution graduelle marquée de l'intensité de EST C testiculaire est observée au stade de la puppe de 8-10 jours et chez l'adulte, ce qui coïncide avec sa forte expression dans la vésicule séminale et conduits spermatiques à cette période.

Aucune différence parmi les races étudiées n'a été établie lors de nos recherches. Donc, les hybrides F1 ne diffèrent ni des lignées parentales initiales, ni entre eux.

Aucune différence n'a été établie en ce qui concerne les résultats obtenus par la séparation électrophorétique sur 6 %, 6,5 %, 7,5 % et 10 % sur gel de polyacrylamide en terme de nombre et d'intensité des fractions d'estérases (Figs. 2, 3, 4).

A l'exception de EST A, tous les résultats obtenus sur gel de polyacrylamide confirme les données de Eguchi et coll., (1965) pour cinq fractions d'estérases chez les testicules de nymphes, obtenues en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose. Ces différences peuvent provenir de la méthodologie.

B. Gel d'amidon

Aucune estérase n'est visible après l'analyse des extraits de testicules d'individus des 2ème, 3ème et 4ème stades larvaires par électrophorèse sur gel d'amidon, ce qui est probablement dû à la faible concentration. Pour les échantillons mélangés, la présence d'une très faible fraction d'estérase sur la partie anodique des plaques (EST A) a été observée au quatrième stade larvaire seulement (Fig. 5).

Pour les spectres de testicules individuelles au 5ème stade larvaire et à la période de filage, on distingue faiblement EST A et EST B.

En ce qui concerne le spectre électrophorétique des glandes sexuelles mâles de la nymphe, ces bandes d'estérases sont intenses et claires. Deux fractions supplémentaires avec mobilité anodique, nommées EST Cs - intense, et EST Ds - faible, ont été observées pendant cette période (Figs. 5, 6).

Pour le spectre adulte, EST As, EST Bs et EST Cs sont légèrement visibles.

Pour les extraits de vésicule séminale avec les conduits spermatiques, EST As est la bande qui migre le plus rapidement vers l'anode (Figs 5, 6).

Lors de l'analyse électrophorétique sur gel d'amidon que nous avons menée, aucune fraction d'estérase avec une mobilité cathodique n'a été détectée sur le spectre des tissus testiculaires.

Nous n'avons trouvé aucune donnée concernant le spectre des estérases sur gel d'amidon des organes que nous avons étudié, nous ne pouvons donc pas faire de comparaisons.

Tous ces résultats montrent une spécificité des stades des spectres d'estérases des testicules du ver à soie (*B. mori* L.).

DISCUSSION

Nos résultats concernant les organes étudiés permettent de supposer que les estérases non spécifiques des testicules de ver à soie (*Bombyx mori* L.) sont codées par 6 loci : Est A, Est B, Est C, Est D, Est E et Est F. Les produits de quatre d'entre eux ont été également détectés par électrophorèse sur gel d'amidon.

Eguchi et coll. (1965) supposent l'existence d'un contrôle direct ou indirect sur l'activité estérase. Selon Minina et coll. (1974) il existe une corrélation entre le nombre et l'activité des 'formes d'enzymes' pendant l'ontogénèse et les processus physiologique et biochimique se développant dans l'organisme du ver à soie.

La spécificité des spectres estérases en fonction des stades chez les testicules confirme ces opinions. C'est la raison de notre hypothèse selon laquelle la spécificité d'expression des gènes selon les stades est connectée aux processus de formation, de croissance et d'activité fonctionnelle des glandes sexuelles mâles. Sur le spectre de la vésicule séminale avec les conduits spermatiques nous avons trouvé les produits de 5 loci d'estérases : Est B, Est C, Est D, Est E et Est F, ce qui est probablement le résultat du lien fonctionnel et morphologique entre les organes génitaux mâles.

CONCLUSIONS

1. Par analyse électrophorétique nous avons établi l'activité de 6 loci d'estérases chez les testicules du ver à soie (*B. mori* L.).
2. Les produits de cinq d'entre eux ont été détectés dans la vésicule séminale avec les conduits spermatiques chez les adultes.
3. L'expression des gènes des loci d'estérases est spécifique du stade.

CELLULAR FEATURES OF THE MUGA SILK WORM (*ANTHERAEA ASSAMA* WW., LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) MIDGUT AND ITS POSSIBLE IMPACT ON INDOOR REARING

S. DEY*¹, R. N. K. HOOROO², N. BISWAS³, A. RAGHUVARMAN²
& S. CHOUDHURY²

1. Electron Microscope Laboratory, Regional Sophisticated Instrumentation Centre, North-Eastern Hill University, Shillong - 793 003, India.
2. Department of Zoology, North-Eastern Hill University, Shillong - 793 022, India.
3. Central Silk Board Research Extension Centre, Diphu - 782460, India.

*Based on Transmission Electron Microscopic observations, certain ultra-structural features in the mid-gut cells of muga silkworm, *Antheraea assama* West wood are described. The uniqueness of the cellular features of mid-gut may provide clues for difficulties encountered in feeding, digestion and assimilation of food in the worm during indoor rearing. Many small nerve fibres with large number of neurotubules and neurosecretory droplets were found to innervate the visceral muscles. Some secreted materials comparable to zymogen granules were present within the golgi cisternae. The goblet cells, like that of other lepidopteran larvae were marked by the presence of apical invagination, but tightly inserted mitochondria and microvilli projecting from the cell surface were absent.*

Keywords: *Antheraea assama*, midgut, goblet cells, Zymogen granules, neurosecretion.

INTRODUCTION

The muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) is a multivoltine sericogenic insect, endemic to Assam and adjoining regions in north-East-India. It feeds on leave of *Machilus bombycina* King, *Litsaea polyantha* A. Juss, *Litsaea citrata* Roxy, *Litsaea salicifolia* Roxy and other plants belonging to the family Lauraceae. Larval body weight, body water content, blood volume, total haemocyte counts and head-capsule widths of the silkworm were reported to vary with host plants and seasons of the year (Bordoloi and Hazarika, 1992; Hazarika *et al.*, 1992). Seasonal variation in larval growth and development and variable effects on relative survival of herbivorous insects caused by different host plants are known to be influenced by differential food intake, digestion and assimilation (Waldbauer, 1968; Scriber and Slanski, 1981). The same reasons probably apply to the observed reduction in growth and prolonged larval life in the muga silkworm during indoor rearing as compared to that under outdoor condition. Cellular organisation of the intestinal tract appears to be important in this regard. The foregut is responsible for ingestion and passage of food towards the midgut, where major uptake of the products of digestion takes place. Hind gut is an important site of water and ion re-absorption. Significant variations in the cellular features are reported in insect mid gut, which is directly related to the digestive physiology (Anderson and Harvey, 1966; Bertram and Bird, 1961; Khan and Ford, 1962; Smith, 1968).

The aim of the present study is to examine the fine structure of mid gut cells of muga silkworm so as to understand its uniqueness, if any, in relation to the feeding and digestion. Furthermore, studies

* To whom correspondence should be made.

on fine structure of different body parts of *Antheraea assama* larvae are very few (Dey *et al.*, 1997; Hazarika and Bordoloi, 1998). The present study is the first attempt in this regard as far as the gut ultrastructure of the worm is concerned.

MATERIALS AND METHODS

Mid gut of the mature fifth instar larvae of *Antheraea assama* were used in this work. The samples were cut into small pieces and were fixed for 4 h at 4° C in 3% glutaraldehyde prepared in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2). The fixed specimens were washed with 0.1 M Na-cacodylate buffer at pH 7.2, post fixed with 1% Osmium tetroxide in the same buffer for 8 h in 4° C and block-stained with 1% Uranyl acetate and 0.1% phosphotungstic acid in 70% ethanol in the dark for 6 h at room temperature (Strausfeld, 1976). Specimens were dehydrated in a graded series of acetone to propylene oxide and embedded in Araldite in flat embedding form. Pieces of plastic embedded tissues were re-oriented and ultrathin sections (500-600 Å) were cut on an LKB ultramicrotome, Ultratome V, with glass knives. The sections were collected on copper grid and stained with 5% aqueous uranyl acetate solution for 10 min at 60° C, followed by lead citrate (Reynolds, 1963). The sections were examined with a JEE 100CX Transmission Electron Microscope (Jeol) at an accelerating voltage of 60-80 KV.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Muscular and connective tissue sheath:

As in the other insects, the mid-gut of the muga silkworm lacks a system of blood capillaries and lymphatic vessels such as that associated with vertebrate intestine. A muscular and connective tissue sheath surrounds the midgut cells (Fig 1-4). The basal plasma membrane is profusely infolded, thereby greatly increasing the area of the surface across which ions and molecules may pass into and out of the cell (Smith, 1968). The visceral muscles are innervated by many small nerve fibres, the axons of which contain large number of neurotubules, accompanied by neurosecretory droplets (Fig 1-3). This suggests that hormones controlling the secretion of digestive enzymes in the mid gut may be released from some of these neurosecretory axons, which include motor units of the somatogastric (visceral) nervous system, that terminates on the gut muscles. It is to be noted in this context that some evidence for hormonal control of secretion of digestive enzymes in insect mid-gut already exists in literature (Wigglesworth, 1965). While such a hormone might be released elsewhere, to reach the gut cells via the circulating haemolymph, it seems possible that release of hormones from neurosecretory axons may be an alternative means of controlling digestive enzyme secretion in mid-gut of the muga silkworm.

Release of hormones from neurosecretory cells, and axonal transport of neurosecretory materials are known to be influenced by environmental factors such as light and temperature (Scharrer and Scharrer, 1954; Gabe, 1966; Dey and Raghuvarman, 1986). Seasonal variation of body weight reported in muga silkworm (Bordoloi and Hazarika, 1992) is likely to be influenced by feeding and digestion, since intake, digestion and assimilation of food is reported to affect the larval growth and development in herbivorous insect (Waldbauer, 1968; Scriber and Slansky, 1981 & Dey, 1983). The innervation of visceral muscles by nerve fibres with neurotubules and neurosecretory droplets, suggests the role of neurosecretion in digestive physiology of the worm. This indicates that seasonal variations reported in larval growth in muga silkworm might be due to the variation in neurosecretory activity of the visceral nervous system related to seasonal differences in light and temperature condition. The reduced larval growth, significant reduction in cocoon, shell and adult weight, and increase in larval period in muga silkworm and other species of the genus *Antheraea* during indoor rearing (Chaudhury, 1981; Dey, 1987) also appears to be affected by light and temperature conditions which ultimately influences neurosecretion.

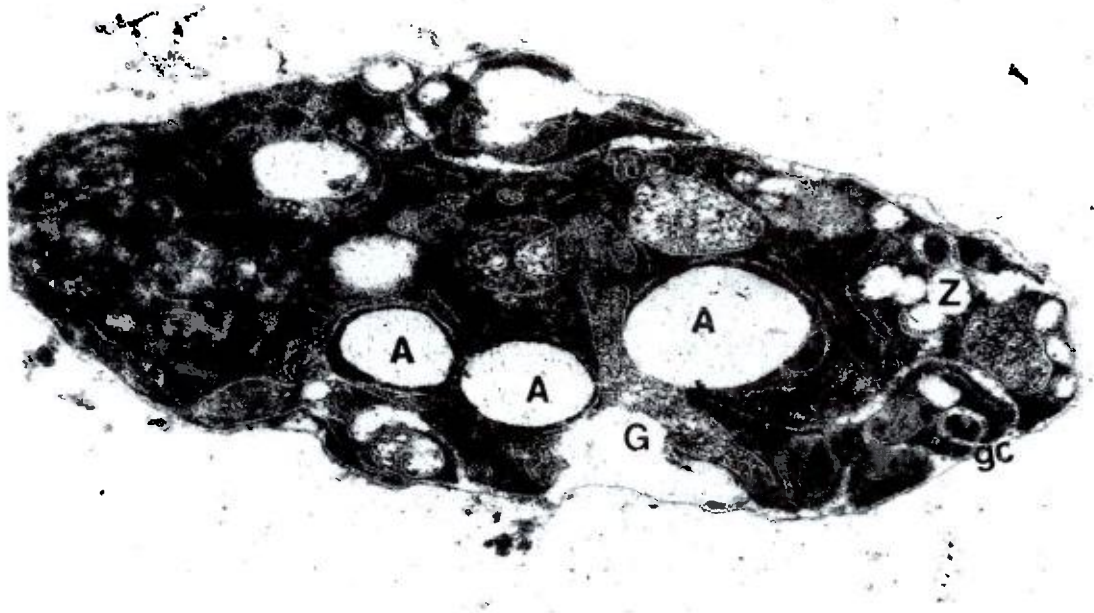


Fig 1. A transverse section of midgut of *Antheraea assama* showing axons of nerve fibres (A), goblet cell (G), golgi cisternae (gc) and Zymogen-like granules (Z) $\times 10,000$.

Fig 1. Coupe transversale de l'intestin moyen d'Antheraea assama montrant des axones des fibres nerveuses (A), des cellules en gobelet (G), des vésicules de l'appareil de golgi (gc) et des granules semblables au Zymogène (Z) $\times 10\ 000$.

2. Golgi Cisternae and Zymogen-like Granules:

The occurrence of agranular cisternae in the cytoplasm of columnar mid gut cells (Fig 1-3) collected into Golgi bodies in the vicinity of nucleus is significant. It is possible that these membranes play a role in the synthesis and release of digestive enzymes (Smith, 1968). The details of this function in terms of fine structure, however, are not well understood. The dense droplets observed within the Golgi Cisternae in the cytoplasm of mid gut cells of muga silkworm (Fig 1, 2) were also reported in *Ephesia* gut cells (Smith, 1968). It was suggested that the droplets may represent secreted material comparable to zymogen granules of pancreatic cells. However, this has so far been a mere conjecture, since the release of the material into the lumen has not been reported in any insect. Moreover, in all the insects, mid gut cells were reported to lack the intra-cisternal granules enclosed by rough membranes that mark the early stages of zymogen secretion. Our study shows that the release of the secreted droplets into the lumen takes place in the muga silkworm (Fig. 4). Further, the intra-cisternal granules enclosed by rough membranes indicating early stages of zymogen secretion is also evident in the muga silkworm (Figs 1, 2, 4). Thus the suggestion that the dense droplets present within the Golgi Cisternae may represent secreted materials comparable to zymogen granules is supported by our observations.

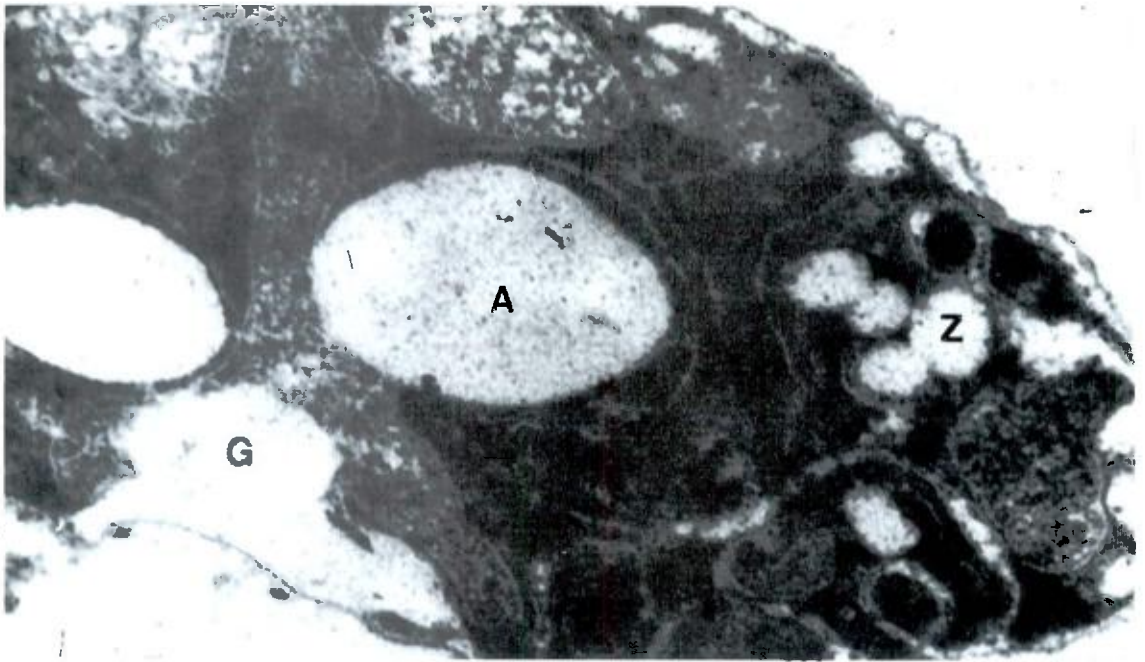


Fig 2. An enlarged view of Fig. 1 $\times 20,000$.
Fig. 2. Agrandissement de la figure 1 $\times 20\ 000$.



Fig. 3 Axons of nerve fibres associated with visceral muscle $\times 30,000$.
Fig. 3. Axones de fibres nerveuses associés aux muscles viscéraux $\times 30\ 000$.

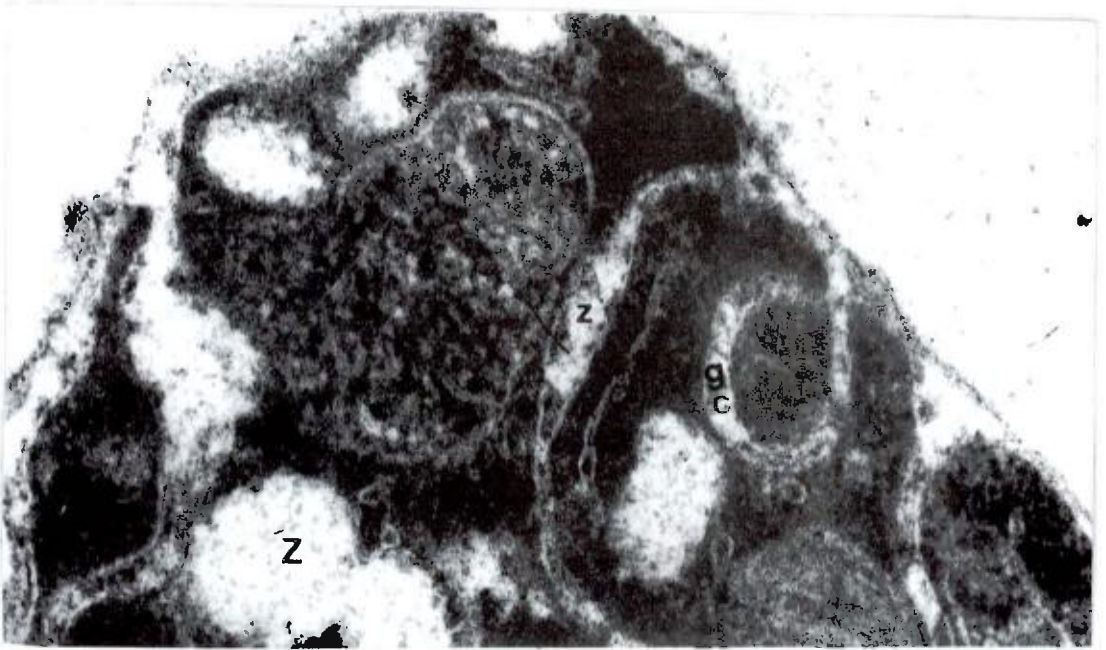


Fig. 4. An enlarged view of golgi cisternae (gc), showing dense droplets similar to Zymogen granules within the cisternae (Z) and release of the same into the lumen (L) $\times 25,000$.

Fig. 4. Agrandissement des images des vésicules de l'appareil de golgi (gc) montrant des gouttes denses semblables aux granules de Zymogène à l'intérieur des vésicules (Z) et leur libération dans la lumière (L) $\times 25\ 000$.

3. Modification in Goblet Cell:

Goblet cells distributed amongst the columnar epithelium of the mid gut of muga silkworm larvae are similar to those reported in other insects (Figs 1-2). The cells were characterised by the invagination of apical border forming a deep cavity that confines the nucleus to the basal region. These cells are known to play a definite role in ion transport between the haemolymph and the gut lumen (Smith, 1968). However, some modifications were observed in the goblet cells in the muga silk worm, in which the usual close association between mitochondria and cell membrane reported in cells that carry out transport function, is lacking. Phytophagous insects, including lepidopteran larvae have to overcome a special physiological problem posed by their diet. The electrical potential difference maintained across the surface membrane of most of the animal cells results from a high internal and low external concentration of potassium ions. Since in plant materials, the concentration of potassium is very high, and that of sodium is low, phytophagous insects must prevent the potassium level in the body fluid from equilibrating with that of their food (Smith, 1968). This function is carried out by

Malpighian tubules in most of the insects. However, in some silkmths, e.g. *Cecropia*, a similar service was reported to be rendered by goblet cells (Anderson and Harvey, 1966). In goblet cells of *Cecropia*, plasma membrane lying beside the mitochondria is studded with small particles, which probably are part of the machinery for the moving ions across the cell membrane. Whether the goblet mitochondria placed near microvilli provides the energy needed to transport ion out of the cells or whether the cells themselves take up and concentrate potassium before it is expelled, is not clear. Unlike the silkmth *Cecropia*, mitochondria near the microvilli could not be detected in the muga silkworm in our study. This suggests that metabolic work required for extrusion of potassium is reduced. Possibly, the fluid within the goblet cavity contains lower concentration of potassium than that of the gut lumen, and may thus be a device for reducing the metabolic work required to extrude potassium from the cell.

4. Cell to cell link:

One or more tight junctions are observed between mid-gut cells and goblet cells and also between adjoining cells of the mid-gut (Figs 1,2). These junctions establishing a cell to cell link are similar to those reported in vertebrate epithelia. It is believed that these inter cellular junctions seal off the direct route to water-ions and water-soluble molecules between adjacent cells (Farquhar and Palade, 1963). These junctions may be important in ionic regulation by the gut wall by preventing leakage of ions from the lumen of the gut to the haemolymph.

CONCLUSION

Transmission electron microscopy reveals that cellular features of the mid gut of the muga silkworm are highly advanced and there is a close association between mid-gut cells and neurosecretory cells of the somatogastric nervous system. Since the activity of neurosecretory cells are known to be affected by light and temperature, proper monitoring of these abiotic factors may be important for feeding and digestion of the silkworm to achieve success in indoor rearing. Absence of mitochondria associated with microvilli in goblet cells suggests that metabolic work required for extrusion of potassium from mid gut cells is reduced in muga silkworm, and, an alternative device by maintaining a lower level of potassium in goblet cell cavity as compared to that in gut lumen is adopted. Hence it appears that care should be taken to maintain the sodium-potassium ratio of the food plant leaf, particularly during indoor rearing, which is likely to play a major role in ionic regulation in muga silkworm gut. The usual practice of rearing the worm by providing leaves only once or twice a day is likely to disturb the ratio, because of water loss due to evaporation. It will be important to know whether frequent and regular supply of fresh leaves can maintain the Na-K ratio, and minimise the difficulties of functioning of goblet cells due to the possible disturbances in ionic balance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Prof. D. T. Khathing, Head, Regional Sophisticated Instrumentation Centre, North-Eastern Hill University, Shillong, Prof. P.C. Bhattacharjee, Head, Department of Zoology, Guahati University, Guwahati, and Prof. B. K. Sharma, Head, Department of Zoology, North-Eastern Hill University Shillong, for encouragement and interest in the work.

REFERENCES

- ANDERSON E., HARVEY W.R. (1966) Active transport by *Cecropia* mid gut. II Fine structure of the mid gut epithelium. *J. Cell biol.*, 31, 107-134.
 BERTRAM D.S., BIRD R.G. (1961) Studies on mosquito borne viruses in their vectors. I. The normal fine structure of the mid-gut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L) and the functional

- significance of its modification following a blood meal. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 55, 404-423.
- BORDOLOI S., HAZARIKA L. K. (1992) Seasonal variation of body weight, lipid reserves, blood volumes and hemocyte population of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae) Environ. Entomol., 21(6): 1398-1403.
- CHAUDHURY S.N. (1981) Muga Silk Industry, 1st ed. Directorate of Sericulture, Assam, India.
- DEY S. (1983) Food utilisation by the last instar larvae of the silk moth *Antheraea proylei* in indoor condition. The Indian Zoologist, 7, 1 & 2, 85-87.
- DEY S., RAGHUVARMAN A. (1986) Effect of light on brain neurosecretory cells of the honey bee, *Apis cerana indica* and its significance in screening pigment movement of the compound eye. Curr. Sci., 55, 16, 808-809.
- DEY S. (1987) Ecophysiological studies on fecundity, oviposition behaviour and longevity of the silkworm *Antheraea proylei*. The Indian Zoologist, 11, 1&2, 13-17.
- DEY S., HOOROO R.N.K., BISWAS N. (1997) Dendritic organisation of prominent sensory structure on the body of the first instar larva of the muga silk moth (*Antheraea assamensis*) Cytobios, 92, 99-110.
- FARQUHAR M.G., PALADE G.E. (1963) Junctional Complexes in various epithelia. J. Cell Biol., 17, 375-412.
- GABE M. (1966) Neurosecretion, Pergamon, Oxford.
- HAZARIKA L. K., BORDOLOI S., KATAKY A. (1992) Effects of host plants on haemocyte populations and blood volumes of *Antheraea assama* West wood (Lepidoptera: Saturniidae). Sericologia 34(2), 301-306
- HAZARIKA L. K., BORDOLOI S. (1998) Antennal and mouthpart sensilla of the muga silkworm, *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae) Sericologia, 38(1) 55-63.
- KHAN M. R., FORD J. B. (1962) Studies on digestive enzyme production and its relationship to the cytology of the mid-gut epithelium in *Dysdercus fasciatus* Sign. (Hemiptera, Pyrrhocoridae). J. Insect Physiol., 8, 597-608.
- REYNOLD E.S (1963) The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212
- SCHARRER E., SCHARRER B. (1954) Recent progress in hormone research, Academic Press, New York.
- SCRIBER J. M., SLANSKY F. Jr (1981) The nutritional ecology of immature insects. Ann. Rev. Entomol., 26, 183-211.
- STRAUSFELD N. J. (1976) Atlas of an insect brain. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- SMITH D.S. (1968) Insect cells: their structure and function. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Adv. Insect. Physiol., 5, 229-288.
- WIGGLESWORTH V. B. (1965) The principles of insect physiology, 6th Edn, Ch II, Methuen, London.

CARACTERISTIQUES CELLULAIRES DE L'INTESTIN MOYEN DU VER A SOIE MUGA (*ANTHRAEA ASSAMA* WW., LEPIDOPTERA / SATURNIIDAE) ET LEURS REPERCUSSIONS PROBABLES POUR L'ELEVAGE EN INTERIEUR

S. DEY*¹, R. N. K. HOOROO², N. BISWAS³, A. RAGHUVARMAN² & S. CHOUDHURY²

1. Electron Microscope Laboratory, Regional Sophisticated Instrumentation Centre, North-Eastern Hill University, Shillong - 793 003, Inde.

2. Department of Zoology, North-Eastern Hill University, Shillong - 793 022, Inde.

3. Central Silk Board Research Extension Centre, Diphu - 782 460, Inde.

Certaines caractéristiques ultrastructurales des cellules de l'intestin moyen du ver à soie muga, Anthraea assama Westwood sont décrites à partir des observations faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission. Les caractéristiques cellulaires uniques de l'intestin moyen peuvent fournir des renseignements sur les difficultés rencontrées lors du nourrissage, de la digestion et de l'assimilation de la nourriture du ver à soie pendant l'élevage en intérieur. De nombreuses petites fibres nerveuses comprenant un nombre important de neurotubules et de gouttelettes neurosécrétrices, innervent les muscles viscéraux. Certains matériaux sécrétés comparables à des granules de zymogènes sont présents à l'intérieur des vésicules de Golgi. Les cellules en gobelet, comme celles d'autres larves de lépidoptères sont marquées par la présence d'invagination apicale, mais les mitochondries étroitement serrées et les microvillosités projetées hors des cellules sont absentes.

INTRODUCTION

Le ver à soie muga, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera : Saturniidae) est un insecte séricigène multivoltin, particulier à la région de l'Assam et des régions avoisinantes du nord-est de l'Inde. Il se nourrit des feuilles de *Machilus bombycina* King., de *Litsaea polyantha* A. Juss., de *Litsaea citrata* Roxy, de *Litsaea salicifolia* Roxy et d'autres plantes appartenant à la famille des lauracées. Le poids du corps larvaire, la teneur corporelle en eau, le volume du sang, le nombre d'hémocytes totaux et la largeur de la capsule céphalique varient selon les plantes hôtes et les saisons (Bordoloi et Hazarika, 1992 ; Hazarika et coll., 1992). Les variations saisonnières de la croissance et du développement larvaires et la survie des insectes herbivores en fonction des différentes plantes hôtes sont influencés par la prise de nourriture, la digestion et l'assimilation (Waldbauer, 1968 ; Scriber et Slanski, 1981). Les mêmes raisons s'appliquent probablement à la diminution observée de la croissance et à la prolongation de la vie larvaire chez le ver à soie muga pendant son élevage en intérieur lorsqu'on le compare au ver à soie élevé en extérieur. De ce point de vue, l'organisation cellulaire du tractus intestinal semble être importante. L'intestin antérieur est responsable de l'ingestion et de l'acheminement de la nourriture vers l'intestin moyen, là où est fait le captage principal des produits de la digestion. L'intestin postérieur est un réservoir d'eau important et une

* Auteur auquel adresser la correspondance

zone de ré-absorption ionique. Les variations significatives des caractéristiques cellulaires de l'intestin moyen de l'insecte, sont en relation directe avec la physiologie digestive (Anderson et Harvey, 1966 ; Bertram et Bird, 1961 ; Khan et Ford, 1962 ; Smith, 1968).

Le but de l'étude actuelle est d'examiner la structure détaillée des cellules de l'intestin moyen du ver à soie muga afin de comprendre sa particularité, si elle existe, en relation avec le nourrissage et la digestion. En outre, les études sur la structure, détaillée des différentes parties du corps de la larve d'*Antheraea assama* sont très peu nombreuses (Dey et coll., 1997 ; Hazarika et Bordoloi, 1998). L'étude actuelle représente la première tentative en la matière, en ce qui concerne l'ultrastructure chez la larve.

MATERIELS ET METHODES

Des intestins moyens de larves d'*Antheraea assama* à leur cinquième stade, ont été utilisés pour cette étude. Les échantillons ont été coupés en petits morceaux et placés pendant 4 heures à 4° C dans 3 % de glutaraldéhyde préparée dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 7,2). Les spécimens ont été lavés à l'aide d'un tampon de cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 7,2), puis avec 1 % de tétroxyde d'Osmium dans le même tampon pendant 8 heures à 4° C, puis imprégnés à l'acétate d'uranyl-1 % et à l'acide phosphotungstique-0,1 % dans de l'éthanol à 70 %, à l'abri de la lumière pendant 6 heures et à température ambiante (Strausfeld, 1976). Les spécimens ont été déshydratés par une série d'acétone et d'oxyde de propylène, puis inclus dans de l'Araldite. Des morceaux de ces tissus inclus dans le plastique ont été ré-orientés et des coupes ultrafines (500 à 600 Å) ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome LKB, Ultratome V, muni de couteaux de verre. Les coupes ont été recueillies sur une grille de cuivre, puis colorées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyl pendant 10 min à 60° C, puis de citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les coupes ont été examinées avec un microscope électronique à transmission JEE 100 CX (Jeol), à un voltage de 60-80 KV.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Gaine musculaire et de tissu conjonctif

Comme chez les autres insectes, il manque à l'intestin moyen du ver à soie muga un système de vaisseaux capillaires sanguins et lymphatiques tels que ceux associés aux intestins des vertébrés. Une gaine musculaire et une enveloppe de tissu conjonctif entourent les cellules de l'intestin moyen (Figs. 1-4). La membrane basale comporte de multiples plis, ce qui augmente considérablement la surface à travers laquelle les ions et les molécules passent à l'intérieur et à l'extérieur des cellules (Smith, 1968). Les muscles des viscères sont innervés par de nombreuses petites fibres nerveuses, dont les axones contiennent un nombre important de neurotubules, accompagnés de gouttelettes neurosécrétrices (Figs. 1-3). Ceci suggère que les hormones qui contrôlent la sécrétion des enzymes digestives de l'intestin moyen pourraient être libérées à partir de certains de ces axones neurosécréteurs, qui comprennent des unités motrices du système nerveux somatogastrique (viscéral), qui se terminent sur les muscles de l'intestin. Il existe des preuves dans la littérature (Wigglesworth, 1965), attestant du contrôle hormonal de la sécrétion des enzymes digestives dans l'intestin moyen des insectes. Si de telles hormones peuvent être libérées ailleurs, afin d'atteindre les cellules de l'intestin via l'hémolymphe, la libération d'hormones à partir des axones neurosécréteurs pourrait être une alternative au contrôle de la sécrétion des enzymes digestives dans l'intestin moyen du ver à soie muga.

La libération d'hormones à partir des cellules neurosécrétrices, ainsi que le transport axonal des matériaux neurosécréteurs sont influencés par des facteurs environnementaux tels que la lumière et la température (Scharrer et Scharrer, 1954 ; Gabe, 1966 ; Dey et Raghuvarman, 1986). Les variations saisonnières du poids du corps chez le ver à soie muga (Bordoloi et Hazarika, 1992) sont vraisemblablement influencées par le nourrissage et la digestion, puisque la prise, la digestion et

l'assimilation de la nourriture sont connues pour affecter la croissance larvaire et le développement des insectes herbivores (Waldbauer, 1968 ; Scriber et Slansky, 1981 & Dey, 1983). L'innervation des muscles viscéraux par les fibres nerveuses comprenant des neurotubules et des gouttelettes neurosécrétrices, suggère un rôle des neurosécrétions dans la physiologie digestive du ver à soie. Ceci indique que les variations saisonnières de la croissance larvaire du ver à soie muga pourraient être dues aux variations de l'activité neurosécrétrice du système nerveux viscéral en relation avec les différences saisonnières des conditions de lumière et de température. La diminution de la croissance larvaire, la diminution significative du poids des cocons, des coques et du poids adulte ainsi que l'augmentation de la période larvaire chez le ver à soie muga et d'autres espèces du genre *Antheraea* pendant l'élevage en intérieur (Chaudhury, 1981 ; Dey, 1987) semblent également être affectés par les conditions de lumière et de température, qui influencent à leur tour la neurosécrétion.

2. Les vésicules de Golgi et les granules de type zymogène :

La présence de vésicules agranulaires dans le cytoplasme des cellules en colonnes de l'intestin moyen (Figs. 1-3), qui sont recueillies dans les corps de Golgi, aux alentours des noyaux cellulaires, est patente. Il est possible que ces membranes jouent un rôle dans la synthèse et la libération des enzymes digestives (Smith, 1968). Cependant, les détails de cette fonction en termes de structure fine, ne sont pas très bien compris. La présence de gouttelettes denses observées à l'intérieur des vésicules de Golgi, dans le cytoplasme des cellules de l'intestin moyen du ver à soie muga (Figs. 1-2), a également été remarquée dans les cellules de l'intestin d'*Ephestia* (Smith, 1968). Il a été avancé que les gouttelettes pourraient représenter le matériel sécrété comparables aux granules zymogènes des cellules pancréatiques. Cependant, tout ceci n'est qu'une hypothèse, puisque la libération du matériel dans la lumière n'a été rapportée chez aucun insecte. En outre, chez tous les insectes, les granules intra-vésiculaires contenues dans les membranes rugueuses qui marquent les premiers stades de la sécrétion de zymogène, font défaut dans les cellules de l'intestin moyen. Notre étude montre que la libération des gouttelettes sécrétées à l'intérieur de la lumière s'effectue chez le ver à soie muga (Fig. 4). En outre, les granules intra-vésiculaires enveloppées dans les membranes rugueuses, qui indiquent les premiers stades de la sécrétion de zymogène sont présentes chez le ver à soie muga (Figs. 1, 2, 4). Ainsi, l'hypothèse que les gouttelettes denses à l'intérieur des vésicules de Golgi, représente des matériaux comparables aux granules de zymogènes, est soutenue par nos observations.

3. Modification des cellules en gobelet :

Les cellules en gobelet distribuées dans l'épithélium en colonne de l'intestin moyen de la larve du ver à soie muga sont similaires à celles observées chez d'autres insectes (Figs. 1-2). Les cellules sont caractérisées par l'invagination de la frontière apicale formant une cavité profonde qui confine le noyau cellulaire à la région basale. Ces cellules sont connues pour jouer un rôle dans le transport des ions entre l'hémolymphe et la lumière de l'intestin (Smith, 1968). Cependant quelques modifications ont été observées dans les cellules en gobelet du ver à soie muga. L'association étroite, habituellement remarquée entre les mitochondries et la membrane cellulaire des cellules effectuant la fonction de transport fait ici défaut. Les insectes phytophages, y compris les larves de lépidoptères ont à dépasser un problème physiologique spécifique que leur pose leur régime. La différence de potentiel électrique maintenue à travers la membrane de surface de la plupart des cellules animales provient d'une concentration interne élevée et externe basse en ions potassium. Puisque dans les matériaux végétaux, la concentration de potassium est très élevée, et celle du sodium est basse, les insectes phytophages doivent empêcher que le niveau de potassium de leurs fluides corporels s'équilibre avec celui de leur nourriture (Smith, 1968). Cette fonction est effectuée par les tubes de Malpighi chez la plupart des insectes. Cependant, chez certains vers à soie, à savoir *Cecropia*, une fonction similaire est effectuée par les cellules en gobelet (Anderson et Harvey, 1966). Chez les cellules en gobelet de *Cecropia*, la membrane cytoplasmique située près des mitochondries, est parsemée de petites particules, qui font probablement partie du système de déplacement des ions à

travers la membrane cellulaire. Nous ne pouvons pas savoir si les mitochondries en gobelet situées près des microvillosités fournissent l'énergie nécessaire au transport ionique à l'extérieur des cellules, ou si ces cellules prennent et concentrent le potassium avant qu'il ne soit évacué. Contrairement au papillon *Cecropia*, les mitochondries situées près des microvillosités n'ont pas pu être détectées chez le ver à soie muga. Ceci suggère que le travail métabolique nécessaire à l'extrusion du potassium est réduit. Il est probable que le fluide à l'intérieur de la cavité des cellules en gobelet contienne une concentration de potassium moins élevée que celui de la lumière de l'intestin et que ce soit donc un moyen de réduire le travail métabolique nécessaire à l'expulsion du potassium hors des cellules.

4. Liaison inter cellulaire :

Une à plusieurs jonctions fortes sont observées entre les cellules de l'intestin moyen et les cellules en gobelet, mais également entre les cellules contiguës de l'intestin moyen (Figs. 1-2). Ces jonctions établissant des passages de cellule à cellule sont similaires à celles de l'épithélium des vertébrés. Ces jonctions inter cellulaires sont supposées barrer la route directe des ions et des molécules solubles dans l'eau entre les cellules adjacentes (Farquhar et Palade, 1963). Ces jonctions peuvent être importantes pour la régulation ionique par la paroi intestinale en empêchant la fuite des ions de la lumière de l'intestin vers l'hémolymphe.

CONCLUSION

Le microscope électronique à transmission révèle que les caractéristiques cellulaires de l'intestin moyen du ver à soie muga sont très évoluées et qu'il existe une association étroite entre les cellules de l'intestin moyen et les cellules neurosécrétrices du système nerveux somatogastrique. Puisque l'activité des cellules neurosécrétrices est connue pour être affectée par la lumière et la température, un contrôle approprié de ces facteurs abiotiques semble être important pour le nourrissage et la digestion du ver à soie afin de réussir un élevage en intérieur. L'absence de mitochondries associées aux microvillosités des cellules en gobelet, suggère que le travail métabolique nécessaire à l'extrusion du potassium des cellules de l'intestin moyen est réduit chez le ver à soie muga et qu'un moyen alternatif a été adopté en maintenant un niveau de potassium moins élevé dans les cavités des cellules en gobelet, par rapport à celui de la lumière de l'intestin. Il apparaît donc important de maintenir le rapport sodium-potassium des feuilles des plantes nourricières, particulièrement pendant l'élevage en intérieur, qui joue certainement un rôle majeur dans la régulation ionique de l'intestin du ver à soie muga. La pratique habituelle d'élevage du ver à soie qui consiste à le nourrir de feuilles seulement une à deux fois par jour, doit vraisemblablement perturber ce ratio, en raison de la perte d'eau due à l'évaporation. Il sera important de savoir si un approvisionnement fréquent et régulier de feuilles fraîches peut maintenir le ratio Na-K, et minimiser ainsi les difficultés de fonctionnement des cellules en gobelet, dues aux perturbations possibles de l'équilibre ionique.

ISOLATED MICROSPORE CULTURE IN MULBERRY (*MORUS SPP.*)

S.P. CHAKRABORTI, K. VIJAYAN, B.N. ROY & B. SARATCHANDRA

Tissue Culture Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore,
West Bengal, 742 101, India.

For microspore culture in tropical mulberry, anthers were pretreated in mannitol prior to isolation of microspores by glass rod homogenizer. A modified MS medium containing 3 % sucrose, 2 % fructose and 1 % glucose supplied with 0.15 mg/l NAA and 2mg/l BAP was effective in inducing globular and torpedo shaped embryoids. Importance of mannitol pretreatment, hormonal composition and genotypic influence on embryogenesis from microspores is discussed.

Keywords: Mulberry, embryoids, microspore culture.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus spp.*) is an economically important tree for sericulture. Since cross pollination is the rule in mulberry it shows enormous heterozygosity. The genetics of mulberry has, thus, not been clearly elucidated for its better utilization in crop improvement. Development of homozygous lines through conventional breeding has been found unsuccessful due to its dioecious nature, long juvenile period, and the high genetic diversity among the male and female lines. Therefore, it is desirable to develop homozygous lines through the creation of double haploids.

In vitro haploid productions from gametophytic cells enable the establishment of completely homozygous lines in a shortened time frame compared to conventional methods and have many potential applications in plant breeding to establish inbred lines rapidly for F1 hybrid production and to observe recessive traits (Mahashwari *et al.*, 1980).

In mulberry with the exception of one report (Shoukang *et al.*, 1987) no success has been reported in the productions of haploid plants. Many attempts which have been made to develop haploid plants from cultured anther succeeded only in getting haploid callus with roots and no shoots (Katagiri and Modala, 1991; Jain *et al.*, 1996). Since all these efforts to produce haploids through anther culture were unsuccessful, the present research was undertaken to study the possibility of using isolated microspore culture to develop haploids.

Microspore culture presents a number of potential advantages over anther culture, mainly in relation to *in vitro* selection attempts for genetical studies. In anther culture, embryoids developed from the microspore often lose the contact with the medium due to the presence of dead anther wall (Shoukang *et al.*, 1987). The culture of isolated microspore has become a system for studies of embryogenesis *in vitro* (Taylor *et al.*, 1990).

A number of factors such as health and vigour of the stock plant, genetic constitution (Cho, 1991), method of isolation (Ziauddin *et al.*, 1992), density of microspore in the culture (Bolik and Koop, 1991; Olsen, 1991; Hoekstra *et al.*, 1993), media composition (Shoukang *et al.*, 1987; Arnison *et al.*, 1990; Muyan *et al.*, 1990; Mordhorst and Lorzlt, 1993; Cistuc *et al.*, 1995) are known to influence the viability, embryogenesis and regeneration ability of microspores (Kasha *et al.*, 1990).

The present study was an attempt to induce embryogenesis from isolated microspores and to determine the factors influencing the viability, growth and embryogenesis of microspores in mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

Male catkins were collected, during the normal flowering period of February-March, from six years old field grown mulberry *Morus alba* cv. S1 and *Morus indica* cv. S799. The plants were cultivated under 150 cm × 150 cm spacing with recommended package of practices and irrigation was provided every week to keep the plant in good physiological conditions.

mannitol Pre-isolation Conditioning:

Male catkins having 0.8 - 1.0 cm length were collected at 7.00 - 7.15 am, washed with 1 % cetavlon (20 % w/v cetrimide, an antiseptic and detergent) for 5 minutes followed by washing with tap water. Surface sterilization was with 5 % aqueous solution of sodium hypochloride for 5 minutes subsequently rinsing in sterile distilled water. The catkins were then incubated at 28°C in dark for 2 days under submerged condition in MS basal medium containing only mineral salts (Murashige and Skoog, 1962) and 0.4 M mannitol (MMC medium).

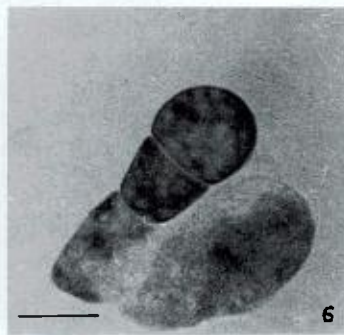
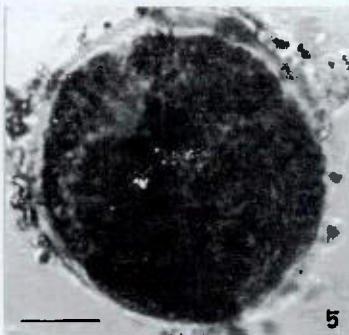
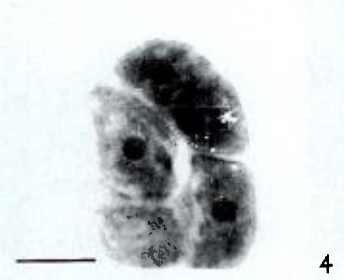
Microspore isolation procedures and culture conditions:

Anthers were carefully excised from the lower part (up to 0.5 cm) of both mannitol conditioned as well as freshly collected catkins and crushed separately in glass rod homogeniser containing 5 ml MMC medium. The microspore suspension was filtered through a nylon sieve having pore size of 200 µm and centrifuged at 100 rpm for 5 minutes. The pellets were washed twice in MMC medium and finally suspended in MMC at a density of 10,000/ml.

Viability of the microspore was assessed with 2 % acetocarmine. A total of 300 microspores were counted at random to calculate the viability of microspores. Microspore suspensions were then plated over solid MS medium at various concentrations of sugar and growth hormones. Sucrose 3-6 % alone or in combinations with fructose and glucose was used. Growth regulators such as 2, 4-D, NAA, BA and Kinetin were used at various concentrations, ranging from 0.1 mg/l to 0.25 mg/l of 2, 4-D and NAA and 0.5 mg/l to 2.5 mg/l of BA and Kinetin, either alone or in combinations. The pH of the medium was adjusted to 5.6 ± 1 and gelled with 0.6 % agar-agar (Hi-media, India). Cultures were kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 15 days, subsequently shifted to 16 h irradiance of $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the culture room at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60 - 65 % relative humidity.

RESULTS AND DISCUSSION

Viable microspores were with dense cytoplasm and darkly stained prominent nucleus, whereas the dead microspores were shrunken with collapsed cytoplasm (Fig. 1, 2). Initial viability percentage of the isolated microspores was considerably different between the two cultivars. Microspores isolated from fresh anthers were more viable than those from the mannitol conditioned anthers. In cultivar S1, viability was 69.12 ± 3.72 % in cultures of microspores from fresh catkins and 61.35 ± 9.12 % in that of mannitol conditioned catkins. In S799, the viability of microspores were 47.27 ± 6.25 % and 32.18 ± 4.21 % in fresh and mannitol treated catkins respectively (Table I). This slight difference in the initial viability between the fresh and conditioned microspores is possibly due to the stress caused by the mannitol as reported by Gustafson *et al.* (1995). Stress pre-treatment such as cold and temperature treatment is used to induce microspore embryogenesis in anthers (Nitsch, 1977; Osolnik *et al.*, 1993). Jain *et al.* (1996), found pre-treatment of mulberry anthers at 4°C for 24 hours is beneficial to induce more embryoids. Mannitol pre-conditioning has been reported to act as a substitute for cold treatment



Figures 1 - 6.
Embryogenesis from
microspores in mulberry.

*Figure 1 - 6. Embryogénèse
à partir de microspores
chez le mûrier.*

Figure 1. Embryogenic
microspore after 48 hs of
culture (bar = 2.2 μ m).

*Figure 1. Microspores
embryogéniques après 48
heures de culture (barre =
2,2 μ m).*

Figure 2. Dead microspore
after 48 hs of culture (bar
= 2.2 μ m).

*Figure 2. Microspore
morte après 48 heures de
culture (barre = 2,2 μ m).*

Figure 3. Bicellular
structure of microspore
after 72 hs of culture (bar
= 2.2 μ m).

*Figure 3. Structure
bicellulaire d'une
microspore après 72 heures
de culture (barre = 2,2 μ m).*

Figure 4. Quadri cellular
structure from microspore
at the 7 days (bar = 4 μ m).

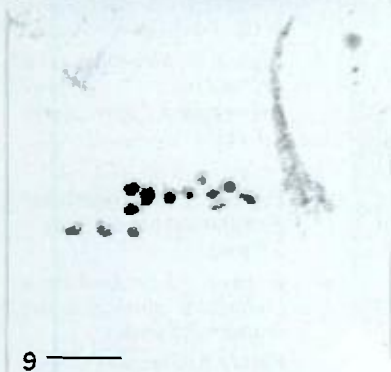
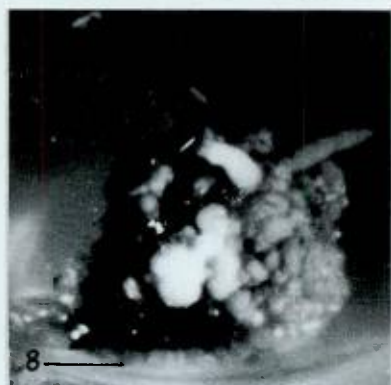
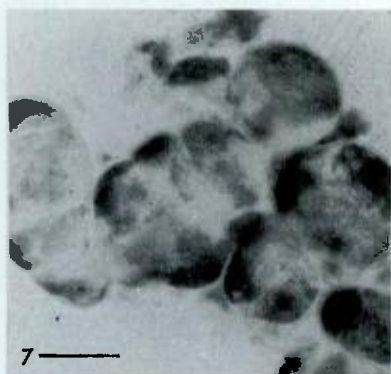
*Figure 4. Structure tetra
cellulaire d'une
microspore à 7 jours (barre
= 4 μ m).*

Figure 5. Multicellular
globular embryoid (bar =
3.5 μ m).

*Figure 5. Embryon
globulaire pluricellulaire
(barre = 3,5 μ m).*

Figure 6. Torpedo shaped
embryoid formation from
microspore (bar = 3.5 μ m).

*Figure 6. Formation
d'embryaïde en forme de
torpille à partir d'une
microspore (barre = 3,5
 μ m).*



Figures 7 - 9. Rhizogenesis from microspore callus.

Figures 7 - 9. Rhizogénèse à partir d'un cal de microspore.

Figure 7. Friable calli from microspore (bar = 3.2 μ m).

Figure 7. Cals friables provenant d'une microspore (barre = 3,2 μ m).

Figure 8. Root formation from nodular microspore calli (bar = 0.25 μ m).

Figure 8. Formation d'une racine à partir de cals de microspores nodulaire (barre = 0,25 μ m).

Figure 9. Haploid chromosomes from regenerated root ($2n = x = 14$) of microspore callus (bar = 1.4 μ m).

Figure 9. Chromosomes haploïdes d'une racine régénérée ($2n = x = 14$) à partir d'un cal de microspore (barre = 1,4 μ m).

Table I. Effect of mannitol pre-treatment on viability and division of isolated microspore in mulberry.

Tableau I. Effet du pré-traitement au mannitol sur la viabilité et la division de microspores isolées chez le mûrier.

Cultivar	Microspore viability		% of bicelled microspores	
	Fresh Anther	Mannitol Conditioned	Fresh Anther	Mannitol Conditioned
	<i>Viabilité des microspores</i>		<i>% des microspores bi-cellulaires</i>	
	<i>Anthères fraîches</i>	<i>Conditionnées au mannitol</i>	<i>Anthères fraîches</i>	<i>Conditionnées au mannitol</i>
S1	69.12 ± 3.72	61.35 ± 9.12	-	20.77 ± 0.02
S799	47.27 ± 6.25	32.18 ± 4.21	31.27 ± 0.38	75.23 ± 00.97

Table II. Effect of sugar on embryogenesis in mulberry microspores (*M. indica* cv. S799).

*Tableau II. Effet du sucre sur l'embryogénèse chez les microspores du mûrier (*M. indica* cv. S799).*

Nature of the embryo <i>Nature de l'embryon</i>	Sugar/Sucre				
	Sucrose (3 %)	Sucrose (4 %)	Sucrose (6 %)	Sucrose (3 %) + Fructose (3 %)	Sucrose (3 %) + Fructose (2 %) + Glucose (1 %)
Globular	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.02 ± 5.62	30.23 ± 5.67	43.28 ± 8.90*
Torpedo	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.08 ± 1.08	5.51 ± 1.23	28.45 ± 4.62*

* From 100 anthers in each treatment (medium supplied with 0.15 mg/l NAA and 2 mg/l BAP). / *A partir de 100 anthères pour chaque traitement (milieu contenant 0,15 mg/l NAA et 2 mg/l BAP).*

Table III. Effect of growth hormones on microspores in mulberry (*M. indica* cv. S799).

Tableau III. Effet des hormones de croissance sur les microspores chez le mûrier (*M. indica* cv. S799).

Growth hormones(mg/l)		Callus induced (%)	Growth hormones (mg/l)		Embryoids (%)
2, 4-D	BA		NAA	BA	
<i>Hormones de croissance (mg/l)</i>		<i>Cals induits (%)</i>	<i>Hormones de croissance</i>		<i>Embryons (%)</i>
2, 4-D	BA		NAA	BA	
0.00	0.0	0.00 ± 0.00	0.00	0.0	00.0 ± 0.00
0.10	0.0	4.35 ± 0.57	0.10	0.0	00.0 ± 0.00
0.15	0.0	7.00 ± 1.52	0.15	0.0	00.0 ± 0.00
0.20	0.0	11.33 ± 0.37	0.20	0.0	00.0 ± 0.00
0.25	0.0	7.66 ± 3.11	0.25	0.0	00.0 ± 0.00
0.00	0.5	0.00 ± 0.00	0.00	0.5	00.0 ± 0.00
0.10	0.5	9.33 ± 2.00	0.10	0.5	00.0 ± 0.00
0.15	0.5	11.66 ± 0.18	0.15	0.5	00.0 ± 0.00
0.20	0.5	13.33 ± 3.24	0.20	0.5	00.0 ± 0.00
0.25	0.5	22.17 ± 5.89	0.25	0.5	00.0 ± 0.00
0.00	1.0	0.00 ± 0.00	0.00	1.0	00.0 ± 0.00
0.10	1.0	14.33 ± 1.43	0.10	1.0	00.0 ± 0.00
0.15	1.0	37.33 ± 0.57	0.15	1.0	00.0 ± 0.00
0.20	1.0	59.66 ± 4.92	0.20	1.0	00.0 ± 0.00
0.25	1.0	42.66 ± 7.51	0.25	1.0	00.0 ± 0.00
0.00	1.5	0.00 ± 0.00	0.00	1.5	00.0 ± 0.00
0.10	1.5	16.00 ± 0.00	0.10	1.5	00.0 ± 0.00
0.15	1.5	14.33 ± 6.56	0.15	1.5	11.66 ± 12.01
0.20	1.5	21.60 ± 3.23	0.20	1.5	12.33 ± 4.16
0.25	1.5	28.66 ± 9.25	0.25	1.5	3.33 ± 2.31
0.00	2.0	0.00 ± 0.00	0.00	2.0	00.0 ± 0.00
0.10	2.0	5.66 ± 1.14	0.10	2.0	8.00 ± 5.29
0.15	2.0	10.66 ± 3.21	0.15	2.0	28.45 ± 4.82
0.20	2.0	4.33 ± 2.08	0.20	2.0	11.33 ± 4.43
0.25	2.0	16.00 ± 4.92	0.25	2.0	2.33 ± 1.52
0.00	2.5	0.00 ± 0.00	0.00	2.5	00.0 ± 0.00
0.10	2.5	9.33 ± 1.32	0.10	2.5	00.0 ± 0.00
0.15	2.5	13.33 ± 7.20	0.15	2.5	00.0 ± 0.00
0.20	2.5	11.66 ± 5.37	0.20	2.5	00.0 ± 0.00
0.25	2.5	12.33 ± 4.48	0.25	2.5	00.0 ± 0.00

in microspore cultures (Roberts-Oehlschlager and Dunwell, 1990). The present investigation also confirmed the beneficial effects of mannitol conditioning in embryogenesis as considerable enhancement of proembryoid formation was observed in mannitol conditioned microspores although, initially, microspore viability was reduced as a result of mannitol pre-treatment.

Swelling of microspores was observed in the culture after 24 hours of inoculation. The viability of microspores was effected by the concentration and combination of sugars, as in low concentration the swelling of microspores was faster. In 3-4 % sucrose, 50-60 % of the viable microspore swelled within 24 hours and started bursting after 2 days of inoculation. In 6 % sugar both sucrose alone and its combinations the microspores started dividing within 24 hours from the inoculation. About 30-40 % of microspores were found in bicelled conditions after 3 days in 6 % sugar (Fig. 3). Some of the bicelled cells on further division developed into quadri celled structures (Fig. 4) within one week. The percentage of such structures was higher in the medium containing sucrose in combination with fructose and glucose (Table II). Globular (Fig. 5) and torpedo shaped embryoids (Fig. 6) were observed after 2 weeks. The swollen microspores in the presence of 2, 4-D divided in all planes and developed into undifferentiated masses of callus (Fig. 7). The calli were green and compact which developed roots upon transfer to NAA containing medium (Fig. 8). Chromosome analysis of the root tip showed its haploid nature (Fig. 9).

The results further suggest that higher sugar concentration is essential to maintain adequate osmotic potential in the medium for proper division and development of microspores.

In low concentration of sugar, poor viability was observed due to low osmotic potential of the medium. Jain *et al.* (1996), also found such beneficial effects of higher concentration of sugar on anther culture in mulberry. Similar kind of results have also been reported in other crops (Zhou *et al.*, 1991; Ball *et al.*, 1992). Partial replacement of sucrose with other sugars was found advantageous in induction of embryogenesis. The best result was obtained from the medium containing all the three carbon sources (sucrose, fructose and glucose) in different ratio. Ogure (1989) found that for mulberry flower culture, fructose and glucose are better carbon sources than sucrose. Enhanced embryo formation due to replacement of sucrose with other sugar has also been reported from other crops (Orshinsky *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1991).

The ratio and nature of hormones present in the medium were the most critical factor deciding the development of embryoids. Presence of 2, 4-D has an inhibitory effect on embryogenesis. Because of its strong effect, in all concentrations and combinations, it induced callus from the microspores (Table III). NAA, on the other hand, in combination with BA gave the best results (Table III). The most effective hormonal combination for the formation of embryoids in mulberry was 0.15 mg/l NAA and 2 mg/l BA. Kintin did not have much effect on microspore division and development. Shoukang *et al.*, (1987) also found BA as the best cytokinin for embryogenesis from anthers of mulberry. Jain *et al.*, (1996), found low levels of NAA and BA are effective to induce embryos from the anther callus. Results of this investigation also confirmed these findings. Similarly, higher number of embryoids were observed in S799 (43.28 ± 8.90) as compared to S1 (11.23 ± 3.89) (Table III). This clearly reveals the genotypic influence on embryogenesis in mulberry.

The present investigation, thus, clearly suggests the possibility of using microspore culture to develop haploid plants in mulberry. The effect of genotype on microspore culture suggests that a general protocol for microspore culture may not be suitable for all genotypes as there is a considerable genetic variability between tropical and temperate mulberry genotypes. The information generated in this investigation regarding the effect of sugar, hormone and amino acids is of importance to develop a reproducible protocol to develop haploid plants in mulberry.

REFERENCES

- ARNISON P. G., DONALDSON P., JACKSON A., SEMPLE C., KELLER W. (1990) Genotype-specific response of cultured broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) anthers to cytokinin. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 20: 217-222.
- BALL S. T., ZHOU H., KOUZAK C. F. (1992) Sucrose concentration and its relationship to anther culture in wheat. *Crop Sci.* 32: 149-154.
- BOLIK M., KOOP H. U. (1991) Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare*) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. *Protoplasma.* 162: 61-68.
- CHO U. H. (1991) Hormonal aspects of androgenic induction in barley (*Hordeum vulgare*) Ph. D thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario.
- CISTUE L., ZIAUDDIN A., SIMION E., KASHA K. J. (1995) Effect of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 42: 163-169.
- GUSTAFSON V. D., BAENZIGER P. S., WRIGHT M. S., STROUP W. W., YANG YEN (1995) Isolated wheat microspore culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42: 207-213.
- HOEKSTRA S., VAN ZIJDERVELD M. H., GEIDEKAMP F., VAN DER MARK F. (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L., the influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep.* 12: 661-665.
- JAIN A. K., SARKAR A., DATTA R. K. (1996) Induction of haploid callus and embryogenesis in *in vitro* cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 143-147.
- KASHA K. J., ZIAUDDIN A., CHO U. H. (1990) Haploids in Cereal improvement: anther and microspore culture. In: Gustafson P. J. (Ed), *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, pp. 213-216. Plenum Press.
- KATAGIRI K., MODALA V. (1991) Effect of sugar and sugar alcohol on the division of mulberry pollen in tissue culture. *J. Seric. Sci. Jpn* 60: 514-516.
- MAHASHWARI S. C., TYAGI A. K., MALHOTRA K. (1980) Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms: the current status. *Theor. Appl. Genet.* 58: 193-206.
- MORDHORST A. P., LORZLT (1993) Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores as influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J. Plant Physiol.* 142: 485-492.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- MUYAN Z., ABING X., MIAOBAO Y., CHUNONG H., ZHILONG Y., LINJI W., JIANJUN Y. (1990) Effect of amino acids on callus differentiation in barley anther culture. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 22: 201-204.
- NITSCH C. (1977) Culture of isolated microspores. In: Reinert J & Bajaj YPS (eds) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* (pp 268-278) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- OGURE M. (1989) Plantlet induction in culture of chopped male flower cluster of mulberry (*Morus alba* L.) *J. Seric. Sci. Jpn* 58: 424-430.
- OLSEN F. L. (1991) Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Hereditas* 115: 255-266.
- ORSHINSKY B. R., MC GREGOR W., JOHNSON G. E., HUEL P., KARTHA K. K. (1990) Improved embryoids and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* 9: 365-369.
- OSOLNIK B., BOCHANEE B., JELASKA S. (1993) Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 32: 241-246.
- ROBERTS-OEHLSCHLAGER S. L., DUNWELL J. M. (1990) Barley anther culture. Pre-treatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 20: 235-240.
- SHOUKANG L., DOUGFENG J., JUN QIN (1987) *In vitro* Production of haploid plant from mulberry (*Morus*) anther culture. *Sci. Sinica* 30: 853-863.

- TAYLOR D. C., WEBER N., UNDERHILL E. W., POMERY M. K., KELLER W. A., SCOWEROF W. R., WILEN R. W., MOLONEY M. M., MOLBROOK L. A. (1990) Storage-protein regulation and lipid accumulation in microspore embryo of *Brassica napus* L. *Planta* 181: 18-26.
- ZHOU H., ZHENG Y., KONZ C. F. (1991) Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* 10: 63-66.
- ZIAUDDIN A., MARSOLAIS A. A., SIMON E., KASHA K. J. (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid. *Plant Cell Rep.* 11: 489-498.

CULTURE DE MICROSPORES DE MURIER (*MORUS* SPP.)

S.P. CHAKRABORTI, K. VIJAYAN, B.N. ROY & B. SARATCHANDRA

Tissue Culture Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore,
West Bengal, 742 101, Inde.

Pour la culture de microspores de mûrier tropical, des anthères ont été pré-traitées au mannitol avant l'isolement des microspores avec un homogénéiseur. Un milieu MS modifié contenant 3 % de saccharose, 2 % de fructose et 1 % de glucose supplémenté avec 0,15 mg/l de NAA et 2 mg/l de BAP s'est avéré efficace pour l'induction d'embryons globulaires et allongés. L'étude porte sur l'importance du pré-traitement au mannitol avant l'isolation de microspores par l'homogénéiseur, de la composition hormonale et de l'influence génotypique sur l'embryogénèse à partir de microspores.

INTRODUCTION

D'un point de vue économique, le mûrier (*Morus* spp.) est un arbre très important pour la sériciculture. Depuis que la pollinisation croisée est de règle, le mûrier montre une grande hétérozygotie. La génétique chez le mûrier n'a pas été suffisamment étudiée pour pouvoir l'utiliser dans l'amélioration des récoltes. Le développement de lignées homozygotes par la sélection conventionnelle s'est avéré infructueux à cause de la nature dioïque du mûrier, sa période juvénile longue et la grande diversité génétique parmi les lignées mâles et femelles. Il est donc intéressant de développer des lignées homozygotes par la création d'haploïdes doubles.

Les productions d'haploïdes *in vitro* à partir de cellules gamétophytes permettent l'établissement de lignées homozygotes complètes sur une courte période par comparaison aux méthodes conventionnelles et permettent de nombreuses applications potentielles en ce qui concerne la sélection des plantes afin d'établir rapidement des lignées consanguines pour la production d'hybrides F1 et pour observer les caractéristiques récessives (Mahashwari et coll., 1980).

À l'exception d'un rapport (Shoukang et coll., 1987), l'obtention de mûriers haploïdes n'a pas été, pour l'instant, couronnée de succès. Les nombreuses tentatives qui ont été effectuées pour développer les plantes haploïdes à partir de culture d'anthères ont seulement permis d'avoir des cals haploïdes avec des racines et non avec des pousses (Katagiri et Modala, 1991; Jain et coll., 1996). Comme tous les efforts pour produire des haploïdes par des cultures d'anthères ont été infructueux, nous avons décidé d'étudier la possibilité d'utiliser une culture de microspores isolées pour développer des haploïdes.

La culture de microspores présente potentiellement plusieurs avantages sur la culture d'anthères, cela en grande partie pour des essais de sélection *in vitro* en vue d'études génétiques. Dans la culture d'anthères, les embryons développés à partir d'une microspore perdent souvent le contact avec le milieu à cause de la présence de cloisons d'anthères mortes (Shoukang et coll., 1987). La culture de microspores isolées est devenue un système pour les études d'embryogénèse *in vitro* (Taylor et coll., 1990).

Un nombre de facteurs tels que la santé et la vigueur des plantes 'mères', la constitution génétique (Cho, 1991), la méthode d'isolement (Ziauddin et coll., 1992), la densité des microspores dans la culture (Bolik et Koop, 1991; Muyan et coll., 1990; Mordhorst et Lorzlt, 1993; Cistuc et coll., 1995)

sont connus pour leur influence sur la viabilité, l'embryogénèse et la capacité de régénération des microspores (Kasha et coll., 1990).

Cette étude est une tentative d'induire l'embryogénèse à partir de microspores isolées et de déterminer les facteurs influençant la viabilité, la croissance et l'embryogénèse des microspores chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

La plante :

Les chatons mâles ont été récoltés sur des mûriers, *Morus alba* cv. S1 et *Morus indica* cv. S799, âgés de 6 ans, pendant la période normale de floraison, de février à mars. Les plantes ont été cultivées avec des espacements de 150 cm × 150 cm ; les pratiques d'usages et l'irrigation sont réalisées toutes les semaines pour garder les plantes dans de bonnes conditions physiologiques.

Conditionnement au mannitol avant l'isolement :

Les chatons mâles ayant une longueur de 0,8 - 1 cm ont été ramassés entre 7h. et 7 h.15 ; ils ont été lavés avec 1 % de cetavlon (20 % p/v de cétrimide, un antiseptique et un détergent) pendant 5 minutes puis rincer avec l'eau du robinet. La stérilisation de la surface a été obtenue avec une solution aqueuse à 5 % d'hypochlorure de sodium pendant 5 minutes puis un rinçage dans de l'eau distillée stérile. Les chatons ont été alors incubés à 28°C dans le noir pendant 2 jours immergés dans un milieu MS de base contenant seulement des sels minéraux (Murashige et Skoog, 1962) et 0,4 M de mannitol (milieu MMC).

Procédures d'isolement des microspores et conditions de culture :

Les anthères conditionnées au mannitol ou fraîchement ramassées sont délicatement excisées à partir de la partie inférieure (jusqu'à 0,5 cm), les anthères sont broyées séparément dans un homogénéiseur contenant 5 ml d'un milieu MMC. La suspension de microspores est filtrée à travers un tamis dont la taille des pores est de 200 µm ; la suspension est centrifugée à 100 tpm pendant 5 minutes. Les culots ont été lavés à deux reprises dans un milieu MMC et finalement suspendus dans du MMC à une densité de 10 000/ml.

La viabilité des microspores a été évaluée par coloration au carmin acétique à 2 %. Un total de 300 microspores a été compté au hasard afin de calculer la viabilité des microspores. Les suspensions de microspores sont alors déposées sur un milieu solide MS à des concentrations différentes de sucre et d'hormones de croissance.

Le saccharose a été utilisé seul à 3-6 % ou en combinaison avec du fructose et du glucose. Les régulateurs de croissance tels que le 2, 4-D, NAA et la kinétine ont été utilisés à des concentrations différentes allant de 0,1 mg/l à 0,25 mg/l de 2, 4-D et NAA et 0,5 mg/l de BA et de Kinétine, aussi bien seuls qu'en combinaisons. Le pH du milieu a été ajusté à $5,6 \pm 1$ et gélifié avec 0,6 % de gélose (Hi-media, Inde). Les cultures ont été maintenues à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dans le noir pendant 15 jours, elles ont été ensuite soumises à 16 heures de rayonnement de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dans une pièce de culture fermée à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et 60 - 65 % d'humidité relative.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les microspores viables ont un cytoplasme dense et des noyaux proéminents dont la teinte est sombre alors que les microspores mortes sont écrasées avec le cytoplasme détruit (figs. 1, 2). Le pourcentage de viabilité initial des microspores isolées est considérablement différent entre les deux cultivars. Les microspores isolées à partir d'anthères fraîches sont plus viables que celles obtenues des anthères conditionnées au mannitol. Chez le cultivar S1, la viabilité est de $69,12 \pm 3,72$ % pour les cultures de microspores provenant de chatons frais et $61,35 \pm 9,12$ % pour les chatons conditionnés

au mannitol. Chez S799, la viabilité des microspores est de $47,27 \pm 6,25 \%$ et $32,18 \pm 4,21 \%$ sur des chatons frais et traités au mannitol (Tableau I). La légère différence en ce qui concerne la viabilité initiale entre les microspores fraîches et conditionnées est probablement due au stress causé par le mannitol ainsi que l'a noté Gustafson et coll., (1995). Le stress lié au pré-traitement tel que le froid et le traitement par la température, est utilisé afin d'induire l'embryogénèse de la microspore chez les anthères (Nitsch, 1977; Osolnik et coll., 1993). Jain et coll. (1996) ont remarqué que le pré-traitement des anthères du mûrier à 4°C pendant 24 heures est bénéfique pour induire plus d'embryons. Le pré-conditionnement au mannitol agit en tant que substitut au traitement par le froid chez les cultures de microspores (Roberts-Oehlshlager et Dunwell, 1990). Notre étude a aussi confirmé les effets bénéfiques du conditionnement au mannitol sur l'embryogénèse car un accroissement considérable de la formation pro-embryons a été observé chez les microspores conditionnées dans du mannitol bien qu'initialement, la viabilité des microspores était réduite en raison du pré-traitement au mannitol.

Le gonflement des microspores a été observé après 24 heures d'inoculation. La viabilité des microspores est affectée par la concentration et la combinaison des sucres, car à une faible concentration, le gonflement des microspores se fait plus rapidement. Dans 3-4 % de saccharose, 50 % des microspores viables gonflent 24 heures et commencent à éclater après deux jours d'inoculation. Dans 6 % de sucre, aussi bien de saccharose seul ou en combinaison, les microspores commencent à se diviser en 24 heures après inoculation. Environ 30-40 % des microspores sont bicellulaires après 3 jours dans 6 % de sucre (Fig. 3). En une semaine, certaines des cellules bicellulaires se développent jusqu'à se transformer en structures tetra-cellulaires (Fig. 4). Le pourcentage de telles structures est plus élevé sur le milieu contenant du saccharose en combinaison avec du fructose et du glucose (Tableau II). Des embryoides globulaires (Fig. 5) et allongés (Fig. 6) sont observés après 2 semaines. Les microspores gonflées en présence de 2, 4-D se divisent dans toutes les directions et se développent en masses indifférenciées de cals (Fig. 7). Les cals sont de couleur verte et compacts ; ils développent des racines après transfert sur du milieu contenant du NAA (Fig. 8). L'analyse des chromosomes du bout de la racine confirme une haploïdie (Fig. 9).

Les résultats suggèrent que les fortes concentrations en sucre sont essentielles pour maintenir un potentiel osmotique adéquat dans le milieu et permettre une division et un développement corrects des microspores.

À une faible concentration de sucre, on observe une viabilité faible à cause du potentiel osmotique faible du milieu. Jain et coll. (1996) ont aussi montré de tels effets bénéfiques d'une concentration plus forte en sucre sur les cultures d'anthères du mûrier. Des résultats similaires ont été notés concernant d'autres plants (Zhou et coll., 1991 ; Ball et coll., 1992). Le remplacement partiel du saccharose par d'autres sucres s'est avéré avantageux dans l'induction de l'embryogénèse. Le meilleur résultat a été obtenu avec le milieu contenant les trois sources de carbone (saccharose, fructose et glucose) à différent taux. Ogure (1989) a montré qu'en ce qui concerne la culture des fleurs de mûriers, le fructose et glucose sont de meilleurs sources de carbone que le saccharose. L'augmentation de la formation d'embryons due au remplacement du saccharose par d'autres sucres a été observée pour d'autres récoltes (Orshinsky et coll., 1990; Zhou et coll., 1991).

La proportion et la nature des hormones présentes dans le milieu sont le facteur décisif le plus important pour le développement des embryoides. La présence de 2, 4-D a un effet inhibiteur sur l'embryogénèse. À cause de son effet puissant, il induit des cals pour toutes les concentrations et les combinaisons (Tableau III). D'un autre côté, le NAA en combinaison avec le BA donne les meilleurs résultats. La combinaison hormonale la plus efficace pour la formation d'embryoides chez le mûrier est de 0,15 mg/l NAA et 2 mg/l BA. La kinétine n'a pas beaucoup d'effet sur la division et le développement des microspores. Shoukang et coll., (1987) a découvert que BA est la meilleure cytokinine pour l'embryogénèse des anthères du mûrier. Jain et coll. (1996), ont remarqué que des faibles taux de NAA et BA sont efficaces pour l'induction d'embryons à partir de cals d'anthères. Les résultats de notre recherche confirment aussi ces travaux. De façon similaire, un nombre plus élevé

d'embyoïdes a été obtenu chez S799 (43.28 ± 8.90) par comparaison avec S1 (11.23 ± 3.89) (Tableau III). Cela révèle clairement l'influence génotypique sur l'embryogenèse chez le mûrier.

Notre étude suggère donc clairement la possibilité d'utiliser une culture de microspores pour développer des plantes haploïdes chez le mûrier. L'effet du génotype sur la culture de microspores suggère qu'un protocole général pour la culture de microspores peut ne pas convenir à tous les génotypes car il y a une variabilité génétique considérable entre les génotypes du mûrier tropical et tempéré. L'information générée dans cette recherche par rapport à l'effet du sucre, de l'hormone et des acides aminés est importante pour le développement d'un protocole reproductible afin d'obtenir des plantes haploïdes chez le mûrier.

EFFECT OF CORTISONE ON THE ECONOMIC PARAMETERS OF THE SILKWORM, *B. MORI* L.

K.S. GOUDAR & B.B. KALIWAL

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwad 580 003, India.

The effect of topical application with cortisone on economic parameters was analyzed following treatment of last larval stadium. The treated larvae showed significantly increased larval weight along with other enhanced larval, cocoon and adult parameters. This suggests that cortisone can be used effectively for commercial silkworm rearing. The larval period was significantly increased in all the treated groups with increased filament length, weight and denier in all the treated groups. Female and male cocoon weight, shell weight and its shell ratio, moth emergence percentage, ovariole length, eggs per ovariole, fecundity and hatching percentage were unaffected when compared with the corresponding parameters of the carrier control group. This suggest that cortisone in addition to affecting larval growth, also affect silk crop.

Keywords: Cortisone, Economic parameters, *B. mori*.

INTRODUCTION

Since the initial study of Mordue, (1967) the effect of mammalian corticosteroids on insect growth, development and puffing patters has been extensively investigated (Sang, 1968 : Smith *et al.*, 1968 ; Rosinski *et al.*, 1978 ; Gawienowski *et al.*, 1987). In the recent article, the physiological effect of several glucocorticoids on mung bean seedling (*Phaseolus aureus* Roxb.) was demonstrated to enhance the plant growth (Genus, 1980). However, the treatment with glucocorticoids is not unusual as insects and their relatives are phylogenetically closer to mammals than are plants. In fact, cortisol therapy has been shown to increase the mite (*D. brevis*) population in human skin (Sato *et al.*, 1965).

The precise mechanism of action of exogenous glucocorticoids in insects is still obscure, although number of earlier studies have shown that glucocorticoids affect growth, development, protein catabolism, free amino acids as well as production of larger amounts of uric acid (Mordue, 1967 ; Rosinski *et al.*, 1978 ; Gawienowski *et al.*, 1987). Rosinski *et al.*, (1978) have reported that the early age larvae shows more response than that of late age larvae. The pathway by which corticosteroids act is also determined. It may be by a general direct affect upon body cells, by regulation of the organs of internal secretions (i.e. endocrine glands) or both (Rosinski *et al.*, 1978). Thus it seems that the mechanism of action of corticosteroids on insects may be dependent on the time of its administration, age and also on developmental status of experimental animal. However, there are no reports on the effect of cortisone on the economic parameters of the silkworm, *B. mori*. Hence, the present investigation was undertaken in the multivoltine silkworm, *B. mori* to know the effect of cortisone on economic parameters.

MATERIALS AND METHODS

The disease free layings (DFLS) of multivoltine cross breed (PM × NB₁₈) silkworm were obtained from grainage centre Rayapur, Dharwad, Karnataka and reared in the laboratory by improved methods

of silkworm rearing technique (Krishnaswami, 1978). The larvae were maintained on fresh mulberry leaves (K₂) and the fifth stadium larvae were divided into five experimental groups including controls and every group consists of uniformly weighed larvae in five replications of 20 worms. The cortisone procured from M/s Sigma Laboratories Pvt. Ltd. Bombay. It was dissolved in small quantity of acetone and diluted to form 10, 20 and 30 µg/ml by adding distilled water. Each larva was topically applied with one of the three doses of cortisone at alternate day. At each application 5 ml of solutions was used to treat 100 larvae. The carrier control was topically applied with acetone and normal control did not receive any treatment.

The larval, cocoon and adult parameters were recorded separately. The larval and silk gland weight were measured before commencement of spinning. The larval duration was recorded from the day of hatching till the completion of the spinning. The cocoon parameters such as cocoon weight and shell weights were measured on the 5th day after the completion of the spinning activity. The filament length was measured with epprovette by reeling a single cocoon. The reeled silk was dried in hot-air oven and weight was taken in an electrical balance. The cocoon shell ratio and denier of the filament was calculated. The adult parameters such as moth emergence percentage, length of the ovariole, eggs per ovariole, fecundity and hatching percentage were recorded in the adult after mating. The cocooning, moth emergence percentage and hatching percentage were also calculated by formulas shown in the tables.

Each mean value, a record of ten worms is shown in Table I, II and III. The data collected were subjected to analysis of variance tests to find out the significance between the treated and control group (Raghva Rao, 1983). The percent values of cocoon shell ratio, cocooning percentage, moth emergence percentage and hatching percentage were transformed to sine angular values for statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the effect of cortisone on larval, cocoon and adult parameters of the silkworm, *B. mori* are summarized in Table I, II and III.

Larval duration:

The larval duration was significantly increased in all the treated groups of cortisone when compared with that of the carrier control (Table I). The significant increase in larval duration suggested that the concentration applied to the larvae may have some effect on the hormonal level, juvenile hormone and moulting hormone which control moulting and metamorphosis in insects. Similar results have been reported in *Drosophila melanogaster* where larval duration was increased 2-3 days at high cortisone concentrations (Sang, 1968).

Larval weight:

A significant increase in larval weights was seen in all cortisone treated groups when compared with that of carrier control. However, the maximum increase (14 %) was observed at doses of 20 µg/ml and 30 µg/ml (Table I). The significant increase in the larval weight might be due to the prolongation of larval feeding period by delaying the pupation, since, the increase in the larval weight is preceded by the increase in the larval period. The significant increase in larval body weight was also observed in *Oncopeltus fasciatus* and *D. brevis* by administration of glucocorticoids (Gawienowski *et al.*, 1987 ; Sato *et al.*, 1965). Therefore similar stimulatory effect could also have taken place in the body weight gain of *B. mori* by the cortisone treatment.

Table I. Effect of cortisone on the larval parameters of the silworm, *B. mori*.Tableau I. Effet de la cortisone sur les paramètres larvaires du ver à soie, *B. mori*.

Treatment	Dose µg/ml	Larval duration (h)	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Cocooning percentage (%)
Traitement	Dose µg/ml	Durée larvaire (h)	Poids larvaire (g)	Poids de la glande séricigène (g)	Filage du cocon (%)
Cortisone	10	646.4* (102)	3.274* (111)	1.265 (100)	95.0 77.08**/ (101)
Cortisone	20	655.0* (103)	3.349* (114)	1.325 (105)	95.2 77.34** (101)
Cortisone	30	667* (105)	3.371* (114)	1.363* (108)	96.0 78.46** (102)
Carrier Control Témoin Excipient	acetone	630 (100)	2.935 (100)	1.256 (100)	93.8 75.58** (100)
Normal Control Témoin Normal		628.6 (99)	2.886 (98)	1.238 (98)	93.0 74.66** (99)
		(S)	(S)	(S)	(NS)
SEm±		3.017	0.131	0.046	1.479
CD at 5 % / IC à 5 %		6.185	0.258	0.092	3.032

* = Significant / Significatif

** = Angular transformed values / Valeurs angulaires transformées

SEm± = Standard Error mean / Ecart-type

CD = Critical Difference / Différence critique

NS = Non Significant / Non Significatif

S = Significant / Significatif

Percent increase / decrease over that of carrier controls in parentheses / Pourcentage d'accroissement / baisse par rapport aux témoins entre parenthèses.

$$\text{Cocooning percentage} = \frac{\text{Number of cocoons formed}}{\text{Total number of larvae at kept}} \times 100$$

$$\text{Pourcentage de filage de cocons} = \frac{\text{Nombre de cocons formés}}{\text{Nombre total de larves}} \times 100$$

Table II. Effect of cortisone on cocoon parameters of the silkworm, *B. mori*.
Tableau II. Effet de la cortisone sur les paramètres du cocon du ver à soie, *B. mori*.

Treatment		Female/Femelle			Male/Mâle			Filament length (mts)	Filament weight (g)	Denier
		Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)			
Traitement		Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Poids du filament (g)	Titre
Cortisone	10	1.670	0.297	18.00	1.563	0.279	18.04	702.66*	0.264*	3.389*
		(95)	(102)	25.10**	(97)	(104)	25.10**	(102)	(114)	(112)
Cortisone	20	1.709	0.289	17.16	1.461	0.278	19.14*	726.66*	0.303*	3.760*
		(97)	(100)	24.43*	(91)	(103)	25.92**	(106)	(131)	(124)
Cortisone	30	1.672	0.288	17.40	1.600	0.281	17.77	745.33*	0.316*	3.815*
		(95)	(99)	24.65**	(100)	(104)	24.88**	(108)	(137)	(126)
Carrier control	acetone	1.749	0.289	16.58	1.600	0.268	16.93	685.00	0.230	3.021
Témoin porteur	acétone	(100)	(100)	23.97**	(100)	(100)	24.27**	(100)	(100)	(100)
Normal control	-	1.770	0.285	16.29	1.548	0.273	17.77	660.00*	0.213*	2.907*
Témoin normal		(101)	(98)	23.73**	(96)	(101)	24.88**	(96)	(92)	(96)
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(S)	(S)	(S)
SEm±		0.105	0.014	0.810	0.140	0.018	0.880	6.190	0.004	0.027
CD at 5 %/IC à 5 %		0.207	0.027	1.589	0.275	0.036	1.725	13.310	0.008	0.059

$$\text{Female/male cocoon shell ratio} = \frac{\text{Cocoon shell weight (g)}}{\text{Cocoon weight (g)}} \times 100$$

$$\text{Denier} = \frac{\text{Single cocoon filament weight (g)}}{\text{Cocoon weight (g)}} \times 9000$$

$$\text{Richesse soyeuse femelles/mâles} = \frac{\text{Poids de la coque (g)}}{\text{Poids du cocon (g)}} \times 100$$

$$\text{Titre} = \frac{\text{Poids d'un filament de cocon (g)}}{\text{Longueur d'un filament de cocon (m)}} \times 9000$$

* = Significant increase / decrease at 5 %. Accroissement / diminution significatifs à 5 %.

** = Angular transformed values / Valeurs angulaires transformées. SEm± = Standard Error mean / Ecart-type. CD = Critical Difference / Différence critique. NS = Non Significant / Non Significatif. S : Significant / Significatif. Percent increase / decrease over that of the carrier controls in parentheses. Pourcentage d'accroissement / diminution par rapport aux témoins entre parenthèses.

Table III. Effect of cortisone on the larval parameters of the silkworm, *B. mori*.Tableau III. Effet de la cortisone sur les paramètres larvaires du ver à soie, *B. mori*.

Treatment	Dose µg/ml	Moth emergence (%)	Length of the ovariole	Eggs per ovariole (No.)	Fecundity (No.)	Egg hatching percentage
Traitement	Dose µg/ml	Pourcentage d'émergence de papillons (%)	Longueur des ovarioles (mm)	Nombre d'oeufs par ovariole	Fécondité (Nbre)	Pourcentage d'éclosion
Cortisone	10	88.4 70.09** (100)	130 (100)	89.5 (98)	708.8 (97)	90.2 71.76** (100)
Cortisone	20	88.8 70.45** (100)	135 (103)	92.75 (101)	714.0 (98)	90.2 71.76** (100)
Cortisone	30	89.2 70.81** (100)	140 (107)	92.6 (100)	731.0 (100)	91.2 72.74** (101)
Carrier control <i>Témoin porteur</i>	acetone	88.4 70.09** (100)	130 (100)	91.2 (100)	724.0 (100)	90.2 71.76** (100)
Normal control <i>Témoin normal</i>	-	88.0 69.73** (99)	130 (100)	90.2 (98)	721.4 (99)	89.4 71.00** (99)
		(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
SEm±		1.449	2.087	1.754	6.625	0.507
CD at 5 % / IC à 5 %		2.971	4.092	3.439	13.582	1.040

**= Angular transformed values / valeurs angulaires transformées. SEm±= Standard Error mean/Ecart-type. CD= Critical Difference / Différence Critique. NS= Non Significant / Non Significatif. S= Significant / Significatif. Percent increase/decrease over that of carrier controls in parentheses./Pourcentage d'accroissement/diminution par rapport aux témoins entre parenthèses.

Moth emergence percentage = $\frac{\text{Number of moths emerged}}{\text{Number of cocoons kept}} \times 100$

Hatching percentage = $\frac{\text{Total number of eggs hatched}}{\text{Total number of eggs laid}} \times 100$

Pourcentage d'émergence de papillons = $\frac{\text{Nombre de papillons émergés}}{\text{Nombre de cocons gardés}} \times 100$

Pourcentage d'éclosion = $\frac{\text{Nombre total d'oeufs éclos}}{\text{Nombre total d'oeufs pondus}} \times 100$

Silk gland weight:

The wet weight of the silk gland was significantly increased in 30µg/ml when compared with that of carrier control (Table I). The significant increase in silk gland weight might be due to the response of the silk gland at high hormone concentration, since the cortisone regulates the puffing pattern of the salivary gland chromosomes in *Drosophila melanogaster* (Smith, *et al.*, 1968 ; Sang, 1968).

Cocooning percentage:

The cocooning percentage was not shown any significant change in all the treated groups of cortisone when compared with that of carrier control (Table I). This indicates that the larvae did not show any mortality at their larval stage and used concentrations are allowance limits and have not adversely affected the cocooning percentage.

Cocoon weights and its shell weights:

There was no significant change in the female and male cocoon weight and its shell weight in all the treated groups of cortisone when compared with that of carrier control (Table II). The increase/decrease in female and male cocoon shell ratio is given in the table II.

Filament length, weight and denier:

A significant increase in the filament length, weight and denier were obtained in all the treated groups of cortisone when compared with that of carrier control (Table II). A maximum filament length, weight and denier was obtained with 30µg/ml cortisone treated group.

Moth emergence percentage:

There was no significant change in the moth emergence percentage in all the treated groups of cortisone when compared with that of carrier control (Table III). This indicates that at these concentrations cortisone has no toxic effect on the cocoon crop.

Ovariole length, eggs per ovariole and fecundity:

There was no significant change in ovariole length, eggs per ovariole and fecundity in all the treated groups when compared with that of carrier control (Table III). Similar results were obtained after the treatment with cortisone in *Drosophila melanogaster* (Smith *et al.*, 1968).

Hatching percentage:

There was no significant change in hatching percentage in all the treated groups when compared with that of carrier control (Table III). This indicates that at these concentrations cortisone has no toxic effect on the embryo. Similar results were obtained after the treatment with cortisone in *Drosophila melanogaster*, where egg viability was unaffected (Smith *et al.*, 1968).

Conclusion or consideration on the action of corticosteroids:

The effect of corticosteroids (either added to the diet, injected or topically applied) have been investigated in insects, but this led to conflicting results. Corticosteroids inhibited growth of *Schistocerca gregaria* (Mordue, 1967) and *Tenebrio molitor* (Mordue, 1967 ; Rosinski *et al.*, 1978). These experiments were repeated by Jones and Reynolds (1980) who observed no effect in *Schistocerca gregaria* or *Manduca sexta*. Finally, it was recently shown that cortisol significantly increased the growth rate in *Oncopeltus fasciatus* (Gawienowski *et al.*, 1987). Of course, it is difficult to draw clear conclusion from these data, but it seems of great interest to mention here in each case the results agree the four working hypothesis of the different authors viz.,

(1) Corticosteroids inhibit insect growth, probably as a result of increased protein catabolism and reduced protease production by the midgut (Mordue, 1967).

(2) Corticosteroids prolong the moulting cycle of the larvae, probably as a result of hormone action on the neurosecretory systems of insects (Rosinski *et al.*, 1978).

(3) Corticosteroids have probably no effect in insects, since insects probably lack receptors for compounds and they do not produce themselves (Jones and Reynolds, 1980).

(4) Corticosteroids stimulate plant growth, so why not insect growth too (Gawienowski *et al.*, 1987). In our study it is interesting to note that the corticosteroid enhance the silk yield like larval weight, silk gland weight, filament length, filament weight and denier. However, larval duration was significantly increased. Additional studies using other races of silkworm and variety of exercise paradigms will be necessary to determine the physiological significance and generalizability of the present results.

REFERENCES

- GAWIENOWSKI A.M., KESSLER L.J., TAN B.S., YIN C.M. (1987) Glucocorticoids action on the growth and development of insects. *Life Sci.*, 40, 1725-1730.
- GENUS J.M.C. (1980) Aspects and prospects of plant growth regulators. B. Jeffcoat, Vangage press Oxfordshire, England pp. 209-217.
- JONES C.A., REYNOLDS S.E. (1980) A re-investigation of the effects of cortisol on growth in insects. *J. Insect physiol.*, 26, 601-605.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bul. No. 2, Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore, 1-24.
- MORDUE W. (1967) Cortisol and growth in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23, 721-727.
- RAGHAVA RAO D. (1983) Statistical techniques in agricultural and biological research Oxford and IBH publishing Co., New Delhi.
- ROSINSKI G., PILE L., OBUCHOWICZ L. (1978) Effect of hydrocortisone on the growth and development of larvae *Tenebrio molitor*. *J. Insect physiol.*, 24, 97-99.
- SANG J.H. (1968) Lack of cortisone inhibition of chromosomal puffing in *Drosophila melanogaster* *Experientia*, 24, 1064.
- SATO Y., HIGUCHI H., SAITO U.C. (1965) Cortisol therapy increase the mite (*D. brevis*) population in human skin. *Jap. J. Dermatology*, 75, 331.
- SMITH P.D., KOENIG P.B., LUCKHESI J.C. (1968) Inhibition of development in *Drosophila* by cortisone. *Nature*, 217, 1286.

EFFET DE LA CORTISONE SUR LES PARAMETRES ECONOMIQUES CHEZ LE VER A SOIE, *B. MORI* L.

K. S. GOUDAR & B. B. KALIWAL

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwad 580 003, Inde.

L'effet de l'application topique de cortisone sur les paramètres économiques a été analysé après le traitement du dernier âge larvaire. Les larves traitées présentent un poids supérieur et une amélioration des autres paramètres larvaires. Cela suggère que la cortisone peut être utilisée efficacement pour l'élevage commercial du ver à soie. La période larvaire augmente significativement dans tous les groupes traités ainsi que la longueur, le poids et le titre du filament. Le poids du cocon mâle et femelle, le poids de la coque et la richesse soyeuse, le pourcentage d'émergence des papillons, la longueur de l'ovariole, le nombre d'œufs par ovariole, la fécondité et le pourcentage d'éclosion ne sont pas affectés quand on les compare avec les paramètres correspondants chez le groupe témoin. Nos résultats suggèrent que la cortisone a non seulement des effets sur la croissance larvaire mais aussi sur la production de soie.

INTRODUCTION

Depuis la première étude de Mordue (1967), l'effet des corticostéroïdes de mammifères sur la croissance et le développement des insectes et sur les "puffs" chromosomiques a été largement étudié (Sang, 1968 ; Smith et coll., 1968 ; Rosinski et coll., 1978 ; Gawienowski et coll., 1987). Dans un article récent, l'effet physiologique de plusieurs glucocorticoïdes sur l'augmentation de la croissance de la pousse de soja (*Phaseolus aureus* Roxb.) a été démontré (Genus, 1980). Cependant, le traitement avec des glucocorticoïdes n'est pas inhabituel étant donné que les insectes et leurs parents sont plus proches phylogénétiquement des mammifères que les plantes. En fait, il a été montré que la thérapie au cortisol augmente la population en acariens (*D. brevis*) de la peau chez l'être humain (Sato et coll., 1965).

Le mécanisme précis de l'action des glucocorticoïdes exogènes chez les insectes demeure obscur, bien que le nombre d'études précédentes montre que les glucocorticoïdes ont un effet sur la croissance, le développement, le catabolisme des protéines, les acides aminés libres tout comme sur la production d'acide urique en plus grande quantité (Mordue, 1967 ; Rosinski et coll., 1978 ; Gawienowski et coll., 1987). Rosinski et coll., (1978) ont signalé que la larve du premier âge répond de manière plus importante que la larve du dernier âge. La voie par laquelle agissent les corticostéroïdes a aussi été établie. Cela peut être par un effet général direct sur les cellules corporelles, par la régulation des organes à sécrétions internes (c'est à dire des glandes endocrines) ou par les deux (Rosinski et coll., 1978). Ainsi, il semble que le mécanisme d'action des corticostéroïdes sur les insectes dépend de la période d'administration, de l'âge et aussi de l'état de développement de l'animal expérimental. Cependant, il n'existe pas de rapports sur l'effet de la cortisone sur les paramètres économiques chez le ver à soie, *B. mori*. Cette étude a donc été entreprise chez le ver à soie polyvoltin, *B. mori*, pour connaître l'effet de la cortisone sur les paramètres économiques.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines (DFLs) d'une lignée croisée polyvoltine $\times$ bivoltine (PM $\times$ NB₁₈) de ver à soie ont été obtenues auprès du centre de grainage de Rayapur, Dharwad, Karnataka et élevées en laboratoire en utilisant des techniques d'élevage améliorées (krishnaswami, 1978). Les larves ont été maintenues sur des feuilles fraîches de mûrier (K₂) et les larves du 5ème âge ont été divisées en cinq groupes expérimentaux comprenant des témoins et chaque groupe constitué de cinq répétitions de 20 vers à soie de poids uniforme. La cortisone a été obtenue auprès des 'M/s Sigma Laboratories pvt. Ltd.', Bombay. Elle est dissoute dans une petite quantité d'acétone et diluée pour obtenir des concentrations de 10, 20 et 30 $\mu\text{g/ml}$ en ajoutant de l'eau distillée. On applique de manière topique une des trois doses de cortisone à chaque larve un jour sur deux. A chaque application, 5 ml de solution est utilisée pour traiter 100 larves. On applique de l'acétone au témoin avec excipient et le témoin normal ne reçoit aucun traitement.

Les paramètres larvaires, du cocon et de l'adulte sont enregistrés séparément. Les poids de la larve et de la glande séricigène sont mesurés avant le début du filage. La durée larvaire est mesurée à partir du jour de l'éclosion jusqu'à l'achèvement du filage. Les paramètres du cocon tels que les poids du cocon et de la coque sont mesurés le 5ème jour après l'achèvement de l'activité de filage. La longueur du filament est mesurée avec une éprouvette en dévidant un seul cocon. La soie dévidée est séchée dans un four à air chaud et le poids mesuré sur une balance électronique. La richesse soyeuse du cocon et le titre du filament sont calculés. Les paramètres de l'adulte tels que le pourcentage d'émergence des papillons, la longueur de l'ovariole, le nombre d'oeufs par ovariole, la fécondité et le pourcentage d'éclosion sont enregistrés après l'accouplement. Le coconage, le pourcentage d'émergence des papillons et le pourcentage d'éclosion sont calculés d'après les formules présentées dans les tableaux.

Chaque valeur moyenne correspondant à dix vers est présentée dans les tableaux I, II et III. Les données recueillies sont soumises à des tests d'analyse de variance entre les groupes traités et le groupe témoin (Raghawa Rao, 1983). Les valeurs de la richesse soyeuse, du pourcentage de coconage, du pourcentage d'émergence des papillons et du pourcentage d'éclosion sont transformées en valeurs angulaires pour l'analyse statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'effet de la cortisone sur les paramètres larvaires, du cocon et de l'adulte du ver à soie, *B. mori*, sont résumées dans les tableaux I, II et III.

Durée larvaire :

La durée larvaire augmente de manière significative chez tous les groupes traités à la cortisone par comparaison au témoin avec excipient (Tableau I). L'augmentation significative de la durée larvaire suggère que la concentration appliquée aux larves a peut-être un effet sur le niveau hormonal, de l'hormone juvénile et de l'hormone de mue qui contrôlent la mue et la métamorphose chez les insectes. Des résultats similaires ont été signalés chez *Drosophila melanogaster* où la durée larvaire est augmentée de 2 à 3 jours avec des concentrations élevées de cortisone (Sang, 1968).

Poids larvaire :

On observe une augmentation significative des poids larvaires chez tous les groupes traités par comparaison au témoin avec excipient. L'augmentation maximale (14 %) est observée pour les doses de 20 $\mu\text{g/ml}$ et de 30 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau I). L'augmentation significative du poids larvaire est peut-être due à la prolongation de la période de nourrissage larvaire qui retarde la nymphose, étant donné que l'augmentation du poids larvaire est précédée par l'augmentation de la période larvaire. L'augmentation significative du poids larvaire a aussi été observée chez *Oncopeltus fasciatus* et *D.*

brevis avec l'administration de glucocorticoïdes (Gawienowski et coll., 1987 ; Sato et coll., 1965). Nous observons un effet stimulant similaire chez *B. mori* avec le traitement à la cortisone.

Poids de la glande séricigène :

Le poids frais de la glande séricigène augmente de manière significative avec 30 µg/ml (Tableau I). L'augmentation significative de poids de la glande séricigène est peut-être due à la réponse directe de la glande séricigène à une concentration élevée d'hormone, étant donné que la cortisone régule les "puffs" chromosomiques des chromosomes de la glande salivaire chez *Drosophila melanogaster* (Smith et coll., 1969 ; Sang, 1968).

Pourcentage de coconage :

Le pourcentage de coconage ne présente pas de changement significatif chez tous les groupes traités à la cortisone par comparaison au témoin (Tableau I). Cela indique que les larves ne présentent pas de mortalité accrue au stade larvaire et que les concentrations utilisées sont dans les limites de tolérance et n'ont pas d'effet adverse sur le pourcentage de coconage.

Poids du cocon et de la coque :

Il n'y a pas de changement significatif de poids pour le cocon femelle et mâle et pour le poids de la coque chez tous les groupes traités à la cortisone par rapport au témoin (Tableau II). L'augmentation et la baisse de la richesse soyeuse chez le mâle et la femelle sont présentées dans le tableau II.

Longueur, poids et titre du filament :

On obtient une augmentation significative de la longueur, du poids et du titre du filament chez tous les groupes traités à la cortisone par comparaison au témoin avec excipient (Tableau II). On obtient une longueur, un poids et un titre maximum pour le groupe traité avec 30 µg/ml de cortisone.

Pourcentage d'éclosion des papillons :

Il n'y a pas de changement significatif en ce qui concerne le pourcentage d'éclosion des papillons chez tous les groupes traités à la cortisone par rapport au témoin (Tableau III). Cela indique qu'à ces concentrations, la cortisone n'a pas d'effet toxique sur la récolte de cocons.

Longueur de l'ovariole, nombre d'oeufs par ovariole et fécondité :

Il n'y a pas de changement significatif pour la longueur de l'ovariole, le nombre d'oeufs par ovariole et la fécondité chez tous les groupes traités par comparaison au témoin (Tableau III). Des résultats similaires ont été obtenus après le traitement par la cortisone chez *Drosophila melanogaster* (Smith et coll., 1968).

Pourcentage d'éclosion :

Il n'y a pas de changement significatif du pourcentage d'éclosion chez tous les groupes traités par comparaison au témoin (Tableau III). Cela indique qu'à ces concentrations la cortisone n'a pas d'effet toxique sur l'embryon. Des résultats similaires sont obtenus après le traitement à la cortisone chez *Drosophila melanogaster*, où la viabilité des oeufs n'est pas touchée (Smith et coll., 1968).

Conclusion ou considération sur l'action des corticostéroïdes :

L'effet des corticostéroïdes ajoutés à l'alimentation, injectés ou appliqués de manière topique a déjà été étudié chez les insectes, mais cela a entraîné des résultats contradictoires. Les corticostéroïdes inhibent la croissance de *Schistocerca gregaria* (Mordue, 1967) et *Tenebrio molitor* (Mordue, 1967 ; Rosinski et coll., 1978). Ces expériences ont été répétées par Jones et Reynolds (1980) qui n'ont observé aucun effet chez *Schistocerca gregaria* ou *Manduca sexta*. Enfin, il a été récemment démontré que le cortisol augmente le taux de croissance de manière significative chez *Oncopeltus fasciatus*

(Gawienowski et coll., 1987). Bien-sûr, il est difficile de tirer une conclusion claire de ces données, mais il semble très intéressant de préciser ici dans chaque cas, les résultats qui sont en accord avec les quatre hypothèses de travail des différents auteurs, c'est à dire :

(1) Les corticostéroïdes inhibent la croissance de l'insecte, ce qui résulte probablement de l'augmentation du catabolisme des protéines et de la diminution de la production de protéase par l'intestin moyen (Mordue, 1967).

(2) Les corticostéroïdes prolongent le cycle de mue des larves, ce qui est probablement le résultat d'une action hormonale sur les systèmes neurosécréteurs des insectes (Rosinski et coll., 1978).

(3) Les corticostéroïdes n'ont probablement pas d'effet chez les insectes, étant donné que les insectes manquent de récepteurs pour ces composés et qu'ils ne les produisent pas eux-mêmes (Jones et Reynolds, 1980).

(4) Les corticostéroïdes stimulent la croissance des plantes et donc pourquoi pas la croissance des insectes (Gawienowski et coll., 1987). Dans notre étude il est intéressant de noter que les corticostéroïdes améliorent le rendement en soie tout comme le poids larvaire, le poids de la glande séricigène, la longueur du filament, le poids du filament et le titre. Cependant, la durée larvaire augmente de manière significative. Des études supplémentaires utilisant d'autres races de ver à soie seront nécessaires pour déterminer la signification physiologique et la possibilité de généraliser les résultats obtenus.

COMPARATIVE PERFORMANCE OF ROBUST AND PRODUCTIVE BIVOLTINE HYBRIDS OF *BOMBYX MORI* L. UNDER HIGH TEMPERATURE CONDITIONS

N. SURESH KUMAR, C. M. KISHOR KUMAR, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, M. RAMESH BABU & R. K. DATTA

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.

In India, efforts over a decade to improve the quality of raw silk had resulted in the development of many productive and qualitatively superior bivoltine hybrids. But these productive hybrids are not conducive to rear in the hot climatic conditions prevailing in India, particularly in summer. This has led to the development of robust hybrids tolerant to high temperature. In the present study attempts were made to compare the performance of the productive hybrids and the robust hybrids both at high temperature ($36 \pm 1^\circ \text{C}$) and high humidity ($80 \pm 5\% \text{RH}$) and room temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) and normal humidity ($65 \pm 5\% \text{RH}$). The effect of temperature and high humidity was found to be highly significant ($P < 0.05$) with regard to all the five parameters considered for the study for both the productive as well as the robust hybrids. The deleterious effect of high temperature and humidity on all the five parameters was more pronounced in the productive hybrids than the robust hybrids. The overall analysis of the data clearly indicates that the productive hybrids are more vulnerable to high temperature and humidity than the robust hybrids and thereby affecting not only the survival rate but also other cocoon characters as well.

Keywords: Productive hybrids, robust hybrids, high temperature, high humidity.

INTRODUCTION

In India, concerted efforts of research and development contributed to the increased raw silk production, but the quality of raw silk is yet to match the international standard. Bulk production of quality silk is a must to achieve a quantum jump in exports of silk fabrics and also to save foreign exchange. This has necessitated the evolution of better bivoltine strains/hybrids. A few bivoltine strains/hybrids developed earlier are popular in the field. However, for the last two decades, the cocoon shell ratio (SR%) in bivoltine hybrids remained constant at 20%. Owing to poor quality of leaf and rearing management, the SR% realised in commercial cocoon market is around 18%. This has made bivoltine crops unattractive to the farmers and reelers especially when they get similar silk content for polyvoltine x bivoltine hybrids. Keeping this in view, many productive and qualitatively superior bivoltine hybrids have been developed at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore by utilising Japanese commercial hybrids as breeding resource material (Basavaraja *et al.*, 1995). Systematic evaluation of over 187 hybrids had resulted in the identification of seven productive bivoltine hybrids. The full potentiality of the new highly productive bivoltine hybrids will be realised only when optimum inputs to mulberry and good rearing management is assured. Therefore, these hybrids have been identified for rearing in favourable months (August to February) in South India. However, the hot climatic conditions of tropics prevailing particularly in summer are not conducive to rear high yielding (productive) bivoltine hybrids. This has led to the development of four compatible hybrids for rearing throughout the year by utilising Japanese thermotolerant hybrids as breeding

resource material (Datta *et al.*, 1997). In the present study, performance of the productive hybrids was compared with the robust hybrids under high temperature conditions.

MATERIALS AND METHODS

Seven productive hybrids namely, CSR2 x CSR4, CSR2 x CSR5, CSR3 x CSR6, CSR13 x CSR5, CSR12 x CSR6, CSR16 x CSR17 and CSR20 x CSR29 along with the control hybrid, KA x NB4D2 and the four robust hybrids namely, 1HT x 2HT, 1HT x 4HT, 3HT x 2HT and 3HT x 4HT were subjected for the study.

The silkworm rearing was carried out following the standard method (Krishnaswami, 1978) with recommended temperature and RH conditions (Young silkworm: 27 - 28° C and RH: 85-90 %. Late age: 24 - 25° C and RH: 70 - 75%) till second day of 5th instar. Four hundred larvae per bed were counted and retained after third moult. On the third day of the 5th instar, 100 larvae were separated from each bed for the thermal treatment. The remaining larvae served as control at 25 ± 1° C. For the thermal exposure, the larvae were kept in plastic trays and reared in SERICATRON (Environment chamber with precise and automatic control facilities for uniform maintenance of temperature and humidity) at 36 ± 1° C and RH 80 ± 5% from the third day of 5th instar and fed with fresh mulberry leaves twice a day. The thermal exposure was given every day for 6 hours duration between 10: 00 hours and 16: 00 hours till spinning. After thermal treatment, the larvae were shifted to 25 ± 1° C daily till spinning. Spinning temperature was maintained at 24 - 25° C and RH 65%. The survival rate was calculated as the number of healthy (live) pupae to the number of larvae treated both at 25 ± 1° C and 36 ± 1° C respectively. Cocoon harvest was done on the 7 th day and assessment was made on the subsequent day. The overall rearing performance of the productive and robust hybrids both at 36 ± 1° C and 25 ± 1° C was statistically analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of high temperature and high humidity was found to be highly significant ($P < 0.05$) with regard to all the five parameters considered for the study for both the productive as well as the robust hybrids (Table I). The deleterious effect of high temperature and humidity on all the five parameters was more pronounced in the productive hybrids than robust hybrids. The analysis on mean performance irrespective of the temperature difference of both the productive and robust hybrids indicate that all the traits were highly significant ($P < 0.05$) except for yield by weight for 10 000 larvae and cocoon weight. The analysis on the interaction of the two different temperature, and humidity on these hybrids indicate that except for the trait cocoon weight, all the other traits were highly significant ($P < 0.05$). At 36 ± 1° C and 80 ± 5% RH all the four robust hybrids showed higher pupation rate than the productive hybrids with a maximum of 76.5% for 3HT x 2HT and a minimum of 17.2% for the control hybrid KA x NB4D2. At 25 ± 1° C and 65 ± 5% RH there was no significant difference with a maximum of 94.7% for CSR12 x CSR6 and minimum of 88.0% for 1HT x 4HT. Similarly, at 36 ± 1° C and 80 ± 5% RH the yield by weight per 10,000 larvae of robust hybrids were higher than the productive hybrids with a maximum of 10.88 kg for 1HT x 2HT and a minimum of 2.43 kg for the control hybrid KA x NB4D2. On the other hand, at 25 ± 1° C and 65 ± 5% RH, the yield per 10,000 larvae were higher for the productive hybrids than the robust hybrids with a maximum of 20.46 kg for CSR12 x CSR6 and a minimum of 15.54 kg for 1HT x 2HT. Though there was a decline in the cocoon weight of all the hybrids at 36 ± 1° C when compared to 25 ± 1° C, the interaction was non significant. As far as shell weight is considered the decline was more pronounced in productive hybrids than the robust hybrids with a maximum decline noticed in the case of the productive hybrid, CSR12 x CSR6 from 51.0 cg at 25 ± 1° C to 27.0 cg at 36 ± 1° C. A similar trend was also observed in the case of shell ratio and in particular for the productive hybrid, CSR12 x CSR6 where it declined from 24.1% at 25 ± 1° C to 20.0% at 36 ± 1° C.

Table I. Comparative performance of robust and productive hybrids at two different temperatures ($36 \pm 1^\circ \text{C}$ & $25 \pm 1^\circ \text{C}$)**Tableau I. Etude comparative des performances des hybrides robustes et productifs à deux températures différentes ($36 \pm 1^\circ \text{C}$ & $25 \pm 1^\circ \text{C}$)**

SL. No	Hybrids	Yield/10,000 larvae by No		Yield/10,000 larvae by wt. (kg)		Cocoon weight (g)		Shell weight (cg)		Shell ratio (%)	
No. de série	Hybrides	Rendement pour 10000 larves en nbre		Rendement pour 10000 larves en poids (kg)		Poids du cocon (g)		Poids de la coque (cg)		Richesse soyeuse (%)	
		T: 36±1°C H:80 ± 5%	T: 25±1 °C H: 65 ± 5%	T: 36±1°C H:80 ± 5%	T: 25±1°C H: 65 ± 5%	T: 36±1°C H:80 ± 5%	T: 25±1°C H: 65 ± 5%	T: 36±1°C H:80 ± 5%	T: 25±1°C H: 65 ± 5%	T: 36 ±1°C H:80 ± 5%	T: 25±1°C H: 65 ± 5%
Robust/Robustes											
1	1HT x 2HT	6890	9103	10.88	15.54	1.396	1.794	28.6	39.3	20.5	21.9
2	1HT x 4HT	5770	8797	8.63	16.23	1.442	1.836	30.3	40.5	21.0	22.1
3	3HT x 2HT	7654	9298	10.58	15.87	1.348	1.718	27.9	37.4	20.7	21.7
4	3HT x 4HT	6236	9083	9.06	16.46	1.426	1.820	29.7	40.9	20.9	22.5
Productive / Productifs											
5	CSR2 x CSR4	3864	9209	5.79	18.54	1.458	2.004	31.8	46.8	21.7	23.4
6	CSR2 x CSR5	4273	8980	5.82	17.84	1.362	1.972	29.9	46.6	22.0	23.6
7	CSR3 x CSR6	3781	9053	5.51	18.44	1.316	2.022	27.8	49.3	21.1	24.4
8	CSR13 xCSR5	3153	8967	4.78	19.23	1.312	2.104	28.0	50.4	21.3	24.2
9	CSR12 x CSR6	4008	9470	6.07	20.46	1.338	2.118	27.0	51.0	20.0	24.1
10	CSR16 x CSR17	3608	9340	5.53	20.14	1.516	2.134	31.7	49.2	20.9	23.0
11	CSR20 x CSR29	4191	9270	6.52	18.56	1.498	2.058	33.0	47.7	22.0	23.3
12	KA x NB4D2	1716	8997	2.43	19.40	1.412	2.112	27.4	42.9	19.3	20.4
	CD at 5% (Temp)	568		1.344		0.074		1.709		0.292	
	D. C. à 5 % pour la temp.										
	CD at 5% (Hybrids)	1392		NS		NS		4.188		0.714	
	D.C. à 5 % pour les hybrides										
	CD at 5% (Temp x Hyb.)	1968		4.657		NS		5.923		1.01	
	D.C. à 5 % (Temp x hyb)										

CD: Critical Difference / **D.C. :** Différence critique.

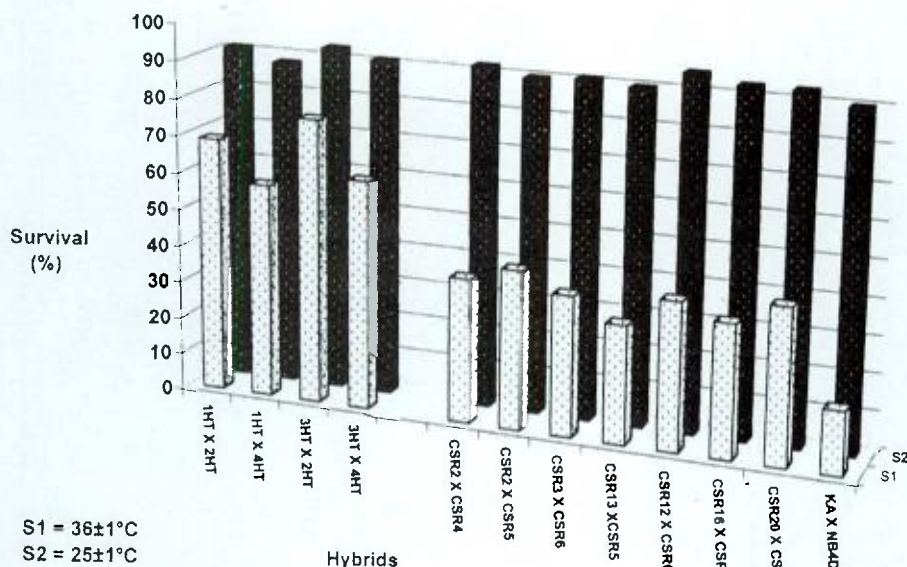


Fig. 1. Comparative survival of robust and productive hybrids at two different temperatures.

Fig. 1. Etude comparative de la survie des hybrides robustes et productifs à deux températures différentes.

The overall analysis of the data clearly indicates that the productive hybrids are more vulnerable to high temperature and humidity than the robust hybrids as evident from the Fig. 1 and thereby affecting not only the survival rate but also other cocoon characters as well. The results of the present study are in concurrence with the observations made by Shibukawa (1965) that the lines selected at high temperature and high humidity perform better than the lines selected under normal temperature and humidity. Geneticists and breeders of all the sericultural countries have experienced the influence of environment during the process of breeding. The effect of temperature on silkworm was reported earlier by many scientists (Takeuchi *et al.*, 1964; Ohi and Yamashita, 1977; Huang *et al.*, 1979; He and Oshiki, 1984). In a series of experiments, Kato *et al.*, (1989) observed that the resistance to high temperature is a heritable character and it may be possible to breed silkworm races tolerant to high temperature. Later on, Falconer (1990) in his review on the environmental effect on insects concluded that the performance of an insect was improved by selection in the environment in which it is subsequently exploited. While attempting to synthesise high temperature resistant strains, Shirota (1992) and Tazima & Ohnuma (1995) confirmed the genetical heritability nature of thermotolerance by selection based on pupation rate of silkworms reared under high temperature conditions in fifth instar. While studying the effect of high temperature ($35 \pm 1^\circ \text{C}$) on the pure races as well as the F1 hybrids between polyvoltine and bivoltine silkworm races, Suresh Kumar and Yamamoto (1995) indicated that the hybrids are more tolerant than the pure races and there was maternal effect regarding temperature tolerance as evident from the better performance of those hybrids where the female parent used was more tolerant as pure races. In India, attempts with this background had resulted in the development of the four robust hybrids (Datta *et al.*, 1997) and suggested that any study involving

temperature as one of the environmental factors and viability followed by cocoon traits is a trend setter to provide basis to formulate appropriate selection policies for required environments. The superiority of the robust hybrids in comparison to the productive hybrids could be attributed to the fact that the races performing well (surviving) in high temperature and high humidity yield better than the other breeds in normal temperature and humidity conditions. Thus it clearly depicts the genetical superiority of the robust hybrids over the productive hybrids when environment becomes hostile.

REFERENCES

- BASAVARAJA H. K., NIRMAL KUMAR S., SURESH KUMAR N., MAL REDDY N., KSHAMA GIRIDHAR, AHSAN M. M. & DATTA R. K. (1995) New productive bivoltine hybrids Indian silk 34 (2): 5 - 9.
- DATTA R. K., BASAVARAJA H. K., SURESH KUMAR N., KISHOR KUMAR C. M. & NIRMAL KUMAR S. (1997) Evolution of robust hybrids of bivoltine silkworm *Bombyx mori* L. for tropics. XVIIth Congress of the International Sericulture Commission 22 - 26 April, 1997.
- FALCONER D. S. (1990) Genet. res. 56: 57 - 70.
- HE Y. & OSHIKI T. (1984) Study on cross breeding of a robust silkworm race for summer and autumn rearing at low latitude area in China. J. Seric. Sci. Jpn. 53: 320 - 324 (In Japanese with English summary).
- KATO M., NAGAYASU K., NINAGI, O. HARA W. & WATANABE A. (1989) Study on resistance of the silkworm *Bombyx mori* to high temperature. Proc. of the 6th International Congr. of SABRAO (II) 953 - 956.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSR & TI, Bulletin No. 2, CSR & TI, Mysore. 23p.
- OHI H. & YAMASHITA (1977) On the breeding of the silkworm races J137 and C137. Bull. Sericult. Exp. Stn. 27: 97 - 139.
- SHIBUKAWA K. 1965 Acta Sericologica. 16: 1.
- SHIROTA T. (1992) Selection of healthy silkworm strain through high temperature rearing of fifth instar larvae. Reports of the Silk Sci. Res. Inst. 40: 33 - 40.
- SURESH KUMAR N. & YAMAMOTO T. (1995) Maternal effect of resistance to high temperature in F1 hybrids between polyvoltine and bivoltine silkworm race. Paper presented at the Annual conference held on 9/10 - 11 - 98 at Nigata, Japan.
- TAKEUCHI Y., KOSAKA T. & UEDA S. (1964) The effects of rearing temperature upon the amount of food ingested and digested. Technical Bull. of Seric. Exp. Stn. 84: 1 - 12.
- TAZIMA Y. & OHNUMA A. (1995) Preliminary experiments on the breeding procedure for synthesising a high temperature resistant commercial strain of the silkworm, *Bombyx mori* L. Silk Sci. Res. Inst. Japan 43: 1 - 16.

ETUDE COMPARATIVE DES PERFORMANCES D'HYBRIDES ROBUSTES ET PRODUCTIFS DE *BOMBYX MORI* L. SOUS DES CONDITIONS DE TEMPERATURES ELEVEES

N. SURESH KUMAR, C. M. KISHOR KUMAR, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY,
M. RAMESH BABU & R. K. DATTA

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Inde.

En Inde, les efforts consacrés à l'amélioration de la qualité de la soie grège, depuis plus d'une décennie, ont eu pour résultat le développement de plusieurs hybrides bivoltins productifs et de qualité supérieure. Cependant, le climat chaud de l'Inde, particulièrement en été ne favorise pas l'élevage de ces hybrides productifs. Ceci a conduit au développement d'hybrides robustes, pouvant tolérer des températures élevées. Dans l'étude actuelle, des tentatives ont été entreprises afin de comparer les performances des hybrides productifs et des hybrides robustes à la fois sous des conditions de températures élevées ($36 \pm 1^\circ \text{C}$) et d'humidité importante ($80 \pm 5\%$ d'humidité relative) ainsi qu'à une température ambiante de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et une humidité relative, de $65 \pm 5\%$, dites normales. Les effets de la température et de l'humidité élevées sont hautement significatifs ($P < 0.05$), pour les cinq paramètres considérés dans l'étude des hybrides robustes et productifs. Les effets nuisibles des hautes températures et de l'humidité élevée sur les cinq paramètres sont plus prononcés chez les hybrides productifs que chez les hybrides robustes. L'analyse globale des données indique clairement que les hybrides productifs sont plus vulnérables aux températures et à l'humidité élevées que les hybrides robustes. Par conséquent, le taux de survie et les autres caractéristiques des cocons sont également affectés.

INTRODUCTION

En Inde, bien que des efforts concertés de recherche et de développement aient contribué à l'accroissement de la production de soie grège, la qualité de la soie grège n'atteint pas encore les normes internationales. La production massive de soie de qualité est une nécessité pour réussir un saut quantique dans l'exportation des tissus de soie, mais également afin de préserver les échanges internationaux. Ceci a nécessité l'obtention de meilleures souches/hybrides bivoltins. Quelques uns de ces souches/hybrides bivoltins sont renommés. Cependant, au cours des vingt dernières années, la richesse soyeuse (SR %) chez les hybrides bivoltins est demeurée constante à 20 %. En raison de la pauvreté de la qualité des feuilles et de la gestion des élevages, la richesse soyeuse obtenue sur le marché du cocon commercial ne dépasse pas les 18 %. C'est pour cette raison que les élevages bivoltins n'attirent pas les producteurs et les filateurs surtout lorsqu'ils peuvent obtenir une teneur en soie similaire, à partir d'hybrides polyvoltins x bivoltins. C'est pourquoi plusieurs hybrides bivoltins productifs et de qualité supérieure ont été développés au Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore en utilisant des hybrides commerciaux japonais comme matériel source pour le breeding (Basavaraja et coll., 1995). L'évaluation systématique de plus de 187 hybrides a abouti à l'identification de sept hybrides bivoltins productifs. L'entière potentialité des nouveaux hybrides bivoltins hautement productifs sera obtenue seulement lorsque seront optimisées la culture des mûriers et la gestion des élevages. Par conséquent, l'élevage de ces hybrides ne peut se faire que pendant les mois favorables (d'août à février), en Inde du sud. Les conditions de climat tropical, surtout en été ne

favorisent pas l'élevage d'hybrides bivoltins hautement productifs. Ceci a conduit au développement de quatre hybrides compatibles avec un élevage se faisant tout au long de l'année, en utilisant des hybrides japonais thermotolérants comme matériel source pour le breeding (Datta et coll., 1997). Dans l'étude actuelle, la performance des hybrides productifs a été comparée à celle des hybrides robustes sous des conditions de températures élevées.

MATERIELS ET METHODES

Sept hybrides productifs, à savoir CSR2 x CSR4, CSR2 x CSR5, CSR3 x CSR6, CSR13 x CSR5, CSR12 x CSR6, CSR16 x CSR17 et CSR20 x CSR29, ainsi que l'hybride témoin, KA x NB4D2 et quatre hybrides robustes à savoir 1HT x 2HT, 1HT x 4HT, 3HT x 2HT et 3HT x 4HT ont été mis à l'étude.

L'élevage des vers à soie a été mené selon la méthode standard (Krishnaswami, 1978) avec les conditions de température et d'humidité relative (RH) recommandées (Jeunes vers : 27-28° C et RH : 85-90 % ; vers plus âgés : 24-25° C et RH : 70-75 %) jusqu'au deuxième jour du 5ème âge larvaire. Quatre cents larves par caissette furent comptées et conservées après la troisième mue. Le troisième jour du cinquième stade, 100 larves furent séparées de chacune des caissettes pour le traitement thermique. Les larves restantes servirent de témoins à $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Pour l'exposition thermique, les larves furent conservées dans des plateaux en plastique et élevées en SERICATRON (Chambre environnementale dont les facilités de contrôles précis et automatiques servent à maintenir une température et une humidité uniformes) à une température de $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et une humidité relative de $80 \pm 5\%$, à partir du troisième jour du cinquième âge. Ils ont été nourris de feuilles de mûriers fraîches deux fois par jour. L'exposition thermique fut réalisée chaque jour pendant une durée de 6 heures entre 10 : 00 et 16 : 00 heures, jusqu'au filage. Après le traitement thermique, les larves furent quotidiennement exposées à une température de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, jusqu'au filage. La température pendant le filage fut maintenue à 24-25° C et l'humidité relative à 65 %. Le taux de survie fut calculé en comptant le nombre de chrysalides vivantes par rapport au nombre de larves traitées à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ respectivement. La cueillette des cocons fut exécutée le septième jour et l'évaluation le jour suivant. La performance d'élevage globale des hybrides robustes et productifs à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ fut analysée statistiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les effets d'une température et d'une humidité élevées sont fortement significatifs ($P < 0.05$), lorsque l'on prend en compte les cinq paramètres considérés pour l'étude des hybrides robustes et productifs (Tableau I). L'effet délétère des températures élevées et de l'humidité sur les cinq paramètres est plus prononcé chez les hybrides productifs que chez les hybrides robustes. L'analyse de la performance moyenne sans tenir compte de la différence de température chez les hybrides robustes et productifs indique que toutes les caractéristiques sont hautement significatives ($P < 0.05$) sauf celles du rendement en poids de cocons pour 10 000 larves et du poids des cocons. L'analyse de l'interaction entre les deux températures et les deux taux d'humidité, indique que toutes les caractéristiques sont significativement différentes ($P < 0.05$) sauf celle qui concerne le poids des cocons. A une température de $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et une humidité relative de $80 \pm 5\%$, les quatre hybrides robustes présentent un taux de pupaison plus élevé. Le taux maximum de 76.5 % est atteint par l'hybride 3HT x 2HT et le taux minimum de 17,2 %, par l'hybride témoin KA x NB4D2. A $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et à une humidité relative de $65 \pm 5\%$, il n'y a pas de différence significative, avec un maximum de 94,7 % pour CSR12 x CSR6 et un minimum de 88 % pour 1HT x 4HT. De manière similaire, à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et à $80 \pm 5\%$ d'humidité relative, le rendement en poids de cocons pour 10 000 larves d'hybrides robustes est plus élevé que celui des hybrides productifs, avec un maximum de 10,88 kg pour 1HT x 2HT et un minimum de 2,43 kg pour les hybrides témoins KA x NB4D2. En outre, à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et à

$65 \pm 5\%$ d'humidité relative, le rendement pour 10 000 larves est plus important pour les hybrides productifs que pour les hybrides robustes avec un maximum de 20,46 kg pour CSR12 x CSR6 et un minimum de 15,54 kg pour IHT x ZHT. Bien qu'il y ait une baisse du poids des cocons chez tous les hybrides à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, lorsqu'on les compare aux larves traitées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, l'interaction n'est pas significative. En ce qui concerne le poids des coques, la baisse est plus prononcée chez les hybrides productifs que chez les hybrides robustes, avec un déclin maximum chez l'hybride productif CSR12 x CSR6, qui chute de 51 cg à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, à 27 cg à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Une tendance comparable fut également observée en ce qui concerne la richesse soyeuse, en particulier chez les hybrides productifs, CSR12 x CSR6 pour qui le taux passa de 24,1 % à 20 % lorsque le traitement changea de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ à $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

L'analyse globale des données indique clairement que les hybrides productifs sont plus vulnérables aux températures élevées et à l'humidité que les hybrides robustes, comme l'indique la Figure 1 ; ceci affecte donc le taux de survie mais également les autres caractéristiques. Les résultats de l'étude actuelle sont en désaccord avec les observations faites par Shibukawa (1965), qui fit remarquer que les lignées sélectionnées sous de hautes températures et une humidité élevée se comportent mieux que les lignées sélectionnées sous des températures et une humidité normales. Les généticiens et les éleveurs de l'ensemble des pays producteurs de soie ont fait l'expérience de l'influence de l'environnement pendant le processus de breeding. L'effet de la température sur les vers à soie a déjà été précédemment rapporté par plusieurs scientifiques (Takeuchi et coll., 1964 ; Ohi et Yamashita, 1977 ; Huang et coll., 1979 ; He et Oshiki, 1984). Lors d'une série d'expériences, Kato et coll., (1989) observèrent que la résistance aux températures élevées est une caractéristique héréditaire et qu'il est possible d'élever des races de vers à soie tolérantes aux températures élevées. Ultérieurement, Falconer, dans sa revue sur les effets de l'environnement sur les insectes (1990), conclut que la performance d'un insecte est améliorée par la sélection de l'environnement dans lequel il sera exploité ultérieurement. Tandis qu'ils tentaient d'obtenir des souches résistantes aux températures élevées, Shirota (1992) et Tazima & Ohnuma (1995) confirmèrent la nature héréditaire de la thermotolérance, en basant la sélection de vers à soie sur des conditions de hautes températures pendant l'élevage du cinquième stade et en utilisant comme caractère sélectionné le taux de pupaison. Alors qu'ils étudiaient les effets de températures élevées ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) sur les races pures et sur les hybrides F1 entre races polyvoltines et bivoltines de vers à soie, Suresh Kumar et Yamamoto (1995) indiquèrent que les hybrides sont plus tolérants que les races pures et qu'il existe un effet maternel en ce qui concerne la tolérance à la température, ainsi que l'indiquent les meilleures performances des hybrides où le parent femelle utilisé était plus tolérant. En Inde, les tentatives entreprises dans ce contexte, ont eu pour résultat le développement de quatre hybrides robustes (Datta et coll., 1997) et ont suggéré que toute étude comportant la température comme un des facteurs environnementaux, la viabilité puis les caractéristiques des cocons serait une nouveauté qui fournirait des bases pour une politique de sélection appropriée dans des environnements requis. La supériorité des hybrides robustes par rapport aux hybrides productifs pourrait être attribuée au fait que les races survivant bien aux températures et à une humidité élevées ont un meilleur rendement sous des conditions de températures et d'humidité normales. Ceci démontre clairement la supériorité génétique des hybrides robustes sur les hybrides productifs lorsque l'environnement devient hostile.

CLIMATIC VARIABILITY IN NINE LOCATIONS OF NORTH EAST INDIA AND THEIR EFFECT ON COCOON PRODUCTIVITY OF MUGA SILKWORM (*ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD)

M. CHAUDHURI, S. S. SINGH, B. DAS, N. J. DHAR, B. BASUMATARY, D. GOSWAMI, K. DAS, A. BARAH, M. SAHU, L. N. KAKOTY, T. MANDAL & S. N. CHATTERJEE

Muga Seed Development Project, Central Silk Board, Guwahati, India.

*Production of Muga - the finest non - mulberry silk of the world - is confined to the Northeastern part of India only. Seasonal and environmental variations were reported to influence a great deal on muga worms, *Antheraea assama*, Westwood, as they are reared outdoor. Thus an array of biotic and abiotic factors work upon the larvae throughout the rearing period, influencing the survival as such and resultant yield of cocoons. The present study is based on muga rearing, conducted in 2 crop seasons namely April - May and Sept - Oct in 9 ecozones for 5 years between 1993 and 1997. For the first time multiple regression analyses were performed taking 9 abiotic factors including 6 climatic factors as independent variables against cocoon productivity and larval mortality as dependent variables to ascertain how these biotic parameters are expressed under the influence of abiotic factors. It is emerged from the analyses that out of 9 abiotic factors only total rainfall and minimum relative humidity have significant effect on cocoon productivity ($R^2 = 0.233$) while only total rainfall influences significantly on larval mortality ($R^2 = 0.117$). Cocoon productivity is negatively correlated with rainfall whereas minimum relative humidity is positively correlated. The larval mortality is positively correlated with total rainfall. However, certain aspects of outcome of the analyses suggested the involvement of other factors playing a role in the expression of both the biotic parameters. The identification of these parameters highlight the need for developing indoor rearing technology for critical period and further need for assessing the scope of rescheduling the Muga crop rearing is discussed.*

Keywords: Muga, multiple regression.

INTRODUCTION

Antheraea assama Westwood, commonly termed as "muga" in India, is one of the sericigenous lepidopteran insects commercially exploited since centuries (Wardle, 1881; Watt, 1883) in the North-eastern part of India, which serves as an exclusive ecological niche for this species (Chowdhury, 1970; Subba Rao, 1983). It is considered as a semi wild species as it is reared outdoor on trees in the same way as is done in cases of Chinese and Japanese oak tasar, i.e., *Antheraea pernyi* and *A. yamamai*. However, this insect shows a peculiar habit of coming down along the trunk of the food trees when larvae mature and according to traditional practices, mature worms are hand-picked and put indoor in the mountages made of dried leaves, preferably of *Persea bombycina*. The primary food plants of *A. assama*, *Persea bombycina* (*Machilus bombycina*) and *Litsaea polyantha* (*L. monopetala*), colloquially known as "som" and "soalu" respectively, are predominantly distributed over the northeastern zone of Indian subcontinent and congruent eastern hilly track.

Being reared outdoor, the larvae of *A. assama* like those of *A. pernyi*, *A. yamamai* and *A. mylitta* (tropical tasar), have adjusted themselves to certain degree against all kinds of selection forces of nature, like fluctuation of temperature, humidity, rainfall as well as attacks of pests, predators and infections with fungal, bacterial and viral pathogen (Crotch, 1956; Yamasaki, 1959).

The species under commercial exploitation does not show any diapause either in egg or in pupal stage resulting in at least six broods round the year. However, of the number of cycles reared, two cycles, reared during April - May and Sept - Oct, just before the commercial crop, bear greater importance as the output of these crops is considered as seed crops. Thus the success or failure of these become a determining factor for availability of seeds for succeeding commercial rearing (Sahu *et al.*, 1998). The success of these crops assures greater multiplication rate of commercial crops which in turn affects the yield of muga silk yarn. As such seed crops provides additional return to the farmers, even to the tune of 7.6 times more. Cocoons used as "seed cocoons" fetch at least double the price than that realised from selling reeling cocoons.

Though it is well known that *A. assama* is subjected to various natural vagaries as reared outdoor, much work has not been done on analysing the contribution of selection forces operating on it due to exposure of various climatic factors coupled with pests, predators and micro organisms.

There has been substantial development in the area of analytical methodology to quantify and describe genotype and environment interaction in multi - environmental experiments (Cooper and Delacy, 1994). Multiple regression analysis satisfies the need of a number of independent variables suspected to affect the dependent variable (Gomez and Gomez, 1976). The present report is an attempt to examine the effect of climatic factors of the nine centres and performance of two crops during Summer (April - May) and Autumn (Sept - Oct) for 5 consecutive years (1993 and 1997). The objective is to identify the most important factor(s) contributing to cocoon production and larval mortality, so that a proper strategy for crop schedule bypassing the most critical climatic factor can be worked out.

MATERIALS AND METHODS

For the present analysis, nine locations in the North-eastern India (Fig. 4 and Table I) under Muga Seed Development Project were chosen where muga silkworms had been reared for basic silkworm seed multiplication in two seasons during summer (April - May) and Autumn (Sept - Oct) for the period between 1993 and 1997. These two crop seasons correspond to the local commercial crop seasons too. Data were collected on 11 parameters as described in Table II.

STATISTICAL ANALYSIS

For multiple regression analysis:

Multiple regression analyses were done with different combination of independent abiotic parameters and only two dependent biotic parameters as below:

- i) Cocoon productivity per laying laid by a single mother moth was considered as dependent variable against 9 independent variables, of which 6 were climatological factors.
- ii) Larval mortality was considered as dependent variable against 9 independent variables, of which 6 were climatological factors.

Analyses were carried out using COSTAT Programme of Cohort Software, Berklay, CA 94701 in a Pentium PC.

For descriptive statistics covering all the aforementioned parameters, Microsoft Excel Version 5.0 package was used.

Entry for a particular crop for any year in any location for which all the requisite information was not available adequately, was not considered.

RESULTS

The estimates of descriptive statistics are elucidated in Table III. Data given in the table throw light on the following variations:

Locational variation

As evident from Table I (cited in Materials and Methods), all the areas have acidic soil. Nine locations can broadly be divided into 3 groups: Plains with little elevation about 60 m and the other with 300 to 600 m of elevation. The former group includes stations at Lahdoigarh and North Lakhimpur in upper Assam, Hahim in lower Assam, Adokgiri in East Garo Hills and Jia in Arunachal Pradesh. The other group includes 4 stations at Nongpoh in Khasi Hills, Rompara and Mendipathar in East Garo Hills and Tura in West Garo Hills. Altogether, they represent the major seed producing areas in the dispersal zone of muga culture.

Temperature variation

From the Table cited above it is evident that the mean maximum temperature was observed to be 29.96 ± 1.94 (SD) and the range was 9.1 between 25.5 and 34.6°C while the minimum temperature was 22.7 ± 2.33 (SD) with the range being 10.7 between 17.7 and 28.4°C . Effort was also made to evaluate the range of temperature in 2 crop seasons in 9 locations. This shows that though seasons represent early Summer and Autumn, the variability in maximum temperature ($28.4 - 34.6^\circ\text{C}$; range: 6.2) in 9 locations in crop 1 was almost the same as that observed in crop 2 ($26.0 - 33.4^\circ\text{C}$; range: 7.4). The range of variation for minimum temperature is 5.0 ($18.3 - 22.32$) in crop 1 against 7.5 ($17.7 - 25.2$) in crop 2. However, it is apparent from the column graph in Fig. 1 a, b, that difference between maximum and minimum temperature was highest in location 7, i.e. in Jia, Arunachal Pradesh. Locationwise, seasonal temperature varies between 34.6°C and 18.3°C during crop season 1 (April - May) and both these temperatures were observed in location 7 i.e. in Jia, Arunachal Pradesh. Likewise crop season 2 (Sept - Oct) went through a maximum of 33.4°C which was again witnessed in Jia, Arunachal Pradesh and a minimum of 17.7°C - observed in Nongpoh, Meghalay.

Humidity variation

Table III also reveals that the mean maximum RH was $86.1\% \pm 6.17$ (SD) and the range was 33.6 between 61.5 and 95.1% while the minimum RH was observed to be $69.4\% \pm 7.82$ (SD) with the range being 37.0 between 44.5 and 81.4%. While evaluating the range of RH in 9 locations, it was found that the variability in maximum RH ($91.3 - 80.0\%$, range: 11.3) in 9 locations in crop 1 was slightly higher against that observed in crop 2 ($95.1 - 86.3\%$, range: 8.8). The variability in case of minimum RH ($66.9 - 44.5$, range: 22.5) in crop 1 (Fig. 2a) was much higher ($81.0 - 63.9$, range: 17.1) in crop 2. However, it is apparent from the column graph in Fig. 2 a, b, that differences between maximum and minimum RH was highest in location 9 (North Lakhimpur, Assam).

Variation in rainfall and no. of rainy days

From Table III it is evident that mean rainfall during the period under study was $436.6 \text{ mm} \pm 448.05$ (SD) and the range was 2662.5 between 63.5 mm and 2726.0 mm, while mean no. of rainy days was $20 \text{ days} \pm 6.7$ (SD), the range being 37 with a minimum of 3 days and maximum of 40 days of rains. These scores were prevalent for a crop in a specific location in a specific year in particular. It is also evident from the column graph in Fig. 3 a, b, that the distribution pattern of rains is highly variable in 2 seasons in different locations over the years, irrespective of the number of days it rained. The most (1913.5 mm) and the least (163.3 mm) rains received during crop season 1 were at locations 9 and 3, that is in North Lakhimpur, Assam and in Nongpoh, Meghalay. But it rained longest (for 30 days) in Jia, Arunachal Pradesh and lowest (for 16 days) at location 5 i.e. in Adokgiri. Likewise, during crop season 2, the most (481.3 mm) and the least (200.3 mm) rains received in locations 8

(Hahim, Assam) and 1 (Tura, Meghalay). But it rained longest (26 days) and least (7 days) in locations 5 (Adokgiri) and 3 (Nongphoh), both situated in Meghalay.

Evaluation on cocoon productivity

With a view to ascertain the contribution of 9 abiotic factors (detailed in Table I in Materials and Methods) towards the expression of biotic factor, cdfI was considered as the dependent variable in this analysis. The realised multiple regression coefficient (R^2) is 0.302, significance of which is confirmed by the significance of regression index 2832.7 ($F = 2.98$). Of the 9 abiotic factors, the contribution of 2 showed significance as apparent from the significance of F values. These are total rainfall and location (Table IV).

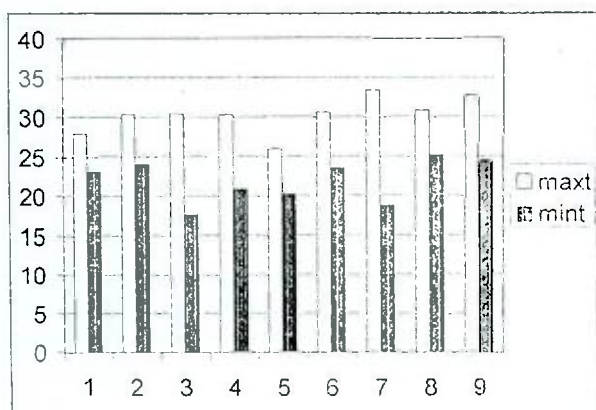
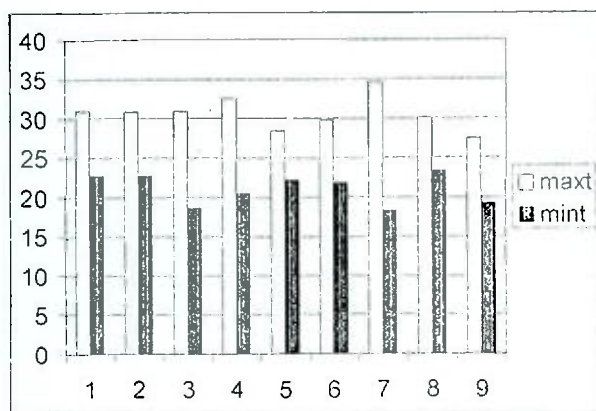


Fig. 1a, b, Maximum and minimum temperature expressed in °C as observed in 9 locations for 5 years in April - May (1a) and Sept - Öct (1b) crop seasons. Maximum temperature is represented by open column and minimum temperature is represented by shadowed column.

Fig. 1a, b, Températures maximum et minimum exprimées en °C, observées sur les 9 sites pendant 5 ans, lors des saisons de récolte d'avril à mai (Fig. 1a) et de septembre à octobre (Fig. 1b).

Horizontal axis stands for 9 locations and vertical axis stands for temperature.
L'axe horizontal représente les 9 sites et l'axe vertical, la température.

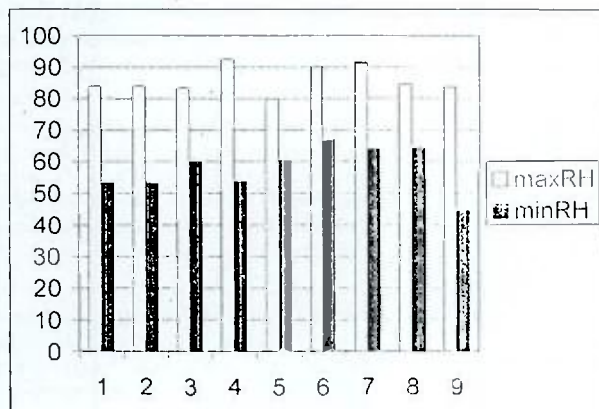


Fig. 2a, b. Maximum and minimum relative humidity expressed in RH% as observed in 9 locations for 5 years in April- May (2a) and Sept- Oct (2b) crop seasons. Maximum relative humidity is represented by open column and minimum relative humidity is represented by shadowed column.

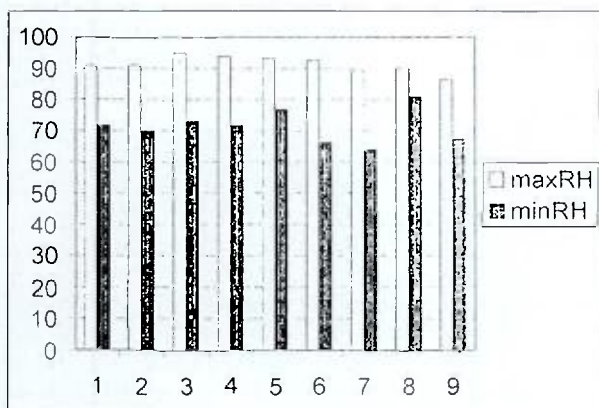


Fig. 2a, b. Humidité relative maximum et minimum exprimée en % d'humidité relative, observée sur les 9 sites pendant 5 ans, durant les saisons de récolte d'avril à mai (Fig. 2a) et de septembre à octobre (Fig. 2b). L'humidité relative maximum est représentée par une colonne vide et l'humidité relative minimum, par une colonne grisée.

Horizontal axis stands for 9 locations and vertical axis stands for relative humidity.

L'axe horizontal représente les 9 sites et l'axe vertical, l'humidité relative.

From the regression analysis, the regression equation worked out as follows and on the basis of this regression equation computer programme again worked out the expected values of cocoon productivity and residuals. The evaluation of difference between the observed and expected values of dependent variable (expressed as residuals) was also done. The residuals were very wide. Out of 72 entries it appeared that only 8 cases (11.1%) showed low deviation i.e. the residuals of less than -5 to $+5$. But 23.6% residuals ranged from -25 to -55 and 27.8% residuals ranged from 6 to 24 .

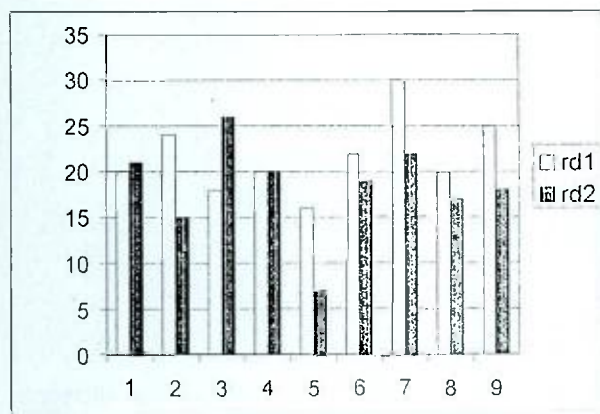


Fig. 3a, Number of rainy days expressed in days for both crop seasons; 1 (April - May: open column) and 2 (Sept - Oct: shadowed column) as observed in 9 locations for 5 years.

Fig. 3a, Nombre de jours de pluie exprimés en jour pour les deux saisons de récolte ; 1 (d'avril à mai : colonne vide) et 2 (de septembre à octobre : colonne grisée), observés sur les 9 sites pendant 5 ans;

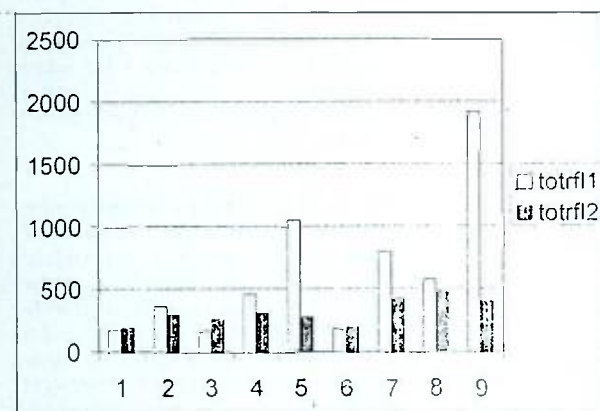


Fig. 3b, Total rainfall expressed in mm for 2 crop seasons namely April - May (open column) and Sept - Oct (shadowed column) as observed in 9 locations for 5 years.

Fig. 3b, Précipitations totales exprimées en mm pendant les 2 saisons de récolte, à savoir d'avril à mai (colonne vide) et de septembre à octobre (colonne grisée).

Horizontal axis stands for 9 locations and vertical axis stands for total rainfall.
L'axe horizontal représente les 9 sites et l'axe vertical, les précipitations totales.

To comprehend whether the non climatic abiotic factors masked the significance of other climatic factors, further analysis was done by stepping down the multiple regression after eliminating 2 significant factors as given in Table V. Then the R^2 value changed from 0.302 to 0.233. The first component of the regression equation -19.13 changed to -10.72 , the values for rainy day increased from -0.06 to 0.14 . Similarly, the regression equation for total rainfall, maximum RH, maximum and minimum temperatures went up from 0.002 , 0.57 , -2.39 and 2.47 respectively to 0.007 , 0.79 , -4.05 and 3.38 . In cases of year and minimum RH, both decreased from -2.47 to -1.22 and 3.38 respectively.

The multiple regression analysis helped in identifying 2 climatic factors, namely total rainfall and minimum RH contributing significantly to the expression of cocoon productivity. The total rainfall is negatively correlated while minimum RH is positively correlated, meaning thereby that with decreasing total rainfall and lowering of minimum RH the value the cocoon productivity is expected to be increased. The evaluation of residuals estimated with changed regression equation still showed 34.7% deviation of the range from -6 to -55 and 48.6% deviation ranging from $+6$ to $+55$. Further, about 50% of 48.6% residuals ranged between $+25$ to $+55$ which is on much higher side.

Table I. Particulars of nine locations included in study.**Tableau I. Détails des neuf sites compris dans l'étude.**

Code no. <i>No.</i>	Centre	State <i>Etat</i>	Position <i>Situation</i>	Physiography <i>Physiographie</i>	Altitude <i>(m)</i>	Soil type <i>Type de sol</i>
1	Tura	Meghalaya	25°30'N 90°16'E	Hilly terrain <i>Collines</i>	478 m	Acidic <i>Acide</i>
2	Mendipathar	Meghalaya	25°52'N 90°38'E	Hilly terrain <i>Collines</i>	300 m	Acidic <i>Acide</i>
3	Nongpoh	Meghalaya	25°70'N 91°80'E	Hilly terrain <i>Collines</i>	600 m	Acidic <i>Acide</i>
4	Rompara	Meghalaya	25°5'N 90°30'E	Hilly terrain <i>Collines</i>	300 m	Acidic <i>Acide</i>
5	Adokgiri	Meghalaya	26°15'N 90°23'E	Hilly terrain <i>Collines</i>	66 m	Acidic <i>Acide</i>
6	Lahdoi - garh	Assam	27°16'N 94°53'E	Flat terrain <i>Terrain plat</i>	38 m	Acidic <i>Acide</i>
7	Jia	Arunachal Pradesh	28°2'N 95°8'E	Flat terrain <i>Terrain plat</i>	35 m	Acidic <i>Acide</i>
8	Hahim	Assam	26°17'N 91°38'E	Undulated upland with inselberg <i>Vallonné avec inselberg</i>	68 m	Acidic <i>Acide</i>
9	North Lakhimpur	Assam	27°13'N 94°9'E	Flat terrain <i>Terrain plat</i>	35 m	Acidic <i>Acide</i>

Evaluation on larval mortality

For ascertaining the influence of the same 9 abiotic factors (detailed in Table I in Materials and Methods) towards the expression of another biotic factor, larval mortality was considered as the dependent variable in this analysis. The multiple regression coefficient (R^2) is 0.157, which is not significant as confirmed by the regression index 636.31 ($F = 1.28$) given in the table below. Of the 9 abiotic factors, the contribution of only 1 i.e. total rainfall, showed significance as evident from the F value (0.62) shown in Table V.

Table II. Parameters scored for statistical analysis.**Tableau II. Paramètres mesurés pour l'analyse statistique.**

Parameter	Abbreviation	Unit	Remarks
<i>Paramètre</i>		<i>Unité</i>	<i>Remarques</i>
Biotic / Biotiques :			
Cocoon yield	cdfl	No	Cocoon yield/No. of eggs laid by a single mother moth
<i>Rendement en cocons</i>	<i>cdfl</i>	<i>No</i>	<i>Rendement en cocons / Nb. d'oeufs pondus par un seul papillon femelle</i>
Abiotic/Abiotiques :			
Mortality	motl	%	Larval mortality during rearing
<i>Mortalité</i>	<i>moil</i>	%	<i>Taux de mortalité des larves pendant l'élevage</i>
Location	loc		Name of locations as defined and coded in Table I.
<i>Situation</i>	<i>loc</i>		<i>Noms des sites tels qu'ils sont définis et codés dans le Tableau I.</i>
Year	yr		1993 to 1997 coded as 1 to 5
<i>Année</i>	<i>yr</i>		<i>de 1993 à 1997 codée de 1 à 5</i>
Crop season	crop		1. April - may and 2. Sept - Oct.
<i>Saison de récolte</i>	<i>récolte</i>		<i>1 : d'avril à mai et 2 : de sept. à oct.</i>
Climatological / Climatologiques :			
Maximum temperature	maxt	° C	Maximum temperature during the particular crop season
<i>Température maximum</i>	<i>maxt</i>	° C	<i>Température maximum pendant une saison de récolte donnée</i>
Minimum temperature	mint	° C	Minimum temperature during the particular crop season
<i>Température minimum</i>	<i>mint</i>	° C	<i>Température minimum pendant une saison de récolte donnée</i>
Maximum RH	maxrh	%	Maximum relative humidity during the particular crop season
<i>HR maximum</i>	<i>maxrh</i>	%	<i>Humidité relative maximum pendant une saison de récolte donnée</i>
Minimum RH	minrh	%	Minimum relative humidity during the particular crop season
<i>RH minimum</i>	<i>minrh</i>	%	<i>Humidité relative minimum pendant une saison de récolte donnée</i>

Table II. Parameters scored for statistical analysis.**Tableau II. Paramètres mesurés pour l'analyse statistique.**

Parameter	Abbreviation	Unit	Remarks
<i>Paramètre</i>		<i>Unité de mesure</i>	<i>Remarques</i>
Total rainfall	totrfl	mm	Total rainfall during the life cycle of muga worms in a particular crop season
<i>Précipitations totales</i>	<i>totrfl</i>	<i>mm</i>	<i>Précipitations totales au cours du cycle de vie des vers muga pour une saison de récolte donnée</i>
Rainy days	rd	No	No. of rainy days during the life cycle of muga worms in a particular crop season
<i>Jours de pluie</i>	<i>rd</i>	<i>No</i>	<i>Nh. de jours de pluie au cours du cycle de vie des vers muga pour une saison de récolte donnée</i>

Table III. Estimates of descriptive statistics.**Tableau III. Estimations des statistiques descriptives.**

Parameter	Mean	Standard D	Range	Minimum	Maximum
<i>Paramètre</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Ecart type</i>	<i>Fourchette</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Max. temp. <i>Temp. max.</i>	30.0	1.94	9.1	25.5	34.6
Min. temp <i>Temp. minimum</i>	22.7	2.33	10.7	17.7	28.4
Max. RH <i>Humidité relative maximum</i>	86.1	6.17	33.5	61.5	95.1
Min. RH <i>Humidité relative minimum</i>	69.4	7.82	36.9	44.5	81.4
Total rainfall <i>Précipitations totales</i>	436.6	448.05	2662.5	63.5	2726.0
Rainy days <i>Jours de pluie</i>	20.3	6.74	37.0	3.0	40.0

Table IV. Result of multiple regression analysis using cost at software as cited in Materials and Methods.**Tableau IV. Résultat de l'analyse de régression multiple à l'aide du logiciel cité dans Matériels et Méthodes.**

$$R^2 = 0.302$$

Regression equation / Equation de régression: $cdfl = -19.13 (-0.06^* rd) + (0.002^* totrf) + (0.57^* maxrh) + (-2.47^* yr) + (60.34^* crop) + (-4.46^* loc) + (0.91^* minrh) + (-2.39^* maxt) + (2.47^* mint)$

$$R^2 = 0.233$$

Stepped down equation / Equation réduite: $cdfl = -10.72 + (-0.14^* rd) + (-0.01^* totrf) + (0.79^* maxrh) + (-1.22^* yr) + (0.81^* minrh) + (-4.05^* maxt) + (3.38^* mint)$

* Implies multiplication sign / Est égal au signe de multiplication.

Source	Df	MS	F	P
Total	71			
Regression	9	2832.7	2.98	0.005**
#	7	2816.3	2.78	0.014*
Rd / Jours de pluie	1	1167.6	1.23	0.27 ns
#	1	1167.6	1.15	0.287 ns
Totrf	1	4892.7	5.15	0.027*
Précipitations totales	1	4892.7	4.84	0.031*
#	1	4892.7	4.84	0.031*
Maxrh	1	2127.6	2.24	0.14 ns
Humidité relative maximum	1	2127.6	2.10	0.15 ns
#	1	2127.6	2.10	0.15 ns
Yr / Année	1	362.4	0.38	0.54 ns
#	1	362.4	0.36	0.55 ns
Crop / Saison de récolte	1	2602.9	2.74	0.10 ns
Loc / Site	1	8747.2	9.20	0.0035**
Minrh / H. R. minimum	1	3183.5	3.35	0.072 ns
#	1	4484.3	4.43	0.039
Maxt / Temp. maximum	1	910.2	0.096	0.33 ns
#	1	3707.3	3.66	0.06ns
Mint / Temp. minimum	1	1499.8	1.58	0.21 ns
#	1	2972.2	2.94	0.09 ns
Error / Ecart	62	950.9		
#	64	1011.6		

Regression indices after eliminating crop and location in the stepped down multiple regression. / # Indices de régression après élimination des paramètres récolte et site dans l'équation réduite de régression multiple.

Df: Degree of freedom / Degré de liberté. MS: Mean of square / Carrés moyens. F: F value / seuil de F.

* Significant at 5% / Significatif au seuil de 5%. ** Significant at 1% / Significatif au seuil de 1%. P: Probability / Probabilité

Table V. Result of multiple regression analysis using cost at software as cited in Materials and Methods.

Tableau V. Résultats de l'analyse de régression multiple obtenus à l'aide du logiciel cité dans Matériels et Méthodes.

$$R^2 = 0.157$$

Regression equation / *Equation de régression* : $\text{motl} = 56.76 + (-0.05^* \text{rd}) + (0.007^* \text{totrfl}) + (-0.14^* \text{maxrh}) + (0.05^* \text{yr}) + (50.02^* \text{crop}) + (1.24^* \text{loc}) + (-0.58^* \text{minrh}) + (1.84^* \text{maxt}) + (-1.08^* \text{mint})$

$$R^2 = 0.144$$

Stepped down regression equation / *Equation de régression réduite* : $\text{motl} = 72.51 + (-0.29^* \text{rd}) + (-0.23^* \text{maxrh}) + (0.09^* \text{yr}) + (41.71^* \text{crop}) + (1.73^* \text{loc}) + (-0.64^* \text{minrh}) + (1.78^* \text{maxt}) + (-1.09^* \text{mint})$

$$R^2 = 0.117$$

Further stepped down regression equation / *2ème réduction de l'équation de régression* : $\text{motl} = 72.53 + (-0.07^* \text{rd}) + (-0.43^* \text{maxrh}) + (-0.25^* \text{yr}) + (-0.34^* \text{minrh}) + (2.59^* \text{maxt}) + (-1.60^* \text{mint})$

Source	Df	MS	F	P
Total	71			
Regression	9	636.3	1.29	0.26 ns
#	8	636.2	1.33	0.25 ns
# #	6	710.7	1.99	0.005**
Rd / <i>Jours de pluie</i>	1	30.5	0.06	0.80 ns
#	1	30.5	0.06	0.80 ns
# #	1	30.5	0.06	0.80ns
Totrfl <i>Précipitations totales</i>	1	2379.2	4.48	0.321*
Max RH / <i>H. R maximum</i>	1	165.5	0.33	0.57 ns
#	1	823.6	1.66	0.20 ns
# #	1	823.6	0.33	0.20ns
Yr / <i>Année</i>	1	1.1	0.002	0.96 ns
#	1	0.7	0.001	0.97 ns
# #	1	0.7	0.002	0.97ns
Crop / <i>Saison de récolte</i>	1	0.7	0.001	0.97 ns
#	1	106.9	0.22	0.64 ns
Loc / <i>Site</i>	1	973.8	1.97	0.17 ns
#	1	1941.6	3.92	0.05 ns
Minrh / <i>R. H. min.</i>	1	1278.1	2.58	0.11 ns
#	1	1479.8	2.99	0.09 ns
# #	1	1167.6	2.59	0.072 ns

Table V (Continued)**Tableau V (Suite)**

Source	Df	MS	F	P
Total	71			
Maxt / Temp. min.	1	613.7	1.24	0.27 ns
#	1	572.81	1.16	0.29 ns
# #	1	1574.3	1.24	0.33 ns
Mint / Temp. min.	1	284.2	0.57	0.45 ns
#	1	293.6	0.59	0.44 ns
# #	1	667.1	0.57	0.25 ns
Error	62	495.0		
#	63	494.7		
# #	65	494.6		

R. H : Relative humidity / *H.R.* : Humidité relative. * Implies multiplication sign in regression equation / est égal au signe de multiplication dans l'équation de régression.

Regression indices after eliminating total rainfall in the stepped down multiple regression. / *Indices de régression après élimination du paramètre précipitations totales dans l'équation réduite de régression multiple.*

Regression indices after eliminating total rainfall, crop and location in the further stepped down multiple regression. / *Indices de régression après élimination des paramètres précipitations totales, récolte et site dans la 2ème équation réduite de régression multiple.*

Df: Degree of freedom / *Degré de liberté.*

MS: Mean of square / *Carrés moyens.*

F: F value / *seuil de F.*

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

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

P: Probability / *Probabilité*

The residuals in this case were also very wide. Out of 72 entries it appeared that only 15 cases (20.8%) showed low deviation with residuals of less than - 5 to + 5. But out of 72 cases, 34.7% residuals ranged from - 6 to - 24, 11.1% and 18.1% residuals each belonging to the range from - 25 to - 55 and + 6 to + 24 and 15.3% residuals ranged from + 25 to + 55.

Whether the influence of total rainfall masked the significance of other climatic factors, further analysis was carried out by stepping down the multiple regression after eliminating the significant factor.

None of the factors showed any significant effect on larval mortality though the R^2 further decreased from 0.157 to 0.144. The first component of the regression equation, 56.76 changed to 72.51. The values for rainy day, crop and maximum temperature decreased from -0.055 , 50.02 and 1.84 to -0.029 , 41.71 and 1.78 respectively. But the values for maximum RH, year, location, minimum RH and temperature increased from -0.137 , 0.049 , -0.23 , -0.58 and -1.08 to -0.23 , 0.94 , 1.73 , -0.64 and -1.09 respectively.

Further stepping down of multiple regression was performed by eliminating the total rainfall along with the factors such as crop and location. Neither of the factors showed any significant effect on larval mortality but the R^2 value reduced from 0.144 to 0.117 (Table V). The first component of the regression equation being 72.51 changed nominally to 72.51. The values for rainy day, maximum RH, maximum and minimum temperature increased from -0.029 , -0.23 , 1.78 and -1.09 to -0.07 , -0.43 , 2.59 and -1.60 respectively. But the values for year and minimum RH decreased from 0.94 and -0.64 to -0.025 and -0.34 respectively.

The multiple regression analysis helped in identifying only 1 climatic factor namely total rainfall affecting significantly towards the expression of larval mortality. The total rainfall is positively correlated unravelling that with increasing total rainfall, the value the larval mortality is expected to be increased.

DISCUSSION

The result elucidated that wide variability of climatic factors are prevalent in 9 locations (Fig. 4) of the trial centres. This is particularly true for altitude, the pattern of diurnal shift for temperature range, variation of humidity, the quantum of rain as well as for number of rainy days. Nonetheless the highest variability observed was the rainfall. Data clearly highlight location 9, 5 and 7 as high rainfall zone in descending order and they are North Lakhimpur (upper Assam), Adokgiri (East Garo Hills) and Jia (Arunachal Pradesh). Thus the locations can truly be considered as good for multi-location trials. These also indicate that genetic variability might have been created by selecting genotypes under such specific abiotic climatic factors. This was also reported that in days before establishment of centralised multiplication system for basic stocks, farmers were in the habit of procuring stocks from far-off forests. This can be explained as an attempt to create genotypic variability. Even today infrastructures created under Muga Seed Development Project can be utilized as resource area as a step towards improvement of genetic material of *Antheraea assama*. Cocoon productivity in muga for seed multiplication is measured in terms of productivity potential realised from the eggs/layings laid by a particular mother moth and thus is the most important factor for both commercial and seed rearers in any crop. Comprehension of the influence of climatic factor(s) on cocoon productivity is of utmost importance. The present regression analyses are the first attempt of this kind with data of 5 years as such.

The result unravels certain important aspects with regard to the general attitude of the rearers fixing weather responsible for crop failure whatsoever. In the first analysis, 2 abiotic factors namely total rainfall and location appeared to have significant influence on cocoon productivity. Each of the 9 locations is characterised with specific climatic attributes and the significance of location on cocoon productivity is a mere reflection of the concerted effect of those attributes which obviously come next to rainfall. But even after excluding location from regression analysis only one more climatic factor i.e. minimum RH emerged to have significance and minimum RH too is the resultant effect of low rainfall.

The high residual values of cocoon productivity as well as larval mortality suggests that besides the factors considered for analysis, there may also be other factors including the human factor which



Fig. 4. Geographic sketch map showing the position of the nine centres vis-à-vis the Brahmaputra river in north-east India.

Fig 4. Carte géographique montrant la position des neuf centres par rapport à la rivière du Brahmaputra dans le nord-est de l'Inde.

contribute to cocoon productivity. This contention is further strengthened by the result of regression analyses asserting relationship between independent climatic factors and dependent parameter: larval mortality. For larval mortality too, only total rainfall was found to have significant effect. This is in agreement with the identification of the same independent factor.

The human factor stands as a key figure of management in terms of resource network and attitude which in turn are dependent on understanding the problems of field and silkworm coupled with disease management. The loss due to disease has not been entered directly into the picture of our analyses. Nevertheless, total larval mortality aspect includes disease incidence too. In countries other than India, outdoor rearing in temperate zones also faced problems of disease management (Kobayashi & Tanaka, 1991), mainly viral diseases playing a major role. But proper disinfection management in food plantation area pertaining both to *A. yamamai* as well as *A. pernyi* proved to be fruitful.

As earlier pointed out that success of seed crops determines the quantum of commercial rearing, R & D attention to attain success of such critical crops deserve emphasis. One such approach should be the development of a package for successful indoor rearing, at least up to 4th instar, so that the negative effects of the critical factors identified in our analyses would be reduced to a great extent. Further work on crop results involving larger number of crops, partitions of mortality along with different components of disease in relation to climatic factors are in progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

Contributions made by Mr. S. S. Singh, B. Das, (Dr.) N. J. Dhar, B. Basumatary, D. Goswami, K. Das, A. Barah, (Mrs.) M. Sahu and (Dr.) L. N. Kakoty are gratefully acknowledged. Authors are also thankful to Sri Detashish Das and all the officials of MSDP for their encouragement and cooperation. Thanks are also due to the Deputy Director, Rubber Board, Guwahati for rendering statistical facility.

REFERENCES

- CROTCH W. J. B. A. (1956) Silkmoth rearer's handbook. Vol. 12 P. 55 - 130. The Ameture. Entomologists' Society.
- CHOWDHURY S. N. (1970) Muga culture. Directorate of Sericulture and Weaving, Assam. P. 15 - 76.
- COOPER M. & DELACY I. H. (1994) Relationships among analytical methods used to study genotypic variation and genotype - by - environment interaction in plant breeding multi - environment experiments. Theor. Appl. Genet (88): 561 - 572.
- GOMEZ K. A. & GOMEZ (1976) In Statistical procedures for Agricultural Research with emphasis on rice. International Rice Research Institute, Philippines.
- JOLLY M. S., CHOWDURY S. N. & SEN S. K. (1975) In non mulberry sericulture in India. Central Silk Board, Bombay.
- KOBAYASHI M. & TANAKA K. (1991) Control for nucleopolyhedrosis in tree rearing of *Antheraea Yamamai* in wild silkmoth. P: 145 - 152.
- SUBBA RAO G. (1983) National seminar on Silk Research and Development. Central Silk Board, Bangalore.
- SAHU M., MUKHERJI P. K. & MANDAL T. K. (1998) Constraints during pre - seed rearings of *Antheraea assama* W. W. at seed rearer's level in lower Assam. The Third International Conference on Wild Silk moth. P: 32.
- WARDLE T. (1881) In Handbook of Indian wild silk.
- WATT G. (1883) In the Economic products of India. Vol VI.
- YAMAZAKI H. 1959 Present status of rearing of *A. yamamai* and *A. pernyi* and its future design. Bulletin No. 25. Central Silk Board, Bombay.

EFFET DE LA VARIABILITE CLIMATIQUE SUR LA PRODUCTIVITE DU VER A SOIE MUGA (*ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD) SUR NEUF SITES DU NORD - EST DE L'INDE

M. CHAUDHURI, S. S. SINGH, B. DAS, N. J. DHAR, B. BASUMATARY, D. GOSWAMI, K. DAS, A. BARAH, M. SAHU, L. N. KAKOTY, T. MANDAL & S. N. CHATTERJEE

Muga Seed Development Project, Central Silk Board, Guwahati, Inde.

*La production de la soie muga - la soie non mûrier, la plus fine du monde - est confinée au nord-est de l'Inde. Les variations saisonnières et environnementales influencent énormément les vers muga, *Antheraea assama* Westwood, puisqu'ils vivent dans la nature. Un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques exercent leur effet sur les larves tout au long de la période d'élevage, ce qui influence leur survie et leur rendement en cocons. Dans l'étude présente, l'élevage des vers muga a été mené lors de deux saisons de récolte, à savoir d'avril à mai et de septembre à octobre dans 9 zones différentes pendant 5 années consécutives, de 1993 à 1997. Pour la première fois, des analyses multiples de régression ont été réalisées, en considérant 9 facteurs abiotiques, dont 6 facteurs climatiques comme variables indépendantes par rapport à la productivité des cocons et au taux de mortalité larvaire comme variables dépendantes ; ceci afin de déterminer comment ces paramètres biotiques s'expriment sous l'influence des facteurs abiotiques. Il émerge de ces analyses, que sur 9 facteurs abiotiques, seules les précipitations totales et l'humidité relative minimum ont un effet significatif sur la productivité des cocons ($R^2 = 0,233$), tandis que les précipitations totales exercent une influence significative sur le taux de mortalité larvaire ($R^2 = 0,117$). La productivité en cocons est corrélée négativement aux précipitations, alors que l'humidité relative minimum l'est positivement. Le taux de mortalité larvaire est positivement corrélé aux précipitations totales. Cependant, certains aspects du résultat des analyses suggèrent l'implication d'autres facteurs jouant un rôle dans l'expression des deux paramètres biotiques. L'identification de ces paramètres met en lumière le besoin de développer une technique d'élevage en intérieur pour la période critique, mais également la nécessité d'évaluer l'étendue d'une re-planification de l'élevage des vers Muga.*

INTRODUCTION

Antheraea assama Westwood, communément appelé "muga", en Inde, est l'un des insectes lépidoptères séricigènes, exploité commercialement depuis des siècles (Wardle, 1881 ; Watt, 1883) dans le nord-est de l'Inde, qui est une niche écologique exclusive pour cette espèce (Chowdhury, 1970 ; Subba Rao, 1983). Elle est considérée comme une espèce semi-sauvage puisqu'elle est élevée en extérieur sur des arbres, de la même manière que le sont les espèces chinoise et japonaise tassar du chêne, à savoir, *Antheraea pernyi* et *A. yamamai*. Cependant, lorsque la larve est mature, cet insecte a la particularité de descendre le long du tronc de l'arbre sur lequel il se nourrit. Selon des pratiques traditionnelles, les larves matures sont ramassées à la main et placées dans des montages de feuilles sèches, de préférence de *Persea bombycina*. Les plantes nourricières primaires de *A. assama*, *Persea bombycina* (*Machilus bombycina*) et *Litsaea polyantha* (*L. monopetala*), familièrement appelées "som" et "soalu" respectivement, sont principalement distribuées sur toute la zone nord-est du sous-continent indien et des voies orientales montagneuses.

Etant élevées dans la nature, les larves de *A. assama* ainsi que celles de *A. pernyi*, *A. yamamai* et *A. mylitta* (tasar tropical), se sont adaptées jusqu'à un certain degré à toutes sortes de forces de sélection naturelle, telles que la fluctuation de la température, l'humidité, les précipitations ainsi que les attaques de parasites et de prédateurs et celles des infections fongiques, bactériennes et virales (Crotch, 1956 ; Yamasaki, 1959).

L'espèce exploitée commercialement n'a pas de période de diapause que ce soit dans l'oeuf ou pendant le stade chrysalide, ce qui a pour résultat qu'elle pond au moins six fois par an. Cependant, sur le nombre de cycles élevés, deux cycles ont une plus grande importance, puisque ces récoltes sont destinées à la production des graines. Ce sont les cycles élevés d'avril à mai et de septembre à octobre, juste avant la récolte commerciale. L'échec ou la réussite de ceux-ci devient un facteur déterminant de la disponibilité des graines si l'on veut réussir un élevage commercial (Sahu et coll., 1998). La réussite de ces récoltes assure un taux de multiplication de récoltes commerciales plus élevé, ce qui affecte à son tour le rendement en fil de soie muga. C'est ainsi que la récolte des graines fournit un revenu supplémentaire aux éleveurs, revenu qui peut être multiplié par 7,6. Les cocons utilisés comme "cocons à graines" atteignent au moins deux fois la valeur de la vente des cocons de dévidage.

Bien que *A. assama* soit sujette aux divers caprices naturels de l'élevage en extérieur, peu d'études ont été consacrées à l'analyse de la contribution des forces de sélection opérant sur elle, à savoir son exposition aux divers facteurs climatiques associée avec les parasites, les prédateurs et les microorganismes.

Le domaine de la méthodologie analytique a subi un développement conséquent en ce qui concerne la quantification et la description de l'interaction du génotype et de l'environnement lors d'expériences dans des environnements multiples (Cooper and Delacy, 1994). L'analyse de régression multiple permet de prendre en compte plusieurs variables indépendantes susceptibles d'affecter les variables dépendantes (Gomez et Gomez, 1976). Le rapport actuel est une tentative d'examen de l'effet des facteurs climatiques de neuf zones et des performances de deux récoltes en été (d'avril à mai) et en automne (de septembre à octobre) pendant 5 années consécutives (de 1993 à 1997). L'objectif est d'identifier le(s) facteur(s) le(s) plus important(s) qui contribue(nt) à la production de cocons et à la mortalité larvaire, afin qu'une stratégie de planification appropriée des récoltes, qui permettrait de dépasser le facteur climatique le plus critique, soit élaborée.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'analyse actuelle, neuf sites du nord-est de l'Inde (Fig. 4 et Tableau I) faisant partie du Muga Seed Development Project ont été choisis, là où les vers à soie muga ont été élevés pour la multiplication des graines pendant deux saisons, en été (d'avril à mai) et en automne (de septembre à octobre) entre 1993 et 1997. Ces deux saisons de récolte correspondent également aux saisons de récolte commerciale locale. Les données ont été recueillies suivant 11 paramètres ainsi que le décrit le Tableau II.

ANALYSE STATISTIQUE

Pour l'analyse de régression multiple :

Les analyses de régression multiples ont été effectuées grâce à différentes combinaisons de paramètres abiotiques indépendants et seulement deux paramètres biotiques dépendants comme suit :

i) La productivité en cocons par ponte provenant d'un seul papillon femelle, fut considérée comme une variable dépendante par rapport aux 9 variables indépendantes, dont 6 sont des facteurs climatologiques.

ii) La mortalité larvaire a été considérée comme une variable dépendante par rapport aux 9 variables indépendantes, dont 6 sont des facteurs climatologiques.

Les analyses ont été effectuées grâce au COSTAT Programme of Cohort Software, Berklay, CA 94701 sur un PC Pentium.

Pour les statistiques descriptives couvrant tous les paramètres mentionnés ci-dessus, c'est la version 5,0 de Microsoft Excel qui fut utilisée.

Les données d'une récolte particulière de n'importe quelle année et dans n'importe quel site, pour laquelle les informations requises n'étaient pas disponibles de façon adéquate, ne furent pas considérées.

RESULTATS

Les estimations des statistiques descriptives sont transcrites dans le Tableau III. Les données du tableau nous éclairent sur les variations suivantes :

Variation en fonction du site

Comme le décrit le Tableau I (cité dans Matériels et Méthodes), tous les sols des différents sites sont acides. Les neuf sites peuvent être divisés grossièrement en trois groupes : des plaines peu élevées (environ 60 m) et les deux autres groupes correspondant à des élévations de 300 m et de 600 m. Le premier groupe inclut les sites de Lahdoigarh et de North Lakhimpur dans le Haut Assam, Hahim dans le bas Assam, Adokgiri dans les Collines du Garo-est, et Jia en Arunachal Pradesh. Les autres groupes comportent 4 sites, Nongpoh dans les Collines Khasi, Rompara et Mendipathar dans les collines du Garo-est et Tura dans les collines du Garo ouest. Ils représentent à eux tous, les principales régions productrices de graines de la zone d'élevage du muga.

Variation en fonction de la température

D'après le tableau mentionné ci-dessus, la moyenne des températures maximum est de $29,96 \pm 1,94$ comprises entre $25,5$ et $34,6^\circ\text{C}$, alors que la température minimum est de $22,7 \pm 2,33$ dans une fourchette de $10,7$ entre $17,7$ et $28,4^\circ\text{C}$. Des efforts ont été faits pour évaluer l'écart des températures, lors des deux saisons de récolte dans les 9 sites. Ceci indique que bien que les saisons en question furent le début de l'été et l'automne, la variabilité de la température maximum ($28,4 - 34,6^\circ\text{C}$ / écart : $6,2$) dans les 9 sites pour la récolte 1, fut presque la même que celle observée pour la récolte 2 ($26,0 - 33,4^\circ\text{C}$ / écart : $7,4$). L'étendue des variations pour la température minimum est de $5,0$ ($18,3 - 22,32$) pour la récolte 1 par rapport à $7,5$ ($17,7 - 25,2$) pour la récolte 2. Cependant, il est clair d'après le graphique en colonnes des Figures 1a et 1b, que c'est dans le site 7, Jia, Arunachal Pradesh, que la différence entre températures maximum et minimum est la plus importante. Du point de vue du site, la température saisonnière varie entre $34,6^\circ\text{C}$ et $18,3^\circ\text{C}$ pendant la saison de récolte 1 (d'avril à mai) et ces deux températures furent observées dans le site 7 i.e. à Jia, Arunachal Pradesh. De manière similaire, pendant la saison de récolte 2 (septembre - octobre), la température maximum de $33,4^\circ\text{C}$ fut encore observée à Jia, Arunachal Pradesh et la température minimum de $17,7^\circ\text{C}$ à Nongpoh, Meghalay.

Variation en fonction de l'humidité

Le Tableau III révèle également que la moyenne de l'humidité relative maximum est de $86,1\% \pm 6,17$, que l'écart est de $33,6$ entre $61,5$ et $95,1\%$, alors que l'humidité relative minimum est de $69,4\% \pm 7,82$, avec un écart de $37,0$ entre $44,5$ et $81,4\%$. L'évaluation de l'écart de l'humidité relative pour les 9 sites révèle que la variabilité pour l'humidité relative maximum ($91,3 - 80,0\%$, écart : $11,3$) pour les 9 sites pendant la saison de récolte 1, est légèrement plus élevée que celle observée pendant la saison de récolte 2 ($95,1 - 86,3\%$, écart : $8,8$). La variabilité de l'humidité relative minimum ($66,9 - 44,5$, écart : $22,5$) pour la récolte 1 (Fig. 2a) est plus élevée ($81,0 - 63,9$, écart : $17,1$) pendant la saison de récolte 2. Cependant, il est clair d'après le graphique des Figures 2a et 2b, que la différence

entre l'humidité relative maximum et minimum est plus importante pour le site 9 (North Lakhimpur, Assam).

Variation en fonction des précipitations et du nombre de jours de pluie

D'après le Tableau III, il est clair que la moyenne des précipitations pendant la période en question est de $436,6 \text{ mm} \pm 448,05$, l'écart de $2662,5$ entre $63,5$ et $2726,0 \text{ mm}$, tandis que la moyenne du nombre de jours de pluie est de $20 \text{ jours} \pm 6,7$, la fourchette étant de 37 avec un minimum de 3 jours et un maximum de 40 jours de pluie. Ce sont les résultats d'une saison de récolte dans un site particulier pendant une année spécifique. Il est également clair d'après le graphique des Figures 3a et 3b, que la distribution des pluies est très variable pour les deux saisons de récolte dans les différents sites au fil des années, quel que soit le nombre de jours de pluie. Les précipitations les plus importantes ($1913,5 \text{ mm}$) et les moins importantes ($163,3 \text{ mm}$) furent celles de la saison de récolte 1, dans les sites 9 et 3, c'est à dire North Lakhimpur en Assam et Nongpoh, Meghalay. Le nombre de jours de pluie le plus important (30 jours) fut observé à Jia, Arunachal Pradesh et le moins important (16 jours) sur le site 5, à Adokgiri. Pendant la saison de récolte 2, le site le plus arrosé ($481,3 \text{ mm}$) fut le 8 (Hahim, Assam) et le moins arrosé ($200,3 \text{ mm}$) fut le 1 (Tura, Meghalay). Le nombre de jours le plus important (26 jours) fut observé sur le site 5 (Adokgiri) et le nombre de jours le moins important (7 jours) sur le site 3 (Nongpoh), les deux étant situés en Meghalay.

Evaluation de la productivité en cocons

Dans le but de déterminer le rôle des 9 facteurs abiotiques (détaillés dans le Tableau I dans Matériels et Méthodes) en vue de l'expression de facteurs biotiques, c'est le nombre de pontes saines qui fut la variable dépendante considérée pour cette analyse. Le coefficient de régression multiple réalisé (R^2) est de $0,302$, la signification de celui-ci étant révélée par la signification de l'index de régression $2832,7$ ($F = 2,98$). Des 9 facteurs abiotiques, la contribution de 2 d'entre eux fut significative, comme l'indiquent les valeurs de F . Ces deux facteurs sont les précipitations totales et le site (Tableau IV).

D'après l'analyse de régression, sur la base de l'équation de régression qui suit, le programme informatique a trouvé les valeurs attendues de la productivité en cocons, ainsi que celles des valeurs résiduelles. L'évaluation de la différence entre les valeurs observées et les valeurs attendues des variables dépendantes (exprimées en résiduelles) a également été effectuée. Les résidus étaient très étendus. Des 72 entrées, il apparut que seulement 8 cas ($11,1 \%$) donnent une faible variation i.e., les résiduels de moins de -5 à $+5$. Mais $23,6 \%$ des résiduels sont situés entre -25 et -55 et $27,8 \%$ entre 6 et 24 .

Afin de savoir si les facteurs abiotiques non climatiques masquent la signification des autres facteurs climatiques, une analyse supplémentaire a été effectuée en réduisant l'équation de régression multiple, après avoir éliminé 2 facteurs significatifs comme l'indique le Tableau V. La valeur de R^2 change de $0,302$ à $0,233$. Le premier facteur de l'équation de régression $-19,13$ passe à $-10,72$, les valeurs des nombres de jours de pluie augmentent de $-0,06$ à $0,14$. De manière similaire, l'équation de régression des précipitations totales, de l'humidité relative maximum, des températures maximum et minimum augmente de $0,002$ à $0,007$, de $0,57$ à $0,79$, de $-2,39$ à $-4,05$ et de $2,47$ à $3,38$. En ce qui concerne les années et l'humidité relative minimum, elles diminuèrent toutes deux de $-2,47$ à $-1,22$ et de $3,38$ respectivement.

L'analyse de régression multiple aida à identifier 2 facteurs climatiques, à savoir les précipitations totales et l'humidité relative minimum qui contribuèrent de manière significative à l'expression de la productivité en cocons. Les précipitations totales sont corrélées négativement alors que l'humidité relative minimum l'est positivement, ce qui signifie que lorsque les précipitations totales et l'humidité relative minimum diminuent, la valeur de la productivité en cocons est supposée augmenter. L'évaluation des résidus, qui fut estimée grâce à l'équation de régression transformée, indiqua $34,7 \%$ de déviation de l'écart entre -6 et -55 et $48,6 \%$ de déviation située entre $+6$ et $+55$. En outre,

environ 50 % des 48,6 % des résidus étaient situés entre + 25 et + 55, ce qui est beaucoup plus important.

Evaluation de la mortalité larvaire

Afin de déterminer l'influence des 9 facteurs abiotiques (détaillés dans le Tableau I, dans Matériels et Méthodes) sur l'expression d'un autre facteur biotique, la mortalité larvaire fut la variable dépendante considérée pour cette analyse. Le coefficient de régression multiple (R^2) est de 0,157, ce qui n'est pas significatif, ainsi que ceci est confirmé par l'index de régression 636,31 ($F = 1,28$) donné dans le Tableau ci-dessous. Des 9 facteurs abiotiques, la contribution des précipitations totales seulement, fut significative, ainsi que nous l'indiquent les valeurs de F (0,62) dans le Tableau V.

Les restes sont ici encore très étendus. Des 72 entrées, il apparaît que seulement 15 cas (20,8 %) indiquent une faible variation avec des restes de moins de -5 à $+5$. Mais sur 72 cas, 34,7 % des restes se situent entre -6 et -24 ; 11,1 % et 18,1 % des restes, appartenant chacun à l'écart entre -25 et -55 et $+6$ à $+24$ et 15,3 % des résidus situés entre $+25$ et $+55$.

Pour vérifier si l'influence des précipitations totales masque la signification des autres facteurs climatiques, une analyse plus approfondie a été effectuée en réduisant l'équation de l'analyse de régression, après avoir éliminé le facteur significatif.

Aucun des facteurs n'eut un effet significatif sur le taux de mortalité larvaire bien que R^2 fut encore diminué de 0,157 à 0,144. Le premier facteur de l'équation de régression, 56,76 passa à 72,51. Les valeurs pour le nombre de jours de pluie, la récolte et la température maximum diminuèrent de $-0,055$, 50,02 et 1,84 à $-0,029$, 41,71 et 1,78 respectivement. Mais les valeurs pour l'humidité relative maximum, l'année, le site, l'humidité relative minimum et la température augmentèrent de $-0,137$, 0,049, $-0,23$, $-0,58$ et $-1,08$ à $-0,23$, 0,94, 1,73, $-0,64$ et $-1,09$ respectivement.

La deuxième réduction de l'équation de régression multiple fut réalisée en éliminant les précipitations totales avec les facteurs récolte et site. Aucun de ces facteurs n'eut un effet significatif sur le taux de mortalité larvaire mais la valeur R^2 diminua de 0,144 à 0,117 (Tableau V). Le premier facteur de l'équation de régression étant 72,51, il passa nominale à 72,51. Les valeurs pour le nombre de jours de pluie, pour l'humidité relative maximum, pour les températures minimum et maximum augmentèrent de $-0,029$; $-0,23$; 1,78 et $-1,09$ à $-0,07$; $-0,43$; 2,59 et $-1,60$ respectivement. Mais les valeurs pour l'année et l'humidité relative minimum diminuèrent de 0,94 et $-0,64$ à $-0,025$ et $-0,34$ respectivement.

L'analyse de régression multiple contribua à identifier un seul facteur climatique, les précipitations totales, affectant de manière significative l'expression du taux de mortalité larvaire. Les précipitations totales sont positivement corrélées, ce qui signifie que lorsque les précipitations totales augmentent, la valeur de la mortalité larvaire augmente elle aussi.

DISCUSSION

Les résultats obtenus indiquent que la variabilité des facteurs climatiques est importante sur les 9 sites (Fig. 4). Ceci est particulièrement vrai pour l'altitude, la répartition du changement quotidien des écarts de température, la variation de l'humidité, le quantum des précipitations ainsi que le nombre de jours de pluie. Néanmoins, la variabilité observée la plus élevée est celle des précipitations. Les données révèlent que les sites 9, 5 et 7 sont, dans l'ordre décroissant, des zones à fortes précipitations, à savoir North Lakhimpur (Haut Assam), Adokgiri (Collines du Garo-est) et Jia (Arunachal Pradesh). Ainsi, ces différents sites peuvent être considérés comme références pour des expériences sur des sites multiples. Ils indiquent également que la variabilité génétique pourrait avoir été créée en sélectionnant des génotypes sous de tels facteurs spécifiques climatiques abiotiques. Il a également été rapporté qu'avant l'établissement d'un système de multiplication centralisé pour des élevages simples, les éleveurs avaient l'habitude de se procurer leurs vers dans des forêts très éloignées, ceci probablement dans le but de créer une variabilité génotypique. Même aujourd'hui, les infrastructures créées sous le

Muga Seed Development Project peuvent être utilisées en tant que bases de ressources en vue d'une amélioration du matériel génétique d'*Antheraea assama*. La productivité en cocons des vers muga pour la multiplication des graines est mesurée en termes de potentiel de productivité réalisé à partir des oeufs / pontes pondus par un papillon femelle ; c'est donc le facteur le plus important à la fois pour des raisons commerciales et pour les éleveurs de graines. La compréhension de l'influence des facteurs climatiques sur la productivité des cocons est de la plus haute importance. Les analyses de régression multiple présentées ici, sont les premières qui existent avec des données sur 5 ans.

Les résultats révèlent certains aspects importants en réponse à l'attitude générale des éleveurs qui considèrent que les intempéries sont responsables des échecs de leurs élevages. Dans la première analyse, 2 facteurs abiotiques, à savoir les précipitations totales et le site semblent avoir une influence significative sur la productivité des cocons. Chacun des 9 sites est caractérisé par des critères climatiques spécifiques et la signification du site sur la productivité des cocons est un simple reflet de l'effet concerté de ces critères qui sont évidemment moins importants que les précipitations. Cependant, même après avoir exclu le site de l'analyse de régression, un seul facteur climatique semble être significatif, à savoir l'humidité relative minimum, qui est elle-même l'effet résultant de précipitations faibles.

Les valeurs résiduelles fortes pour la productivité en cocons ainsi que la mortalité larvaire suggèrent que, mis à part les facteurs considérés pour l'analyse, il pourrait exister d'autres facteurs y compris le facteur humain qui contribuent à la productivité des cocons. Cette affirmation est renforcée par les résultats des analyses de régression qui affirment qu'il existe une relation entre les facteurs climatiques indépendants et un paramètre dépendant : la mortalité larvaire. Sur la mortalité larvaire, seules les précipitations totales ont un effet significatif. Ceci est en accord avec l'identification du même facteur indépendant.

Le facteur humain est un facteur clé de la gestion des élevages, en termes de réseau de ressources et d'attitudes, qui sont eux-mêmes dépendants de la manière de comprendre les problèmes des cultures et des élevages joints à la gestion des maladies. Les pertes dues à la maladie ne sont pas entrées directement dans nos analyses. Néanmoins, le facteur mortalité larvaire totale comprend également l'incidence de la maladie. Dans d'autres pays que l'Inde, l'élevage en plein air dans des zones tempérées est confronté à des problèmes de gestion des maladies (Kobayashi & Tanaka, 1991), les maladies virales jouant le rôle principal. Cependant, une désinfection appropriée dans les zones de plantations concernant *A. yamamai* et *A. pernyi* s'avèrent bénéfiques.

Ainsi qu'il a été mentionné plus haut, le succès des récoltes de graines détermine le quantum de l'élevage commercial. Une telle approche devrait permettre le développement de mesures destinées à l'élevage en intérieur, au moins jusqu'au quatrième stade, pour que les effets négatifs des facteurs critiques identifiés dans nos analyses soient considérablement réduits. Une étude complémentaire qui comprend un nombre important de cultures, une segmentation de la mortalité ainsi que les différents facteurs de maladie en relation avec les facteurs climatiques est en cours.

NUTRITIONAL DISORDERS OF MULBERRY (*MORUS* spp.) III. LEAF NUTRIENT GUIDE FOR SECONDARY NUTRIENTS

B. K. SINGHAL*, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R. K. DATTA

Laboratory of Mulberry Physiology, Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore - 570 008 India.

*For a successful silkworm (*Bombyx mori* L.) cocoon crop, the different factors responsible are: mulberry (*Morus* spp.) leaf (38.2 %), climate (37.0%), rearing technique (9.3%), silkworm race (4.2%), silkworm eggs (3.1%) and other factors (8.2%). The economy or the profitability of sericulture depends primarily on quality leaf produced. Various studies on silkworm nutrition have established the importance of leaf quality in growth and development of the silkworm and overall silk production. Mulberry is a perennial tree and once planted can yield continuously for more than ten years. Due to repeated leaf harvests large quantities of nutrients are depleted from the soil consequently causing nutritional disorders. In many regions, mulberry fields are either underfertilized or overfertilized due to non availability of authentic information on the critical level of nutrients required (below which the yield is limited and above which the use of fertilizer is either toxic or luxuriant as well as not economical). Leaf analysis has been reported as the best method to overcome such nutritional disorders. Based on the physiological and biochemical parameters and nutrients status of the leaf, 0.25% Calcium, 0.15% Magnesium and 0.32% Sulphur were found to be the critical levels of their requirement for optimum leaf yield and quality. The findings may serve as a nutrient guide for secondary nutrients in mulberry and the guidelines for further investigation on silkworm nutrition.*

Keywords: Leaf nutrient guide, secondary nutrients, mulberry.

INTRODUCTION

The different factors responsible for a successful cocoon crop are: mulberry leaf (38.2%), climate (37.0%), rearing technique (9.3%), silkworm race (4.2%), silkworm eggs (3.1%) and other factors (8.2%) (Miyashita, 1986). Therefore, the economy or the profitability of sericulture depends primarily on quality of the leaf produced. Various studies on silkworm nutrition have established the influences of leaf quality on growth and development of the silkworm and its importance in overall silk production (Subburathinam and Chetty, 1991; Subburathinam *et al.*, 1993; Shankar *et al.*, 1994; Singhal and Mala, 1998; Singhal *et al.*, 1998).

Mulberry is a perennial tree and once planted can yield continuously for more than ten years. Due to repeated leaf harvests, large quantities of nutrients are depleted from the soil consequently causing nutritional disorders.

In many regions, mulberry gardens are under fertilized, while in some areas, mulberry fields are over fertilized (Gowda, 1993).

* Present address: Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu - 181 101, J & K, India.

Deficiencies of secondary nutrients in the soil due to intensive cultivation and toxicity due to application of high doses of fertilizers limit the yield potentiality and affect the quality of leaf in turn affecting the cocoon production.

Deficiency of secondary nutrients (Ca, Mg & S) is found to adversely affect the silkworm larval growth, development, cocoon weight and silk quality (Shankar *et al.*, 1994).

Information on the critical limit of the nutrient required for the optimum leaf yield and quality of mulberry leaf based on physiological and biochemical parameters and leaf nutrient status is not available. The low or high doses of nutrients application other than the required dose leads to the deficiency of other nutrients (either by shortage or toxicity), thereby influencing various physiological and biochemical processes. Leaf analysis has been suggested as the best method for finding out the critical limit of plant nutrient requirement by Bhargava and Chadha (1988). The critical level is the range of a given element in the leaf, below which the yield is limited and above which the use of fertilizer is either toxic or luxuriant as well as not economical. Keeping this objective, the present investigation was conducted to find out the critical level of Ca, Mg and S requirements. In this respect, nutrient guide for N, P and K requirement has been given by the authors (Singhal *et al.*, 1999).

MATERIALS AND METHODS

The popular mulberry variety Kanva-2 was planted by cuttings in Wagner pots filled with nutrient free white granite sand under glass house condition maintaining room temperature of $25 \pm 2^\circ \text{C}$. The pots were provided with deionized water till 120 days of plantation for rooting and then the plants were pruned. After 30 days of pruning, ten different doses *viz.* 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 and 0.50% each for calcium (in the form of CaCl_2) and magnesium (in the form of MgSO_4) were supplied to different treatments. Similarly, different doses of sulphur *viz.* 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.20, 0.24, 0.28, 0.32, 0.36 and 0.40% (in the form of K_2SO_4) were supplied to the different treatments. Hoagland's solution was supplied to all the treatments by eliminating either Ca, Mg or S depending on the respective treatment. Eight replications were maintained in each treatment. After 70 days of pruning, morphological, physiological and biochemical parameters were recorded. Leaf analysis was made for macro, secondary and micro nutrients status. Photosynthesis, stomatal conductance, intercellular CO_2 concentration and transpiration rate were measured using LICOR - 6200 portable photosynthesis system. Hiscox and Israelstam (1979) method was followed for the analysis of chlorophyll 'a' and 'b' while protein content was estimated using tecator autokjeltec system.

For leaf analysis, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn and B were analyzed using GBC 902 double beam atomic absorption spectrophotometer. Tecator autokjeltec was used for nitrogen estimation. Phosphorus was estimated by colorimetric method (Olsen and Sommers, 1982), potassium by flame photometer (Baker and Suhr, 1982) and sulphur by turbidimetric method (Bardsley and Lancaster, 1960). The data obtained in respect to all the parameters were statistically analyzed.

RESULTS AND DISCUSSION

The morphological, physiological and biochemical parameters with leaf analysis status for macro, secondary and micro nutrients under different doses of Ca, Mg and S are presented in Tables 1 - 6.

All the morphological, physiological and biochemical parameters varied under different doses of calcium (Table 1). Though, highest plant height, number of leaves per plant, total leaf area per plant, leaf yield and leaf dry matter were recorded in 0.30% dose of calcium, significant difference was not found between 0.25 and 0.30% calcium doses. The highest leaf yield of 28.79 g/plant was obtained in the calcium dose of 0.30% followed by 28.72 g/plant in 0.25% with non significant difference between both the treatments. Similarly, photosynthetic rate of $9.22 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and transpiration rate of $0.0027 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were recorded in the treatment of 0.25% calcium and the values were non significant among 0.25 and 0.30%. Among the biochemical parameters, highest amount of

Table I. Morphological and physiological parameters under different Calcium doses in the mulberry Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.

Tableau I. Paramètres morphologiques et physiologiques du mûrier Kanva - 2, Morus indica L., Mysore, Inde, sous différentes doses de Calcium.

Calcium dose (%)	Plant height (cm)	Number of leaves per plant	Total leaf area per plant (cm ²)	Leaf yield per plant (g)	Leaf dry matter per plant (g)	Photo-synthesis (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Stomatal conductance (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	i CO ₂ conc. (ppm)	Transpiration (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Chlorophyll 'a' (mg/g fr. wt.)	Chlorophyll 'b' (mg/g fr. wt.)	Protein (%)
<i>Dose de Calcium (%)</i>	<i>Hauteur de la plante en cm</i>	<i>Nombre de feuilles par plante</i>	<i>Surface totale des feuilles par plante en cm²</i>	<i>Rendement en feuilles par plante en g</i>	<i>Matière sèche des feuilles par plante en g</i>	<i>Photo-synthèse (µmoles m⁻² s⁻¹)</i>	<i>Conductivité des stomates (µmoles m⁻² s⁻¹)</i>	<i>Conc. int. CO₂ (ppm)</i>	<i>Transpiration (µmoles m⁻² s⁻¹)</i>	<i>Chlorophylle 'a' (mg / g poids frais)</i>	<i>Chlorophylle 'b' (mg / g poids frais)</i>	<i>Protéines (%)</i>
0.05	42.96	10.59	649.33	14.28	4.12	6.36	0.321	233.90	0.0019	1.013	0.290	15.16
0.10	44.35	11.75	670.94	14.81	4.23	7.41	0.334	246.59	0.0021	1.033	0.323	15.26
0.15	44.81	13.31	850.52	19.36	5.61	8.43	0.344	249.64	0.0024	1.120	0.333	15.38
0.20	46.00	13.45	867.83	22.47	6.50	8.58	0.336	252.34	0.0025	1.300	0.530	19.60
0.25	49.04	14.34	984.05	28.72	8.34	9.22	0.346	253.33	0.0027	1.500	0.530	19.75
0.30	50.35	14.88	986.08	28.79	8.54	9.48	0.358	257.00	0.0028	1.700	0.533	19.81
0.35	49.43	14.47	984.12	28.75	8.13	9.21	0.358	255.12	0.0028	1.743	0.527	19.05
0.40	49.09	14.39	982.22	28.70	8.11	9.18	0.358	252.39	0.0028	1.697	0.523	19.01
0.45	48.97	14.31	975.36	28.34	8.11	9.15	0.351	246.47	0.0026	1.356	0.450	18.39
0.50	47.55	13.45	929.28	25.71	7.53	8.88	0.342	240.71	0.0025	1.213	0.353	16.34
CD at 5%	1.95 **	1.81 **	18.08 **	1.08 **	0.285 **	0.47 **	0.004 **	2.89 **	0.0001 **	0.145 **	0.036 **	0.46 **

Table II. Nutrients status under different Calcium doses in the mulberry, Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.*Tableau II. Etat des nutriments du mûrier Kanva - 2, Morus indica L., Mysore, Inde, sous différentes doses de Calcium.*

Calcium dose (%)	Macro nutrients (%)			Secondary nutrients (%)			Micro nutrients (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
<i>Dose de calcium (%)</i>	<i>Macro nutriments (%)</i>			<i>Nutriments secondaires (%)</i>			<i>Micro nutriments (ppm)</i>				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
0.05	2.89	0.28	1.76	1.03	0.51	0.29	236.16	101.53	17.07	115.27	42.21
0.10	3.06	0.31	1.81	1.11	0.51	0.30	229.38	98.24	15.00	111.25	38.05
0.15	3.35	0.34	1.87	1.31	0.50	0.31	225.30	95.81	14.27	108.90	35.52
0.20	3.51	0.37	1.93	1.84	0.49	0.32	222.87	93.35	13.14	107.60	33.37
0.25	3.80	0.39	2.03	2.02	0.48	0.32	220.81	90.15	12.90	107.46	32.07
0.30	3.81	0.42	2.04	2.17	0.47	0.32	220.50	89.65	12.75	107.45	31.88
0.35	3.82	0.42	2.05	2.22	0.46	0.33	219.32	88.87	12.47	105.59	30.26
0.40	3.83	0.40	2.03	2.28	0.43	0.35	217.39	87.56	11.41	103.58	26.98
0.45	3.83	0.38	2.03	2.33	0.41	0.35	209.61	85.07	10.03	98.45	22.34
0.50	3.84	0.38	2.01	2.39	0.35	0.36	201.67	81.19	8.87	97.11	21.25
CD at 1%	0.09 **	0.04 **	0.05 **	0.07 **	0.06 **	0.05 **	2.98 **	4.19 **	1.73 **	5.68 **	4.26 **

chlorophyll 'a' (1.743 mg/g) was recorded in the treatment of 0.35% of calcium. However, chlorophyll 'b' and protein % were higher in 0.30% calcium but the difference between 0.20, 0.25 and 0.30% doses were non significant. The leaf analysis revealed variation in nutrient status under different calcium doses (Table II). At low calcium doses, high uptake of all the micro nutrients was observed, while low uptake of micro nutrients was noticed under higher doses of calcium.

The data indicated that calcium at 0.25% is the critical requirement for the optimum leaf yield and quality, beyond which toxicity was observed. At 0.25% calcium dose, the level of N, P, K, Ca, Mg and S were 3.80, 0.39, 2.03, 2.02, 0.48 and 0.32%, respectively. The micro nutrient status for Fe, Zn, Cu, Mn and B were 220.81, 90.15, 12.90, 107.46 and 32.07 ppm, respectively.

Table III. Morphological and physiological parameters under different Magnesium doses in the mulberry Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.

Tableau III. Paramètres morphologiques et physiologiques du mûrier Kanva - 2, *Morus indica* L. Mysore, Inde, sous différentes doses de magnésium.

Magnesium dose (%)	Plant height (cm)	Number of leaves per plant	Total leaf area per plant (cm ²)	Leaf yield per plant (g)	Leaf dry matter per plant (g)	Photo-synthesis (μ mole m ⁻² s ⁻¹)	Stomatal conductance (μ mole m ⁻² s ⁻¹)	internal CO ₂ concentr. (ppm)	Transpiration (μ mole m ⁻² s ⁻¹)	Chlorophyll 'a' (mg/g fr. wt.)	Chlorophyll 'b' (mg/g fr. wt.)	Protein (%)
Dose de magnésium (%)	Hauteur de la plante en cm	Nombre de feuilles par plante	Surface totale des feuilles par plante (cm ²)	Rendement en feuilles par plante en g	Matière sèche des feuilles par plante en g	Photo-synthèse (μ moles m ⁻² s ⁻¹)	Conductivité des stomates (μ moles m ⁻² s ⁻¹)	Concentr. Co ₂ interne (ppm)	Transpiration- (μ moles m ⁻² s ⁻¹)	Chlorophylle 'a' (mg / g poids frais)	Chlorophylle 'b' (mg / g poids frais)	Protéines (%)
0.05	49.24	15.70	917.26	18.51	5.74	8.73	0.330	284.25	0.0022	1.120	0.326	14.96
0.10	53.55	15.74	1072.48	26.94	8.18	11.31	0.319	236.65	0.0030	1.526	0.536	18.84
0.15	55.52	15.98	1085.02	32.08	9.27	13.19	0.526	287.08	0.0036	1.826	0.663	21.24
0.20	56.13	17.89	1087.61	33.38	9.65	13.61	0.527	291.83	0.0038	2.190	0.720	21.66
0.25	56.01	15.52	1069.73	33.26	9.62	12.97	0.519	283.30	0.0033	2.193	0.703	21.42
0.30	55.87	15.20	1060.46	32.65	9.57	12.97	0.519	308.53	0.0033	1.826	0.686	20.67
0.35	55.74	14.86	1044.90	32.31	9.49	12.94	0.447	311.16	0.0032	1.810	0.666	20.42
0.40	55.67	14.62	1012.63	31.13	9.46	12.94	0.324	282.59	0.0031	1.526	0.663	20.42
0.45	38.82	11.75	762.39	30.99	9.39	12.70	0.468	287.59	0.0028	1.233	0.610	19.93
0.50	35.73	11.49	668.88	15.54	3.76	4.85	0.113	279.54	0.0015	1.146	0.530	19.51
Cd at 5%	2.62 **	1.36 **	30.14 **	2.18 **	0.71 **	0.99 **	0.012 **	6.677 **	0.0003 **	0.457 **	0.148 **	0.852 **

Table IV. Nutrients status under different Magnesium doses in the mulberry Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.*Tableau IV. Etat des nutriments du mûrier, Kanva - 2, Morus indica L., Mysore, Inde, sous différentes doses de magnésium.*

Magnesium dose (%)	Macro nutrients (%)			Secondary nutrients (%)			Micro nutrients (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
Dose de mg (%)	Macro nutriments (%)			Nutriments secondaires (%)			Micro nutriments (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
0.05	3.72	0.36	2.10	2.14	0.29	0.36	202.75	73.17	12.66	118.08	36.91
0.10	3.75	0.37	2.08	2.13	0.36	0.36	209.39	81.00	12.63	114.87	37.14
0.15	3.79	0.37	2.04	2.12	0.40	0.34	216.17	83.98	12.62	112.52	37.19
0.20	3.87	0.42	2.02	2.12	0.47	0.34	220.07	87.48	12.59	111.20	37.39
0.25	3.86	0.42	1.98	2.12	0.52	0.36	220.49	87.95	12.55	110.93	36.90
0.30	3.85	0.41	1.91	2.12	0.55	0.36	220.54	87.97	12.50	107.61	36.78
0.35	3.85	0.41	1.87	2.11	0.62	0.37	220.95	89.80	12.39	102.49	36.65
0.40	3.84	0.40	1.85	2.08	0.62	0.37	221.46	87.07	12.34	97.45	36.58
0.45	3.77	0.40	1.83	2.03	0.65	0.37	220.06	85.63	12.28	94.59	36.56
0.50	3.74	0.40	1.80	1.87	0.68	0.37	219.58	85.25	12.26	91.72	36.38
CD at 1%	0.05 **	0.01 **	0.05 **	0.05 **	0.03 **	NS	3.82 **	6.95 **	0.90 **	3.08 **	NS

Calcium plays an important role in the synthesis of pectin in the middle lamella of the cell wall. Its deficiency causes incomplete cell division or mitosis without formation of new cell wall resulting in the formation of multinucleated cells (Bidwell, 1979). Calcium is considered essential for the growth of the meristematic tissues and for the functioning of root tip (Kanwar, 1978). When it is passed on to the silkworm, 60% of the calcium injected has been recovered in the extruded silk (Arsenyev *et al.*, 1957). Enrichment of mulberry leaves with calcium chloride at 1% can increase the cocoon

Table V. Morphological and physiological parameters under different Sulphur doses in the mulberry Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.Tableau V. Paramètres morphologiques et physiologiques du mûrier, Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, Inde, sous différentes doses de soufre.

Sulphur dose (%)	Plant height (cm)	Number of leaves per plant	Total leaf area per plant (cm ²)	Leaf yield per plant (g)	Leaf dry matter per plant (g)	Photo-synthesis (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Stomatal conductance (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	internal CO ₂ concentr. (ppm)	Transpiration (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Chlorophyll 'a' (mg/g fr. wt.)	Chlorophyll 'b' (mg/g fr. wt.)	Protein (%)
Dose de soufre (%)	Hauteur de la plante en cm	Nombre de feuilles par plante	Surface totale des feuilles par plante (cm ²)	Rendement en feuilles par plante (g)	Matière sèche des feuilles par plante (g)	Photosynthèse (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Conductivité des stomates (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Concentr. CO ₂ interne (ppm)	Transpiration (µmoles m ⁻² s ⁻¹)	Chlorophylle 'a' (mg / g poids frais)	Chlorophylle 'b' (mg / g poids frais)	Protéines (%)
0.02	39.64	10.95	763.46	16.19	4.65	7.35	0.293	196.63	0.0015	1.034	0.311	13.17
0.04	41.58	12.61	852.31	17.97	5.18	7.47	0.303	207.10	0.0018	1.083	0.333	14.20
0.08	43.77	14.13	1045.92	19.29	5.62	8.44	0.314	220.55	0.0025	1.168	0.394	14.88
0.16	47.29	14.79	1050.32	20.33	5.83	9.54	0.329	225.23	0.0026	1.462	0.508	15.24
0.20	51.76	16.01	1185.75	21.87	6.36	9.65	0.333	253.45	0.0026	1.596	0.565	18.85
0.24	57.34	17.37	1194.97	24.45	7.06	11.15	0.395	274.37	0.0033	1.755	0.611	19.33
0.28	61.60	17.91	1299.07	24.75	7.34	11.52	0.408	275.59	0.0038	1.902	0.618	21.44
0.32	64.63	20.38	1381.31	27.63	8.08	11.54	0.421	278.82	0.0040	2.181	0.652	22.41
0.36	63.74	19.62	1371.28	27.41	8.07	11.40	0.407	280.74	0.0037	2.129	0.734	22.14
0.40	61.60	18.98	1361.98	27.25	7.86	11.11	0.402	276.56	0.0035	2.130	0.708	21.27
CD at 5%	2.09 **	1.13 **	49.61 **	0.46 **	0.21 **	0.27 **	0.011 **	7.39 **	0.0001 **	0.095 **	0.132 **	0.96 **

Table VI. Nutrients status under different Sulphur doses in mulberry Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, India.Tableau VI. Etat des nutriments du mûrier Kanva - 2, *Morus indica* L., Mysore, Inde, sous différentes doses de soufre.

Sulphur dose (%)	Macro nutrients (%)			Secondary nutrients (%)			Micro nutrients (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
Dose de soufre (%)	Macro nutriments (%)			Nutriments secondaires (%)			Micro nutriments (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
0.02	3.91	0.23	1.73	2.11	0.44	0.13	218.38	80.01	9.17	89.19	33.03
0.04	3.91	0.26	1.77	2.12	0.44	0.18	218.76	85.51	10.26	100.07	33.29
0.08	3.88	0.29	1.81	2.12	0.44	0.23	219.11	89.59	11.32	102.14	33.41
0.16	3.87	0.33	1.84	2.12	0.45	0.27	219.67	89.83	11.36	104.16	33.41
0.20	3.86	0.36	1.88	2.12	0.45	0.29	221.14	89.84	11.46	105.49	33.46
0.24	3.85	0.38	1.94	2.13	0.45	0.32	221.19	90.18	11.47	107.57	33.78
0.28	3.85	0.41	2.01	2.13	0.46	0.34	221.46	90.42	11.65	108.07	33.78
0.32	3.84	0.42	2.03	2.15	0.47	0.36	221.47	90.45	11.69	109.58	33.86
0.36	3.82	0.40	2.02	2.15	0.46	0.37	226.13	90.49	11.72	109.89	33.91
0.40	3.82	0.38	1.99	2.13	0.46	0.42	229.45	91.07	11.74	109.81	33.91
CD at 1%	0.07 **	0.03 **	0.17 **	NS	NS	0.03 **	2.70 **	3.74 **	0.73 **	1.78 **	NS

characters like cocoon weight (11.42%), shell weight (16.75%), cocoon/shell ratio (6.7%) and silk protein *viz.* fibroin (4.85%) and sericin (9.32%) as reported by Subburathinam and Chetty (1991). Increase in larval growth has also been observed when mulberry leaves are fortified by calcium hydroxide (Subburathinam *et al.*, 1993).

All the morphological, physiological and biochemical parameters differed among different treatments of magnesium (Table III). Highest leaf yield (33.38 g/plant) and leaf dry matter (9.65

g/plant) were recorded in the treatment of 0.20% magnesium dose but was not significant compared to 0.15%. Physiological and biochemical parameters were also found high in the treatment of 0.20% magnesium but was again non significant compared to 0.15%. High values of chlorophyll 'a' (1.826 mg/g), chlorophyll 'b' (0.663 mg/g) and protein (21.24%) were found at the Mg dose of 0.15% and were not found significantly low compared to in 0.20% dose. Leaf analysis revealed that N and P levels increased initially with the increase in magnesium dose and reduced gradually at higher levels (Table IV). Change in S, Cu and B levels was found non significant. High K, Ca and Mn contents were noticed under low Mg doses, which gradually decreased with the increase in magnesium level. N, P, Fe and Zn contents were found increased initially with increase in magnesium doses but decreased at higher levels. At the critical level of 0.15% magnesium, N, P, K, Ca, Mg and S levels were 3.79, 0.37, 2.04, 2.12, 0.40 and 0.34%, respectively. Micro nutrient levels of 216.17, 83.98, 12.62, 112.52 and 37.19 ppm were recorded for Fe, Zn, Cu, Mn and B, respectively.

Magnesium, the central atom of chlorophyll, with its specific electron resonance properties to which the organic components of chlorophyll is responsible for photoreduction and the photochemical breakdown of water are attuned, is vital for the process of photosynthesis (Bergmann, 1992). Apart from this, magnesium is of importance mainly as a cofactor and activator for many enzymes and substrate transfer reactions. According to Gunther (1981) about 300 enzyme reactions are influenced by Mg ions. When magnesium is passed on to the silkworms, it accelerates the growth of silkworms through orientation of physiological activities, thereby reducing the larval duration and silk content, increasing the oviposition rate in the adult (Thangavelu and Bania, 1990). Viswanath and Krishnamurthy (1982) reported that silkworm larvae fed with Mg (8 kg/ha) sprayed leaves resulted in better cocoon yield (40 kg/ha) and mean cocoon weight (1.54 g), as compared to control. Poor growth and post cocoon parameters of the silkworm under Mg deficiency have been reported by Shankar *et al.*, (1994).

As in the case of Ca and Mg, all the morphological, physiological and biochemical parameters varied significantly with different doses of S (Table V). Highest leaf yield (27.63 g/plant) and leaf dry matter (8.08 g/plant) were obtained in the sulphur dose of 0.32%. Photosynthetic rate ($11.54 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stomatal conductance ($0.421 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$), intercellular CO_2 concentration (278.82 ppm) and transpiration rate ($0.0040 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were also found highest at 0.32% S. Leaf quality was also superior with 22.41% of leaf protein. The micro nutrients Zn, Cu, Mn and B levels were found to increase with the increase in S dose. At the critical level of 0.32% S, the levels of N, P, K, Ca, Mg and S were 3.84, 0.42, 2.03, 2.15, 0.47 and 0.36%, respectively, while Fe, Zn, Cu, Mn, and B levels were 221.47, 90.45, 11.69, 109.58, 33.86 ppm, respectively.

Sulphur is known to have an important role in the synthesis of proteins, oils and vitamins (Epstein, 1972). The involvement of sulphur in carbohydrate metabolism and formation of flavonoid compounds are well documented (Horst, 1995). It often in the form of oxidisable sulphyl (SH) groups, serves the active site of some redox and electron transfer agents. Sulphur content in the leaf also has a direct bearing on the silkworm cocoon crop. Radha *et al.* (1988) and Shankar *et al.* (1994) have found reduction in overall silkworm cocoon crop and in silk filament due to feeding of mulberry leaf having sulphur deficiency.

Hunger signs for nutrient deficiency in mulberry have been reported by Chakraborti *et al.* (1996). Singhal *et al.* (1999) have found N, Ca and Mn as the most critical elements required for the optimum leaf quality. An indirect correlation has been observed between the photosynthetic rate and the leaf yield by Chakraborti *et al.* (1997). In the present investigation, change in photosynthetic rate and chlorophyll content due to low or high nutrient contents may perhaps be the reason for the variation in leaf yield. Recent research in crop physiology suggests that total biomass production and the yield of different crops depend primarily on photosynthetic CO_2 assimilation (Menon and Srivastava, 1984).

In the present investigation, the protein content varied significantly under different doses of secondary nutrients. Fukuda *et al.* (1960) found that about 70% of the silk protein produced by the

silkworm is directly derived from the protein of the mulberry leaves. The protein content of the mulberry leaves is directly correlated with production efficiency of cocoon shell in silkworms (Machii and Katagiri, 1991). As different minerals have a role to play in silkworm nutrition, the optimum use of nutrient becomes inevitable (Singhal & Mala, 1998; Singhal *et al.*, 1998).

To conclude, based on the physiological, biochemical parameters and nutrients status of the leaf, 0.25% calcium, 0.15% magnesium and 0.32% sulphur were found to be the critical levels of secondary nutrients required for optimum leaf yield and quality in mulberry.

REFERENCES

- ARSENYEV A. F., BROMLEY N. V. & SELINOVA T. V. (1957). Manganese and copper in mulberry and oak leaves. Transactions of Moscow Veterinary Academy. 21: 223 - 231.
- BAKER D. E. & SUHR N. H. (1982). Atomic absorption and flame emission spectrometry, pp13 - 28. In: Methods of soil analysis. part 2. Chemical and microbiological properties. No. 9 (Eds.) A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney. Agronomy Amer. Soil Sci. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- BARDSLEY C. S. & LANCASTER J. D. (1960). Determination of reserved sulphur and soluble sulphates in soils. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 24: 265 - 268.
- BERGMANN W. (1992). Nutritional disorders of plants - Development, visual and analytical diagnosis. Gustav Fischer, New York.
- BHARGAVA B. S. & CHADHA K. L. (1988). Leaf nutrient guide for fruit and plantation crops. Fertilizer News. 33: 21 - 29.
- BIDWELL R. G. S. (1979). Plant Physiology, Macmillan Publishing Co. Inc., New York.
- CHAKRABORTI S., SINGHAL B. K. & SINGHVI N. R. (1997). Correlation of morpho physiological and biochemical parameters with leaf yield. Final report, CSRTI, Mysore.
- CHAKRABORTI S., SUBRAMANYAM M. R., SINGHAL B. K. & DATTA R. K. (1996). Nutrient deficiency management in mulberry - A key for identification of hunger signs. CSRTI, Mysore, India.
- EPSTEIN E. (1972). Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. John Wiley and sons, Inc. New York - London - Sydney - Toronto.
- FUKUDA T. (1960). The correlation between the mulberry leaves taken by the silkworms, the silk protein in the silk gland and the silk filament. Bull. Sericult. Exp. Sta. 15: 595 - 610.
- GOWDA D. W. & ANJANEYA (1993). A study on adoption behaviour of big, small and marginal sericulturists and their characteristics in Kolar district. STS dissertation. ICTRETS, Mysore.
- GUNTHER Th. (1981). Biochemistry and pathobiochemistry of magnesium. Magnesium Bull. 3, H.1a: 91 - 101.
- HISCOX J. D. & ISRAELSTAM G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from tissues without maceration. Can. J. Bot. 57: 1332 - 1334.
- HORST MARCSCHNER (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic press, London.
- KANWAR J. S. (1978). Soil fertility, theory and practice. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- MACHII H. & KATAGIRI K. (1991). Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworms. JARQ. 25: 202 - 208.
- MENON K. K. G. & SRIVASTAVA H. C. (1984). Increasing plant productivity through improved photosynthesis. Proc. Indian Acad. Sci. (Pl. Sci.) 93: 339 - 378.
- MIYASHITA V. (1986). A report on mulberry cultivation and training methods suitable to bivoltine rearing in Karnataka. pp. 1 - 7.
- OLSEN S. R. & SOMMERS L. E. (1982). Phosphorus. pp 403 - 430. In: Methods of soil analysis. part 2. Chemical and microbiological properties. No. 9 (Eds.) A. L. Page, R. H. Miller & D. R. Keeney. Agronomy Amer. Soc. Soil Sci. Inc., Madison, Wisconsin, USA.

- RADHA N. V., NAGARAJAN P. & JAYARAJ S. (1988). Mineral deficiency in mulberry plants, *Morus L.* and its effect on economic characters of silkworm, *Bombyx mori L.* Madras Agric. J. 75: 384 - 390.
- SHANKAR M. A., SHIVASHANKAR K. & DEVAIAH M. C. (1994). Effect of feeding mulberry leaves deficient in secondary nutrients on larval growth, development, cocoon weight and silk quality. *Sericologia*, 34: 511 - 518.
- SINGHAL B. K. & MALA V. R. (1998). An insight into silkworm's food. *The Indian Textile J.* 108: 86 - 88.
- SINGHAL B. K., MALA V. R. & VINEET KUMAR (1998). Indian Sericulture - Problems and Prospects. *Modern Textile J.* (37 - 45).
- SINGHAL B. K., MALA V. R., SARKAR A. & DATTA R. K. (1999). Nutritional disorder of mulberry. II. Leaf nutrient guide for N, P and K. *Agro Annual Meeting China 99. Plant Protection and Plant Nutrition. China.*
- SINGHAL B. K., MALA V. R. & CHAKRABORTI S. (1999). Nutritional disorders of mulberry (*Morus spp.*) I. Physiological and biochemical changes under deficiency. *Philippine J. Sci.* (in press).
- SUBBURATHINAM K. M. & SULOCHANA CHETTY J. (1991). Effect of fortification of mulberry leaves with minerals to silkworms, *Bombyx mori L.* *Indian J. Seric.* 30: 121 - 123.
- SUBBURATHINAM K. M., KRISHNAN M. & SULOCHANA CHETTY J. (1993). Effects of minerals on the bioenergetics of the silkworm *Bombyx mori*. *Sericologia* 33: 509 - 514.
- THANGAVELU K. & BANIA H. R. (1990). Preliminary investigation on the effects of minerals in the rain water on the growth and development of silkworm, *Bombyx mori L.* *Indian J. Seric.* 29: 37 - 43.
- VISWANATH A. P. & KRISHNAMOORTHY K. (1982). Effect of foliar spray of micro - nutrients on the larval development and cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori L.* *Indian J. Seric.* 21 - 22: 1 - 6.

DESORDRES NUTRITIONNELS CHEZ LE MURIER (*MORUS* SPP.) III. UN GUIDE DES ALIMENTS DES FEUILLES POUR LES SUBSTANCES NUTRITIVES SECONDAIRES

B. K. SINGHAL*, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R. K. DATTA

Laboratory of Mulberry Physiology, Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore -570 008 Inde.

*Les facteurs responsables d'une bonne récolte de cocons de vers à soie (*Bombyx mori* L.) sont : les feuilles de mûrier (*Morus* spp.) (38,2 %), le climat (37,0 %), les techniques d'élevage (9,3 %), la race des vers à soie (4,2 %), les œufs de vers à soie (3,1 %) et d'autres facteurs (8,2 %). L'économie ou la rentabilité de la sériciculture dépend principalement de la qualité des feuilles produites. Diverses études sur la nutrition des vers à soie ont établi l'importance de la qualité des feuilles pour la croissance et le développement des vers à soie et la production globale de soie. Le mûrier est un arbre pérenne, qui une fois mis en terre peut produire des feuilles pendant plus de dix ans. En raison des cueillettes répétées des feuilles, de grandes quantités de nutriments du sol viennent à s'épuiser, causant à leur tour des désordres nutritionnels. Dans plusieurs régions, les champs de mûrier sont soit sous-amendés, soit sur-amendés en raison de la non disponibilité d'informations véritables sur le seuil critique des nutriments requis (en dessous duquel le rendement est limité et au-dessus duquel l'utilisation d'engrais est toxique ou non rentable). L'analyse des feuilles est considérée comme étant la meilleure méthode pour vaincre de tels désordres nutritionnels. En se basant sur les paramètres physiologiques et biochimiques ainsi que sur le statut des nutriments des feuilles, nous montrons que les niveaux critiques des besoins nutritionnels pour une qualité et un rendement optimum des feuilles sont 0,25 % de calcium, 0,15 % de magnésium et 0,32 % de soufre. Ces résultats peuvent servir en tant que guide d'alimentation pour les nutriments secondaires du mûrier ainsi que comme indications pour de plus amples recherches sur la nutrition des vers à soie.*

INTRODUCTION

Les différents facteurs responsables d'une récolte de cocons réussie sont : la feuille de mûrier (38,2 %), le climat (37,0 %), les techniques d'élevage (9,3 %), la race des vers à soie (4,2 %), les œufs de vers à soie (3,1 %) ainsi que d'autres facteurs (8,2 %) (Miyashita, 1986). Ainsi, l'économie ou la rentabilité de la sériciculture dépend principalement de la qualité des feuilles produites. Diverses études sur la nutrition des vers à soie ont établi les influences de la qualité des feuilles sur la croissance et le développement des vers à soie et leur importance dans la production globale de la soie (Subburathinam et Chetty, 1991 ; Subburathinam et coll., 1993 ; Shankar et coll., 1994 ; Singhal et Mala, 1998 ; Singhal et coll., 1998).

Le mûrier est un arbre pérenne, qui une fois planté peut produire sans interruption pendant plus de dix ans. En raison des cueillettes répétées des feuilles, de grandes quantités de nutriments s'épuisent du sol, causant à leur tour des désordres nutritionnels.

* Adresse actuelle : Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu - 181 101, J & K, Inde.

Dans de nombreuses régions, les champs de mûrier sont sous-amendés, alors que dans d'autres, ils sont sur-amendés (Gowda, 1993).

Les carences du sol en nutriments secondaires, dues à la culture intensive et la toxicité due à l'application de hautes doses d'engrais limitent la potentialité du rendement et affectent la qualité des feuilles, qui à son tour affecte la production de cocons.

Les carences en nutriments secondaires (Ca, Mg et S) exercent une influence défavorable sur la croissance larvaire des vers à soie, leur développement, le poids des cocons et la qualité de la soie (Shankar et coll., 1994).

Des informations sur le seuil critique des substances nutritives requises pour obtenir un rendement optimum de feuilles de mûrier de qualité, qui seraient basées sur les paramètres physiologiques et biochimiques et le statut des aliments des feuilles ne sont pas disponibles. L'application de doses faibles ou élevées de nutriments autres que les doses requises conduit à une déficience d'autres aliments (soit par carence, soit par toxicité), ce qui influence divers processus physiologiques et biochimiques. Les analyses de feuilles sont la meilleure méthode pour déterminer le seuil critique des besoins en nutriments des plants, d'après Bhargava et Chadha (1988). Le seuil critique est la teneur d'un élément donné dans les feuilles, en-dessous de laquelle le rendement est limité et au-dessus de laquelle l'utilisation d'engrais est toxique ou non rentable. L'étude actuelle a été menée afin de déterminer le niveau critique des besoins en Ca, Mg et S. Un guide des besoins en nutriments N, P et K a été fourni par les auteurs (Singhal et coll., 1999).

MATERIELS ET METHODES

La variété de mûrier bien connue Kanva-2, a été plantée en plaçant des boutures dans des pots Wagner remplis d'un sable de granite blanc, sans aucun nutriment, sous serre et en maintenant une température ambiante de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Les pots ont été arrosés avec de l'eau déminéralisée jusqu'au 120ème jour, puis ils furent taillés. Trente jours après la taille, 10 doses de calcium (sous la forme de CaCl_2) et de magnésium (sous la forme de MgSO_4), à savoir 0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30 ; 0,35 ; 0,40 ; 0,45 et 0,50 % ont été administrées aux différents traitements. De manière similaire, différentes doses de soufre, à savoir 0,02 ; 0,04 ; 0,08 ; 0,16 ; 0,20 ; 0,24 ; 0,28 ; 0,32 ; 0,36 et 0,40 % (sous la forme de K_2SO_4) ont été administrées aux différents traitements. Une solution de Hoagland a été administrée à tous les traitements en éliminant soit le calcium, le magnésium ou le soufre en fonction du traitement. Huit répétitions ont été maintenues pour chacun des traitements. Soixante dix jours après la taille, les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été enregistrés. Les feuilles ont été analysées pour le statut des substances nutritives majeures, pour les substances secondaires et pour les substances mineures. La photosynthèse, la conductance des stomates, la concentration intracellulaire en CO_2 et le taux de transpiration ont été mesurés à l'aide du système de photosynthèse portable LICOR - 6200. La méthode de Hiscox et Israelstam (1979) a été suivie pour l'analyse des chlorophylles 'a' et 'b', alors que la teneur en protéines a été évaluée à l'aide du système tecator autokjeltec.

Pour l'analyse des feuilles, le Ca, le Mg, le Fe, le Zn, le Cu, le Mn et le B ont été évalués en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique à faisceau double GBC 902. Le tecator autokjeltec a été utilisé pour l'évaluation de l'azote. Le phosphore a été évalué grâce à la méthode colorimétrique (Olsen et Sommers, 1982), le potassium avec un photomètre à flamme (Baker et Suhr, 1982) et le soufre par la méthode turbidimétrique (Bardsley et Lancaster, 1960). Les données obtenues de tous les paramètres ont été analysées statistiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques et l'analyse des feuilles en substances alimentaires principales, secondaires et mineures sous des doses différentes de Ca, de Mg et de S sont présentés dans les Tableaux I à VI.

Tous les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques varient avec des doses différentes de calcium (Tableau I). Bien que la hauteur de la plante, le nombre de feuilles par plante, la surface totale des feuilles par plantes, le rendement en feuilles et la matière sèche des feuilles les plus élevées aient été enregistrés sous la dose de calcium à 0,30 %, il n'y a pas de différence significative entre 0,25 et 0,30 % de calcium. Le rendement en feuilles le plus important : 28,79 g / plante a été obtenu avec la dose de calcium à 0,30 % suivi de 28,72 g / plante avec 0,25 % de calcium, la différence entre les deux traitements n'étant pas significative. De manière similaire, le taux de photosynthèse de $9,22 \mu \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et le taux de transpiration de $0,0027 \mu \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ont été enregistrés avec le traitement à 0,25 % de calcium et les valeurs non significativement différentes furent enregistrées à 0,25 et 0,30 %. Parmi les paramètres biochimiques, la teneur la plus forte en chlorophylle 'a' (1,743 mg / g) est obtenue avec le traitement à 0,35 % de calcium. Cependant, la chlorophylle 'b' et le pourcentage de protéines sont plus élevés à 0,30 % de calcium, mais la différence entre 0,20 ; 0,25 et 0,30 % de calcium n'est pas significative. L'analyse des feuilles révèle une variation du statut des nutriments sous différentes doses de calcium (Tableau II). A des doses faibles de calcium, une absorption importante de tous les micronutriments a été observée, alors que l'absorption est moins importante à des doses plus élevées de calcium.

Les données indiquent que la dose de calcium à 0,25 % représente le seuil critique des besoins pour un rendement en feuilles et une qualité de feuilles optimum, au-delà duquel une toxicité a été observée. A une dose de 0,25 % de calcium, les niveaux en N, P, K, Ca, Mg, et S sont de 3,80 ; 0,39 ; 2,03 ; 2,02 ; 0,48 et 0,32 %, respectivement. Le statut des micronutriments pour Fe, Zn, Cu, Mn et B sont de 220,81 ; 90,15 ; 12,90 ; 107,46 et 32,07 ppm, respectivement.

Le calcium joue un rôle important dans la synthèse de la pectine dans la lamelle moyenne des parois cellulaires. Sa carence est responsable de la mitose incomplète des cellules sans formation d'une nouvelle paroi cellulaire, ce qui résulte en la formation de cellules polynucléaires (Bidwell, 1979). Le calcium est considéré essentiel pour la croissance des tissus méristématiques et pour le fonctionnement des pointes des racines (Kanwar, 1978). Quand il passe à l'intérieur du ver à soie, 60 % du calcium ingéré est retrouvé dans la soie extraite (Arsenyev et coll., 1957). L'enrichissement des feuilles de mûrier avec du chlorure de calcium à 1 % peut augmenter les caractéristiques des cocons tels que le poids des cocons (11,42 %), le poids des coques (16,75 %), la richesse soyeuse (6,7 %) et les protéines de soie, c'est à dire la fibroïne (4,85 %) et la sérécine (9,32 %), selon Subburathinam et Chetty (1991). L'augmentation de la croissance larvaire a également été observée lorsque les feuilles de mûrier sont fortifiées en hydroxyde de calcium (Subburathinam et coll., 1993).

L'ensemble des paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques diffèrent selon les différents traitements de magnésium (Tableau III). Le rendement en feuilles (33,38 g / plant) et en matière sèche des feuilles (9,65 g / plant) les plus importants ont été enregistrés pour le traitement à 0,20 % de magnésium, mais ils ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec 0,15 %. Les paramètres physiologiques et biochimiques sont également améliorés avec les traitements à 0,20 % de magnésium, mais ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec 0,15 %. Des valeurs élevées en chlorophylle 'a' (1,826 mg / g), en chlorophylle 'b' (0,663 mg / g) et en protéines (21,24 %) ont été enregistrées pour la dose de magnésium à 0,15 %. Elles ne sont pas significativement faibles par rapport à celles obtenues avec la dose à 0,20 %. L'analyse des feuilles révèle que les niveaux en N et P augmentent avec l'augmentation des doses de magnésium, puis diminuent progressivement lorsque les niveaux sont supérieurs (Tableau IV). Les changements des niveaux de S, Cu et B ne sont pas significatifs. De hautes teneurs en K, Ca et Mn ont été remarquées avec de faibles doses de Mg. Elles diminuent avec l'augmentation des niveaux de magnésium. Les

teneurs en N, P, Fe et Zn augmentent avec l'augmentation initiale des doses de magnésium, mais diminuent ensuite avec des doses de magnésium plus élevées. Au seuil critique de 0,15 % de magnésium, les niveaux en N, P, K, Ca, Mg et S sont de 3,79 ; 0,37 ; 2,04 ; 2,12 ; 0,40 et 0,34 %, respectivement. Les niveaux de 216,17 ; 83,98 ; 12,62 ; 112,52 et 37,19 ppm ont été enregistrés pour le Fe, le Zn, le Cu, le Mn et le B, respectivement.

Le magnésium est l'atome central de la chlorophylle. Il a des propriétés spécifiques de résonance électronique qui permettent aux composants organiques de la chlorophylle la photoréduction, ainsi que la décomposition photochimique de l'eau. Il est donc vital dans le processus de la photosynthèse (Bergmann, 1992). En outre, le magnésium est important, principalement en tant que cofacteur et activateur de plusieurs enzymes et de réactions de transfert des substrats. Selon Gunther (1981), environ 300 réactions enzymatiques sont influencées par les ions magnésium. Lorsque le magnésium passe à l'intérieur des vers à soie, il accélère leur croissance en orientant les activités physiologiques, en réduisant la durée de la période larvaire et la teneur en soie, en augmentant le taux de ponte chez l'adulte (Thangavelu et Bania, 1990). Viswanath et Krishnamurthy (1982), rapportèrent que les larves de ver à soie nourries avec des feuilles vaporisées de magnésium à raison de 8 kg / ha, donnaient un meilleur rendement en cocons (40 kg / ha) et une moyenne de poids des cocons (1,54 g) supérieure à celle des témoins. La faible croissance et les paramètres post cocons des vers à soie en carence de magnésium ont été étudiés par Shankar et coll., (1994).

Les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques varient de manière significative avec différentes doses de S, comme dans le cas de Ca et de Mg (Tableau V). Le rendement en feuilles (27,63 g / plant) et en matière sèche des feuilles (8,08 g / plant) les plus élevés ont été obtenus avec une dose de soufre à 0,32 %. Le taux de photosynthèse ($11,54 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la conductance des stomates ($0,421 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la concentration en CO_2 intracellulaire (278,82 ppm) et le taux de transpiration ($0,0040 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sont également les plus élevés avec une dose de soufre de 0,32 %. La qualité des feuilles est également supérieure avec 22,41 % de protéines de feuilles. Les niveaux des micronutriments Zn, Cu, Mn et B augmentent avec l'augmentation de la dose de soufre. Au seuil critique de 0,32 % de soufre, les niveaux de N, P, K, Ca, Mg et S sont de 3,84 ; 0,42 ; 2,03 ; 2,15 ; 0,47 et 0,36 %, respectivement, alors que les niveaux de Fe, Zn, Cu, Mn et B sont de 221,47 ; 90,45 ; 11,69 ; 109,58 ; 33,86 ppm, respectivement.

Le soufre est connu pour jouer un rôle important dans la synthèse des protéines, des huiles et des vitamines (Epstein, 1972). L'implication du soufre dans le métabolisme des hydrates de carbone et dans la formation des composés flavonoïdes est bien documentée (Horst, 1995). C'est souvent sous la forme de groupes sulphyd oxydables (SH) qu'il sert de site actif des agents d'oxydo-réduction et de transfert des électrons. La teneur en soufre des feuilles a une influence directe sur la récolte de cocons de vers à soie. Radha et coll., (1988) et Shankar et coll., (1994) ont remarqué une diminution sur la récolte globale des cocons de vers à soie ainsi que sur la bave lorsque les vers à soie étaient nourris de feuilles de mûrier carencés en soufre.

Les signes de carence en nutriments chez le mûrier ont été rapportés par Chakraborti et coll., (1996). Singhal et coll., (1999) ont remarqué que le N, le Ca et le Mn sont les éléments les plus cruciaux requis pour une qualité optimale des feuilles. Une corrélation indirecte a été observée entre le taux de photosynthèse et le rendement en feuilles par Chakraborti et coll., (1997). Dans l'étude actuelle, les changements du taux de photosynthèse et de la teneur en chlorophylle, dus à des teneurs faibles ou élevées en nutriments, pourrait être la raison de la variation du rendement des feuilles. Des recherches récentes sur la physiologie des récoltes suggèrent que la production totale de la biomasse et le rendement des différentes cultures dépendent principalement de l'assimilation photosynthétique du CO_2 (Menon et Srivastava, 1984).

Dans l'étude actuelle, la teneur en protéines varie de manière significative sous différentes doses de nutriments secondaires. Fukuda et coll., (1960) remarquèrent qu'environ 70 % des protéines de soie produites par les vers à soie sont directement issues des protéines des feuilles de mûrier. La teneur en protéines des feuilles de mûrier est en corrélation directe avec l'efficacité de la production des

coques des cocons chez les vers à soie (Machii et Katagari, 1991). Puisque les divers minéraux ont un rôle à jouer dans la nutrition des vers à soie, l'utilisation optimale des nutriments devient incontournable (Singhal & Mala, 1988 ; Singhal et coll., 1998).

En conclusion, sur les bases des paramètres physiologiques et biochimiques et les statuts des nutriments des feuilles, 0,25 % de calcium, 0,15 % de magnésium et 0,32 % de soufre sont les seuils critiques des nutriments secondaires requis si l'on veut optimiser le rendement et la qualité des feuilles de mûrier.

VARIATION IN THE POPULATION OF NITROGEN FIXERS AND OTHER MICROFLORA IN THE PHYLLOPLANE AND RHIZOSPHERE OF MULBERRY (*MORUS ALBA*) AS INFLUENCED BY SHOOT AGE AND SEASON

P. SUDHAKAR*, G. N. CHATTOPADHYAY¹, S. K. GANGWAR, J. K. GHOSH & B. SARATCHANDRA

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

1. Palli Siksha Bhavana (Institute of Agriculture), Visva - Bharati University, Sriniketan - 731 236, India.

The changing pattern of microbial population on the phylloplane and rhizosphere of mulberry plants was studied with respect to shoot age (after pruning). It was observed that the population of nitrogen fixing bacteria (NFBs), other bacteria and fungi, were relatively low on the leaf surface at 30 and 45 days after pruning (DAP) and the same gradually increased with the age of the shoot (60, 75 and 90 DAP). It was also found that the number of nitrogen fixing microflora on the phylloplane were more during rainy season followed by summer and least during winter. The other two groups of microorganisms (other bacteria and fungi) were more during summer followed by rainy indicating more or less opposite trend to that of NFBs. No marked difference was observed in the rhizosphere population of these microbial groups in relation to shoot age. However, the population of nitrogen fixers and fungi in rhizosphere was significantly less during winter season, while all the three groups of microflora were similar during other two seasons. Rhizosphere did not exhibit any specific trend of relationships among the three groups of microorganisms.

Keywords: Nitrogen fixers, microflora, phylloplane, rhizosphere, mulberry

INTRODUCTION

Plants harbor a variety of microorganisms. Many of them are beneficial to plants. Others are harmful. Beneficial microorganisms basically fall under the two major categories (i) those which support or supply nutrients to the plants and ii) those which protect the plants from parasites (antagonistic bacteria, fungi etc.). The beneficial microorganisms compete with other microbes and are influenced by abiotic factors. Thus, there is a complex interaction system amongst plant, abiotic factors and microorganisms. Significant fluctuations in these biological activities are observed at two sites namely phylloplane and rhizosphere (Rangaswami, 1988). Various factors have been studied which influence microbial population both on phylloplane and rhizosphere of plants. Ruinen (1974) and Shishiyama *et al.* (1970) have reported that the phylloplane microorganisms may utilize cuticle using lypolytic enzymes produced by them. Leaf leachates form major source of carbohydrates, proteins, organic acids, phenolics, alkaloids, vitamins, growth regulating substances, phytoalexins and volatiles (Tukey, 1971). Lipids and waxes present on the plant leaves also contribute to microbial nutrients after hydrolysis (Tsuchii *et al.*, 1981). Similarly, the spectrum of chemicals exuded by the

* Corresponding author

plant roots also influence the rhizosphere microflora of the plant. Moreover the root activities are equally influenced by the plant age, its physiological and nutritional conditions, aerial canopy, various physio-chemical and biological properties of the soil (Rangaswami, 1988). Plant age factor in influencing microbial population has been studied in seasonal crops like jute, wheat and rice (Pati and Chandra, 1980). Such studies on perennial plants are scanty, possibly because the foliage in such plants changes every year.

Mulberry is a perennial arboreal plant which is cultivated for leaf production to feed silkworms. For optimum and quality leaf production, the plants are maintained as low bushes by resorting to regular pruning of shoots. The time interval between two consecutive prunings vary from 70 to 120 days depending upon environmental conditions and mode of leaf utilization. During this period, fresh leaves pass through a series of maturity stages and may give a definite trend to phylloplane microbial population during the course of these changes. Considering the views of Rangaswamy (1988), this change in shoot biology may also influence root biology thereby changing rhizosphere microflora.

During the last decade, there have been efforts on exploring nitrogen fixing bacteria as biofertilizers for mulberry (Das *et al.*, 1990; Dayakar Yadav & Nagendrakumar, 1992; Gangwar and Thangavelu, 1992). To understand when the plants are best colonized or to utilize the isolated nitrogen fixers as biofertilizers, it is extremely important to know the ideal age of the host plants as also the season when these intruders can best thrive. It may be highly rewarding if these biofertilizers are sprayed or applied at a time when potentiality of their growth on the target locale is high. Hence the present study was undertaken with an overall objective of exploring nitrogen fixers as biofertilizers in mulberry crop.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry garden of variety S₁ was raised at Agronomy farm of Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, (24°6' N & 88°15' E) with 60 x 60 cm spacing and recommended agronomical package for irrigated farming in West Bengal. The garden was pruned 4 times in a year so as to synchronize with the commercial silkworm rearing seasons (Subba Rao, 1989). The plants were allowed to grow for 3 years to stabilize the initial growth stage. Composite samples of tender, medium and mature leaves were collected at 30, 45, 60, 75 and 90 days after pruning (DAP), during winter, summer and rainy seasons. Leaf discs (1.2 cm in diameter and 50 numbers) were cut with the help of a cork borer immediately after collection, placed in 50 ml sterilized distilled water, taken in 150 ml flasks and agitated for 30 minutes on a magnetic stirrer and diluted suitably by 10 fold. Simultaneously rhizosphere soil samples were also collected. The sampled soil was air dried under shade to remove excess moisture and sieved (passed through a 100 mesh). Soil samples (10 g each) were added to 90 ml sterilized water and agitated for 30 minutes. Both the dilutions prepared from leaf washings and soil samples were plated on Burk's medium (Subba Rao, 1986) to enumerate nitrogen fixing bacteria. For enumeration of other bacteria and fungi the dilutions were plated on nutrient agar (NA) and potato dextrose agar (PDA) medium respectively. The plates were incubated at 28 ± 2° C for 4 - 7 days depending on the type of microorganisms. The population of various groups of organisms was counted and expressed in number/cm² leaf area for phylloplane and by g⁻¹ soil for rhizosphere microorganisms. While counting other bacteria in NA medium the colonies of nitrogen fixers were excluded.

RESULTS

Data presented in Table I show that there was a gradual increase in the population of nitrogen fixing bacteria (NFBs) with the shoot age and the maximum population (3.994×10^3 / cm² area) was recorded on the foliage at 90 DAP. NFB population was found more during rainy season (3.780×10^3) followed by summer (3.293×10^3) and least in winter (1.821×10^3). Significant interaction

between shoot age and season indicated that the impact of shoot age on NFB population was not the same and varied during different seasons. The trend of population of other bacteria and fungi in respect to shoot age was similar to that of NFB population except that the population of other bacteria at 30 and 45 DAP was not significantly different. Similarly the fungal population at 60 and 75 DAP was also non-significant. Unlike the nitrogen fixers, the populations of other bacteria and fungi were more during summer (18.648×10^3 and 1.505×10^3 respectively) followed by rainy (16.973×10^3 and 1.357×10^3 respectively). The winter season recorded least population (8.003×10^3 and 0.316×10^3 respectively) of all the studied groups of microorganisms.

The population of these microbial groups in rhizosphere was not affected by shoot age (Table II). However, there was significant difference in the population of NFBs and fungi during different seasons. NFB population in rhizosphere was similar during rainy ($3.840 \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$) and summer (3.720×10^6) while the same during winter was significantly low (3.160×10^6). There was no significant difference in the population of other bacteria in respect to shoot age as also the season. The fungal population was also not affected by shoot age though their population was significantly more during rainy and summer seasons as compared to winter. The population of three groups of microorganisms during different seasons showed more or less similar trend indicating that the nitrogen fixers grow freely in rhizospheric zone without being affected by other two groups of microorganisms during different seasons.

DISCUSSION

Increase in the microbial population with the shoot age might be due to three major factors. (i) Continuous deposition of propagules from air to leaf surface, (ii) repeated multiplication of microorganisms on leaf surface and (iii) gradual change in the nutritional status on the surface of mulberry leaves with the shoot age (Mc Bride and Hayes, 1977; Sukumar and Ramalingam, 1986; Ruinen, 1965). There is evidence that matured leaves contain more soluble sugars (Mazumder *et al.*, 1996) and minerals (Sinha *et al.*, 1993) for their growth and development and these factors increase with the age of the plant (Mazumder *et al.*, 1996), but protein content in matured mulberry leaves gets reduced with their age (Sinha *et al.*, 1993; Bongale *et al.*, 1997). Further, Bongale *et al.* (1997) have reported even reduction in carbohydrates with the maturity of mulberry leaves. Thus nutrient status alone can not be considered as contributing factor for microbial growth. Viewing mode of nutrition of phylloplane microorganisms, it is known that these microbes take nutrients from surface and not from within the leaf tissue. These nutrients on leaf surface are available in the form of leaf leachates which contain various carbohydrates, proteins and lipids (Sen, 1988). These nutrients are more easily leached in mature leaves (Tukey *et al.*, 1957). Besides leaf leachates, the microorganisms are reported to utilize cuticle wax (Tsuchii *et al.*, 1981; Hankin and Kolattukudy, 1968, 1969; Samanta *et al.*, 1986) and the cuticle thickness in mulberry increases with the age of leaves. These are indirect evidence in support of enhanced microbial population found in the present investigation.

Seasonal variation in phylloplane population of microorganisms is mainly due to abiotic factors (Ruinen, 1965). West Bengal being a hot and humid zone, there is ample development of microflora and seasonal variation of climatic factors are supposed to influence the activity of the same. Rainy season supports the microbial population by way of monsoon moisture whereas the winter season supports it by way of enhanced dew on leaf surface. High humidity encourages the formation of dew resulting in a regular leaching of plant metabolites particularly carbohydrates, some aminoacids and minerals (Tukey *et al.*, 1957) which may favour the phylloplane microflora during rainy and winter seasons as was found in the present study. Summer being comparatively hot and dry, there is no sufficient moisture on leaf surface to support the microbial activities (Laben and Daft, 1967).

Table I. Effect of mulberry shoot age (after pruning) on phylloplane population of N_2 - fixers, total bacteria and fungi.*Tableau I. Effet de l'âge des pousses de mûrier (après la taille) sur la population des fixateurs d'azote, des bactéries totales et des champignons, sur la surface des feuilles.*

Shoot age (DAP)/	Seasons/Saisons			Mean/Moyenne
<i>Age des pousses (Jours après la taille)</i>	Winter/Hiver	Summer/Été	Rainy/Saison des pluies	
Nitrogen fixers/Fixateurs d'azote ($\times 10^3 / \text{cm}^2$)				
30	0.178	2.632	2.597	1.802
45	1.057	2.875	2.851	2.261
60	2.215	3.013	3.869	3.032
75	2.641	3.844	4.716	3.734
90	3.012	4.102	4.869	3.994
Mean / Moyenne	1.821	3.293	3.780	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	0.204	0.158	0.353	
SE $\pm$	0.072	0.056	0.125	
Total bacteria/Bactéries totales ($\times 10^3 / \text{cm}^2$)				
30	5.980	15.413	14.842	12.078
45	6.021	16.216	15.153	12.463
60	6.785	18.342	15.829	13.652
75	8.917	20.142	16.814	15.291
90	12.310	23.126	22.225	19.220
Mean / Moyenne	8.003	18.648	16.973	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	0.553	0.429	0.959	
SE $\pm$	0.195	0.151	0.338	
Fungi/Champignons ($\times 10^3 / \text{cm}^2$)				
30	0.178	0.219	0.166	0.188
45	0.201	0.391	0.719	0.437
60	0.310	1.899	1.897	1.369
75	0.356	2.120	1.986	1.487
90	0.535	2.895	2.019	1.816
Mean/Moyenne	0.316	1.505	1.357	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	0.106	0.082	0.183	
SE $\pm$	0.037	0.029	0.065	

DAP = Days After Pruning / *Jours après la taille*. **CD** = Critical Difference / *Différence critique*.**SE** = Standard Error / *Ecart-type*.

Table II. Effect of mulberry shoot age (after pruning) on rhizosphere population of N₂ - fixers, total bacteria and fungi.

Tableau II. Effet de l'âge des pousses de mûrier (après la taille) sur la population des fixateurs d'azote, des bactéries totales et des champignons, dans la rhizosphère.

Shoot age (DAP)	Seasons/Saisons			Mean/Moyenne
<i>Age des pousses</i> <i>Jours après la taille</i>	Winter/Hiver	Summer/Été	Rainy/Saison des pluies	
Nitrogen fixers (x 10⁶ / g soil) / Fixateurs d'azote (x 10⁶ / g sol)				
30	3.200	3.600	4.200	3.617
45	3.000	3.000	4.000	3.333
60	3.000	3.800	3.600	3.467
75	3.200	4.000	3.800	3.667
90	3.400	4.200	3.600	3.733
Mean/Moyenne	3.160	3.720	3.840	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	NS	0.491	NS	
SE ±	0.224	0.173	0.388	
Total bacteria (x 10⁶ / g soil) / Bactéries totales (x 10⁶ / g sol)				
30	8.400	7.400	7.000	7.600
45	7.800	6.600	7.200	7.200
60	6.600	7.800	7.200	7.200
75	6.800	7.800	7.000	7.270
90	7.600	8.000	8.800	8.130
Mean/Moyenne	7.440	7.520	7.480	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	NS	NS	NS	
SE ±	0.336	0.261	0.583	
Fungi (x 10⁴ / g soil) / Champignons (x 10⁴ / g sol)				
30	3.200	4.200	4.200	3.867
45	4.000	3.800	3.600	3.800
60	3.200	3.200	4.200	3.533
75	3.200	3.600	4.000	3.600
90	2.800	4.200	4.400	3.800
Mean/Moyenne	3.280	3.800	4.080	
	Shoot age	Season	Interaction	
	<i>Age des pousses</i>	<i>Saison</i>		
CD at 5%	NS	0.439	NS	
SE ±	0.200	0.155	0.346	

NS = Non significant / Non significatif. DAP = Days After Pruning / Jours après la taille. CD = Critical Difference / Différence critique. SE = Standard Error / Ecart-type.

In soil the main sources of nutrient for rhizospheric microbial activity are the root exudates and the dead root tissues. As there is not much variation in the mulberry root biomass with the change in its shoot age, it might be the cause for non - significant population of various groups of microorganisms. The seasonal variation of microbial population was however, evident which might be due to varying root activity with the change in soil environment during different seasons. Root activities are more influenced by soil temperature and moisture. In West Bengal temperature during summer is very high thus adversely affecting root and microbial activities. However, the same during winter and rainy seasons is within favorable limits for both root and microbial activities, but again the rainy season did not support better growth of microbial population. The reason for the same may be found out in the fact that over moisture (flooding) during rainy season has adverse impact on microbial growth. Further, the photoperiod is reported to have direct impact on mulberry root development (Ayuzawa *et al.*, 1972) and winter with comparatively clean sky might have supported the same, leading to indirect support for microbial activities. However, the same was not true for nitrogen fixers which perhaps grew better when there was less competition of other microflora in rainy and summer seasons. However, the actual soil - plant - microbe interactions in mulberry rhizosphere are yet to be established.

The present exercise has indicated the role of some biotic (shoot age) and abiotic (seasonal variation) factors in contributing towards population built up of diazotrophs and other microorganisms both on the mulberry phylloplane and in the rhizosphere. Rainy season with better colonization of diazotrophs and less competition of other bacteria and fungi can be utilized for efficient biofertilizer application in this season. For foliar application the shoot age between 30 - 40 days after pruning appears to be ideal because of less competition with other bacteria and fungi at this plant growth stage.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks are due to the colleagues of Agronomy and Soil Science Division for help and support in carrying out this work.

REFERENCES

- AYUZAWA C., SEKIDO I., YAMAKAWA K., SAKURAI U., KURATA W., YAGINUMA Y., TOKORO Y. (1972) In Handbook of silkworm rearing, Agricultural Technical Manual I. Fuzi Publi. Co., Ltd., Tokyo, Japan, 319 pp.
- BONGALE U. D., CHALUVACHARI, MALLIKARJUNAPPA R. S., NARAHARI RAO B. V., ANANTARAMAN M. N., DANDIN S. B. (1997) Leaf nutritive quality associated with maturity levels in fourteen important varieties of mulberry (*Morus spp.*) *Sericologia* 37, 71 - 81.
- DAS P. K., GHOSH A., CHOUDHURY P. C., KATIYAR R. S., SENGUPTA K. (1990) Response of irrigated mulberry to *Azotobacter* and *Azospirillum* biofertilizers under graded levels of nitrogen pp. 71 - 77. In Biofertilizer Technology Transfer. L. V. Gangawane (eds.) Associated pub. Co., New Delhi.
- DAYAKARYADAV B. R., NAGENDRAKUMAR T. D. (1992) Influence of *Azospirillum* on mulberry (*Morus alba* L.) Sapling production - Field experiment. *Indian J. Microbiol.*, 32, 317 - 321.
- GANGWAR S. K., THANGAVELU K. (1992) Evaluation of biofertilizers for establishment of mulberry (*Morus alba* L.) *Sericologia* 32, 173 - 181.
- HANKIN L., KOLATTUKUDY P. E. (1968) Metabolism of a plant wax paraffin (n - nonacosane) by a soil bacterium (*Micrococcus verificans*). *Journal Gen. Microbiology*, 51, 457 - 463.
- HANKIN L., KOLATTUKUDY P. E. (1969) Degradation of urosolic acid, a major component of apple wax by a *Pseudomonad* isolated from soil. *Journal Gen. Microbiol.*, 56, 151 - 156.
- LABEN C., DAFT G. C. (1967) Epiphytic bacteria and the germination of *Colletotrichum lagenarium* conidia on cucumber leaves. *Phytopathology*, 57, 527 - 529.

- MAZUMDER S. K., DUTTA R. N., KAR R., GHOSH J. K. (1996) Identification of individual components of sugars in mulberry and their variation in relation to diurnal rhythm, preservation and ageing of leaves. *Plant Physiol. and Biochem.*, 23, 91 - 93.
- MC BRIDE R. P., HAYES A. J. (1977) *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69, 39.*
- PATI B. R., CHANDRA A. K. (1980) Variation in the number of phyllospheric nitrogen fixers and other microflora in relation to age of the plant. *Cur. Sci.*, 49, 655 - 657.
- RANGASWAMI G. (1988) Soil - plant - microbe interrelationships, *Indian Phytopathol.*, 41, 165 - 172.
- RUINEN J. (1965) Nitrogen fixation in the phyllosphere. *Plant and Soil.*, 22, 375 - 394.
- RUINEN J. (1974) Nitrogen fixation in the phyllosphere. pp 121 - 167. In *Biology of Nitrogen Fixation*, A. Quispel (ed.), North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- SAMANTA R., DUTTA A. K., SEN S. P. (1986) The utilization of leaf wax by N₂ - fixing micro organisms on the leaf surface. *J. Agric. Sci. Camb.*, 107, 681 - 685.
- SEN S. P. (1988) Physiology of ectosymbiotic N₂ fixation on the leaf surface. In *Proceedings of the International Congress of Plant Physiology*, S. P. Sen (ed.), published by Society for Plant Physiology and Biochemistry, Water Technology Center, IARI, New Delhi, India, 1034 pp.
- SHISHIYAMA J., ARKAY F., AKAY S. (1970) *Plant Cell Physiol.* 11, 323.*
- SINHA U. S. P., SINHA A. K., SRIVASTAVA P. P., BRAHMACHARI B. N. (1993) Variation of chemical constituents in relation to maturity of leaves in mulberry varieties S₁ and K₂ under the agroclimatic conditions of Ranchi district. *Indian J. sericulture*, 32, 196 - 200.
- SUBBA RAO G. (1989) *Field Book of Sericulture for Extension Management*. CSRTI, Central Silk Board, Berhampore, India, 61 pp.
- SUBBA RAO N. S. (1986) *Biofertilizers in Agriculture*. 4th Print, Mohan Pramlani Publications. Oxford & IBH., New Delhi, 186 pp.
- SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986) Studies on the phylloplane microflora of mulberry. 1. Bacterial population on healthy leaves. *Sericologia*, 26, 535 - 543.
- TSUCHII A., SUZUKI T., FUKUOKA S. (1981) Microbial degradation of polyethylene oligomers. Report of the Fermentation Institute, Yatabe, 55, 35 - 40.
- TUKEY H. B. JR. (1971) Leaching of substances from plants. In *Ecology of Leaf Surface Microorganisms*. T. F. Preece and C.H. Dickinson (eds.), pp 67 - 80. Academic Press, New York.
- TUKEY H. B. JR., WITTER S. H., TUKEY H. B. (1957). *Science*, 126, 120.*

* Originals not seen.

VARIATIONS DANS LES POPULATIONS DE FIXATEURS D'AZOTE ET AUTRES MICROFLORES DE LA FEUILLE ET DE LA RHIZOSPHERE DU MURIER (*MORUS ALBA*) EN FONCTION DE L'AGE DES POUSSES ET DE LA SAISON

P. SUDHAKAR*, G. N. CHATTOPADHYAY¹, S. K. GANGWAR, J. K. GHOSH & B. SARATCHANDRA

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, Inde.
1. Palli Siksha Bhavana (Institute of Agriculture), Visva - Bharati University, Sriniketan - 731 236, Inde.

Le changement de spectre de la population microbienne de la feuille et de la rhizosphère des plants de mûrier a été étudié en fonction de l'âge des pousses (après la taille). Nous avons observé que les populations des bactéries fixatrices d'azote (NFBs), des autres bactéries et des champignons, étaient relativement faibles sur la surface des feuilles 30 à 45 jours après la taille (DAP), alors qu'elles augmentent avec l'âge de la pousse (60, 75 et 90 jours après la taille). Nous avons également remarqué que le nombre de microflores fixatrices d'azote sur le phylloplan était plus important pendant la saison des pluies, moins important en été et moindre en hiver. Les deux autres groupes de microorganismes (les autres bactéries et les champignons) sont plus nombreux en été, puis pendant la saison des pluies, ce qui indique une tendance plus ou moins opposée à celle des NFBs. Aucune différence marquante n'a été observée dans la population de la rhizosphère de ces groupes microbiens, en fonction de l'âge des pousses. Cependant, les populations des fixateurs d'azote et des champignons dans la rhizosphère sont significativement moins importantes en hiver, alors que les trois groupes de microflores sont semblables au cours des deux autres saisons. La rhizosphère n'exprime aucune tendance spécifique en ce qui concerne les relations entre les trois groupes de microorganismes.

INTRODUCTION

Les plantes abritent une variété de microorganismes. Beaucoup d'entre eux sont utiles aux plantes. D'autres leur sont nuisibles. Les microorganismes utiles aux plantes se classent en deux catégories (i) ceux qui permettent l'apport ou fournissent des nutriments aux plantes et (ii), ceux qui protègent les plantes des parasites (bactéries antagonistes, champignons etc...). Les microorganismes utiles sont en compétition avec d'autres microbes et sont influencés par des facteurs abiotiques. Ainsi, il existe un système d'interactions complexes à l'intérieur de la plante, entre des facteurs abiotiques et des microorganismes. Des fluctuations significatives de ces activités biologiques sont observées à deux endroits, à savoir sur la feuille et dans la rhizosphère (Rangaswami, 1988). Divers facteurs, qui influencent la population microbienne du phylloplan et de la rhizosphère des plantes ont été étudiés. Ruinen (1974) et Shishiyama et coll., (1970) ont rapporté que les microorganismes du phylloplan peuvent utiliser la cuticule à l'aide d'enzymes lypolitiques qu'ils produisent. Les rinçages de feuilles sont une source importante d'hydrates de carbone, de protéines, d'acides organiques, de phénols,

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

d'alcaloïdes, de vitamines, de substances de régulation de croissance, de phytoalexines et de substances volatiles (Tukey, 1971). Les lipides et les cires présents sur les feuilles des plantes sont également des sources de nutriments pour les microbes après hydrolyse (Tsuchii et coll., 1981). De manière similaire, le spectre des produits chimiques suintant des racines influence également la microflore de la rhizosphère de la plante. En outre, les activités de la racine sont également influencées par l'âge de la plante, ses conditions physiologiques et nutritionnelles, sa canopée aérienne et les différentes propriétés physio-chimiques et biologiques du sol (Rangaswami, 1988). L'influence du facteur âge de la plante sur la population microbienne a été étudiée lors des récoltes saisonnières du jute, du blé et du riz (Pati et Chandra, 1980). De telles études sur les plantes pérennes sont rares, probablement à cause du fait que le feuillage de ces plantes change chaque année.

Le mûrier est un arbre pérenne, cultivé pour la production de ses feuilles qui servent de nourriture aux vers à soie. Pour une production optimale de feuilles de qualité, les plants sont maintenus à l'état d'arbustes de petite taille, grâce à une taille régulière des pousses. L'intervalle de temps entre deux tailles varie de 70 à 120 jours, selon les conditions environnementales et le mode d'utilisation des feuilles. Lors de ce laps de temps, les feuilles fraîches passent par une série de stades de maturité et peuvent induire une certaine tendance pour la population microbienne du phylloplan au cours de ces changements. Lorsque l'on considère les vues de Rangaswamy (1988), ce changement dans la biologie des pousses pourrait également influencer la biologie des racines et par voie de conséquence, changer la microflore de la rhizosphère.

Lors de la dernière décennie, des efforts ont été faits dans l'exploration des bactéries fixatrices d'azote en tant qu'engrais biologiques du mûrier (Das et coll., 1990 ; Dayakar Yadav & Nagendrakumar, 1992 ; Gangwar et Thangavelu, 1992). Afin de comprendre à quel moment les plantes sont le plus colonisées ou dans le but d'utiliser les fixateurs d'azote isolés comme bioengrais, il est extrêmement important de connaître l'âge idéal des plantes hôtes ainsi que la saison pendant laquelle ces intrus se développent le mieux. Si ces engrais biologiques sont vaporisés ou appliqués lorsque la potentialité de croissance de la plante cible est élevée, le résultat pourra être très bénéfique. C'est pour cette raison que l'objectif global de l'étude actuelle est d'explorer les possibilités des fixateurs d'azote comme engrais biologiques sur les récoltes de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Un champ de mûrier de la variété S₁ a été cultivé à l'Agronomy Farm du Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, Bengale ouest, (24°6'N & 88°15'E) avec des espacements de 60 x 60 cm et une irrigation pratiquée selon les recommandations agronomiques destinées à l'irrigation des fermes dans le Bengale ouest. Les mûriers ont été taillés 4 fois par an afin d'être en synchronisation avec les saisons d'élevage des vers à soie (Subba Rao, 1989). La croissance des plants a été maintenue pendant 3 ans afin de stabiliser la phase initiale de croissance. Des échantillons composés de feuilles tendres, médium et matures ont été cueillis 30, 45, 60, 75 et 90 jours après la taille (DAP), en hiver, en été et pendant la saison des pluies. Cinquante disques de 1,2 cm de diamètre ont été découpés dans les feuilles immédiatement après la cueillette, à l'aide d'un appareil de perforation de liège. Ces disques ont été placés dans 50 ml d'eau distillée et stérilisée, mis dans des récipients de 150 ml et agités pendant 30 minutes sur un agitateur magnétique puis dilués dix fois. En parallèle, des échantillons de sol de la rhizosphère ont également été recueillis. Ces échantillons de sol ont été séchés à l'air, à l'ombre, afin de supprimer l'excès d'humidité, puis tamisés (passés à travers un tamis de 100). Les échantillons de sol (10 g chacun) ont été mélangés à 90 ml d'eau stérilisée, puis agités pendant 30 minutes. Les deux dilutions préparées à partir des lavages des feuilles et des échantillons de sol ont été déposées sur des boîtes de milieu de Burk (Subba Rao, 1986), afin de répertorier les bactéries fixatrices d'azote. Pour le dénombrement des autres bactéries et des champignons, les dilutions ont été déposées sur de l'agar nutritif (NA) et de l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA), respectivement. Les boîtes ont été incubées à une température de 28 ± 2° C

pendant 4 à 7 jours selon le type de microorganismes. Les populations des divers groupes d'organismes ont été dénombrées et exprimées en nombre / cm² de surface de feuilles pour le phylloplan et par g de sol pour les microorganismes de la rhizosphère. Au cours du comptage des autres bactéries sur le milieu NA, celui des colonies de fixateurs d'azote a été exclu.

RESULTATS

Les données présentées dans le Tableau I montrent qu'il y a une augmentation progressive de la population de bactéries fixatrices d'azote (NFBs) avec l'âge des tiges et qu'elle atteint son maximum ($3,994 \times 10^3$ / cm² de surface) sur le feuillage, 90 jours après la taille. On peut remarquer que la population de NFB est plus importante pendant la saison des pluies ($3,780 \times 10^3$), suivie par celle de l'été ($3,293 \times 10^3$) et moindre en hiver ($1,821 \times 10^3$). Une interaction significative entre l'âge des pousses et la saison indique que l'impact de l'âge des pousses sur la population de NFB, n'est pas le même et varie suivant les saisons. Du point de vue de l'âge des pousses, la tendance des populations des autres bactéries et des champignons, est similaire à celle de la population de NFB, exceptée en ce qui concerne les populations des autres bactéries à 30 et 45 jours après la taille, qui elles ne sont pas significativement différentes. De manière similaire, les populations des champignons à 60 et 75 jours après la taille ne sont pas significativement différentes. Contrairement aux fixateurs d'azote, les populations des autres bactéries et des champignons sont plus importantes en été ($18,648 \times 10^3$ et $1,505 \times 10^3$, respectivement), puis pendant la saison des pluies ($16,973 \times 10^3$ et $1,357 \times 10^3$ respectivement). Parmi tous les groupes de microorganismes étudiés, c'est en hiver que les populations les moins importantes furent enregistrées ($8,003 \times 10^3$ et $0,316 \times 10^3$, respectivement).

Les populations de ces groupes microbiens dans la rhizosphère ne sont pas affectées par l'âge des pousses (Tableau II). Cependant, il existe une différence significative chez la population de NFB et de champignons pendant les différentes saisons. La population de NFB dans la rhizosphère est similaire pendant la saison des pluies ($3,840 \times 10^6$ g⁻¹ de sol) et en été ($3,720 \times 10^6$), alors que les mêmes populations sont significativement moins élevées ($3,160 \times 10^6$) en hiver. Il n'y a pas de différence significative dans la population des autres bactéries du point de vue de l'âge des pousses et des saisons. La population fongique n'est pas non plus affectée par l'âge des pousses bien qu'elle soit significativement plus importante pendant la saison des pluies et en été par rapport à celle de l'hiver. Les populations des trois groupes de microorganismes pendant les différentes saisons montrent une tendance plus ou moins similaire, ce qui indique que les fixateurs d'azote croissent librement dans la zone rhizosphérique sans être affectés par les deux autres groupes de microorganismes au cours des différentes saisons.

DISCUSSION

L'augmentation de la population microbienne avec l'âge des plants semble être due à trois facteurs importants : (i) un dépôt continu de propagules provenant de l'air et se déposant sur la surface des feuilles, (ii) une multiplication répétée des microorganismes sur la surface des feuilles et (iii) un changement progressif du statut nutritionnel de la surface des feuilles de mûrier en fonction de l'âge des pousses (Mc Bride et Hayes, 1977 ; Sukumar et Ramalingam, 1986 ; Ruinen, 1965). Il est manifeste que les feuilles matures contiennent plus de sucres solubles (Mazumder et coll., 1996) et de minéraux (Sinha et coll., 1993) destinés à leur croissance et à leur développement, que ces facteurs augmentent avec l'âge des pousses (Mazumder et coll., 1996), mais que la teneur en protéines des feuilles de mûrier matures diminue avec l'âge (Sinha et coll., 1993 ; Bongale et coll., 1997). En outre, Bongale et coll., (1997) rapportent une diminution régulière des hydrates de carbone avec la maturité des feuilles de mûrier. Ainsi, le statut des nutriments seuls, ne peut pas être considéré comme un facteur contribuant à la croissance microbienne. Du point de vue du mode de nutrition des microorganismes du phylloplan, il a déjà été constaté que ces microbes prennent leurs nutriments à

la surface et non à l'intérieur des tissus foliaires. Les nutriments situés à la surface des feuilles sont disponibles sous la forme de ruissellement contenant des hydrates de carbone variés, des protéines et des lipides (Sen, 1988). Ces nutriments sont plus facilement lavés chez les feuilles matures (Tukey et coll., 1957). En dehors des extraits de feuilles, les microorganismes utilisent la cire cuticulaire (Tsuchii et coll., 1981 ; Hankin et Kolattukudy, 1968, 1969 ; Samanta et coll., 1986) et cette cuticule augmente en épaisseur avec l'âge des feuilles de mûrier. Ces constatations permettent d'expliquer l'augmentation de la population microbienne remarquée dans l'étude présente.

Les variations saisonnières de la population des microorganismes du phylloplan sont principalement dues à des facteurs abiotiques (Ruinen, 1965). Le Bengale ouest étant une zone chaude et humide, le développement de la microflore est important et les variations saisonnières des facteurs climatiques sont supposées en influencer l'activité. La saison des pluies alimente la population microbienne avec l'humidité de la mousson, alors que l'hiver l'alimente avec un accroissement de rosée sur la surface des feuilles. Une humidité importante favorise la formation de rosée, ce qui a pour résultat un lavage régulier des métabolites des plantes, particulièrement les hydrates de carbone, quelques acides aminés et minéraux (Tukey et coll., 1957), ce qui pourrait favoriser la microflore du phylloplan pendant la saison des pluies et en hiver, comme ceci a été observé dans l'étude actuelle. L'été étant une saison comparativement chaude et sèche, l'humidité n'est pas suffisante sur la surface de la feuille pour alimenter les activités microbiennes (Laben et Daft, 1967).

Dans le sol, les principales sources de nutriments pour l'activité microbienne de la rhizosphère sont les exsudats des racines et les tissus des racines mortes. Comme il existe peu de variations dans la biomasse des racines de mûrier, avec le changement de l'âge des pousses, ceci pourrait être la cause d'une variation non significative des populations des divers groupes de microorganismes. Les variations saisonnières des populations microbiennes étaient cependant manifestes, ce qui pourrait être dû à l'activité variable des racines en fonction du changement de l'environnement du sol pendant les différentes saisons. Les activités des racines sont plus influencées par la température du sol et par l'humidité. Dans le Bengale ouest, la température en été est très élevée, ce qui exerce une influence défavorable sur les activités des racines et des microbes. Cependant, les activités des racines et des microbes sont dans des limites favorables en hiver et pendant la saison des pluies, mais là encore, la saison des pluies n'alimente pas une meilleure croissance de la population microbienne. La raison de ceci peut être trouvée dans le fait qu'un surplus d'humidité (inondation) pendant la saison des pluies exerce un impact défavorable sur la croissance microbienne. En outre, la photopériode exerce un impact direct sur le développement des racines de mûrier (Ayuzawa et coll., 1972) et l'hiver, avec un ciel comparativement clair, encourage la même chose, ce qui conduit à un entretien indirect des activités microbiennes. Cependant, ceci n'est pas vrai pour les fixateurs d'azote qui se développent probablement mieux lorsque la compétition des autres microflores pendant la saison des pluies et en été est moindre. Cependant, les interactions sol - plante - microbe dans la rhizosphère du mûrier, sont encore à établir.

L'étude actuelle indique le rôle de certains facteurs biotiques (âge des pousses) et abiotiques (variations saisonnières) dans leur contribution à la construction d'une population de diazotrophes et d'autres microorganismes à la fois sur le phylloplan et dans la rhizosphère du mûrier. La saison des pluies semble être celle pendant laquelle l'application de bioengrais serait la plus efficace en raison de la meilleure colonisation de diazotrophes et de la compétition moins importante entre les bactéries et les champignons. En ce qui concerne l'application foliaire, c'est entre 30 et 40 jours après la taille qu'elle serait idéale, en raison de la moindre compétition entre les bactéries et les champignons présents à cette période de croissance.

USE OF ANTI-TRANSPIRANTS TO PRESERVE THE MULBERRY LEAVES FOR YOUNG AGE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. REARING AND ITS IMPACT ON COCOON PRODUCTION

G. P. SINGH, M. T. HIMANTHRAJ, V. B. MATHUR, C. K. KAMBLE & R. K. DATTA

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore - 570 008, India

Two anti-transpirants, i.e. Kaolin and Cycocoel, at three concentrations (50 ppm, 100 ppm and 150 ppm) were used to preserve the mulberry leaves for young age silkworms, *Bombyx mori* L. The leaf driage percentage was observed minimum (4.25 %) in treatment of 150 ppm cycocoel (T3). The rearing and cocoon parameters were also significantly improved in the larvae reared on the leaves preserved after spraying 150 ppm solution of cycocoel (T3).

Keywords: Anti-transpirant, mulberry leaves, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. is a monophagous insect and feeds on mulberry leaves voraciously during its larval stages. The mulberry leaves contribute maximum (38.2 %) towards the success of silkworm cocoon crop (Matsumara, 1952) and hence, fresh/nutritious mulberry leaves should be fed to the developing silkworm. After harvesting the leaves from mulberry garden, a considerable moisture loss takes place, besides depletion of nutrients of leaf till they are actually fed to silkworms especially in tropical countries due to high rate of transpiration.

Transpiration in plants is generally reduced by applying very dilute solution of chemicals (anti-transpirants) to the foliage that closes stomata, through which CO₂ enters and water vapours escapes (Zelitch and Waggoner, 1962 ; Slatyer and Bierhuizen, 1964). A coating of kaolinite (a clay reflective) decreases the leaf temperature by increasing the leaf reflection and reduces the transpiration (Abou Khaled *et al.*, 1970). Anti-transpirants are applied to plant foliage to curtail water loss (Devenport *et al.*, 1972 ; Srinivasa Rao, 1985). The information on the use of anti-transpirants in the mulberry and its impact on mulberry defoliator insects like the silkworm is scanty.

The silkworm requires more water percentage in tender mulberry leaves (80 %) during young age for the optimum development (Krishnaswami, 1978) and hence, an attempt has been made in the present study to find out the effect of widely used anti-transpirant chemicals espacially Kaolin and Cycocoel in preventing water loss in mulberry leaves and their impact on developing silkworm larvae including an evaluation of quality/quantity production of cocoons.

MATERIALS AND METHODS

The tender mulberry leaves of popular Kanva-2 variety were used for this experiment and fed to the popular bivoltine hybrid NB4D2 × CC1. Solutions of two anti-transpirant chemicals, i.e. Cycocoel and Kaolin, were prepared at three different concentrations (50 ppm, 100 ppm and 150 ppm) and

referred as T1, T2, T3 and T4, T5, T6 treatments respectively which were sprayed on both of the sides of mulberry leaves, immediately after harvesting. Treated mulberry leaves were preserved for 24 hours for subsequent feeding. The control batch was also maintained by spraying water on the leaves to compare the results. The moisture percentage of fresh leaves and 24 hours preserved leaves was recorded separately for all the treatments including control and leaf driage percentage was calculated too. The leaves preserved for 24 hours were fed to the above mentioned bivoltine hybrid in the first instars. For each treatment, three replications with 300 worms in each were maintained and reared up to spinning as recommended by Krishnaswami (1978). The experiment was repeated three times during different seasons when room temperature and RH range was 24 °C - 28.5 °C with 80-85 % RH, 20.5 °C - 26 °C with 70-80 % RH and 22 °C - 31 °C with 65-75 % RH in rainy, winter and summer respectively. However, silkworm rearing was conducted at controlled temperature and RH viz., 28 °C and 85-90 % RH for chawki rearing. The average data of rearing, cocoon, reeling parameters and other productive traits of three experiments were analysed statistically by using computer programme.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf driage:

The leaf driage percentage was found less in all the treatments while the same was recorded minimum (4.25 %) in the T3 treatment which was significantly lesser than that of control (7.78 %). In other treatments it ranged between 4.30 to 7.31 % (Fig. 1).

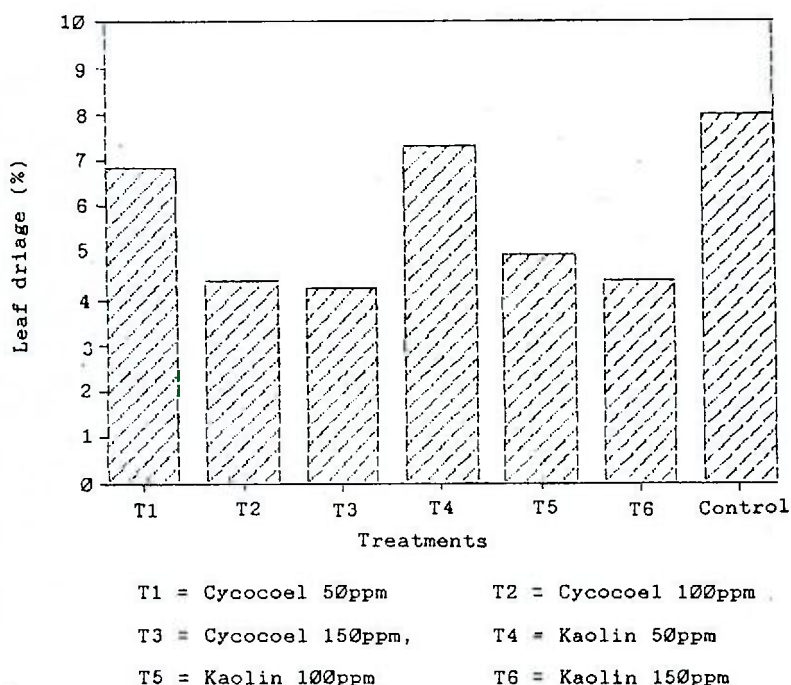


Fig. 1. Percentage of leaf driage in different treatments.

Fig. 1. Pourcentage de séchage des feuilles avec les différents traitements.

Table I. Effect of Cycocoel and Kaolin on rearing and cocoon parameters in silkworm, *B. mori* L.Tableau I. Effet du Cycocoel et Kaolin sur les paramètres d'élevage et du cocon chez le ver à soie, *B. mori* L.

Treatment	Mortality up to III moult (%)	Wt. of 10 larvae after III moult (g)	Wt. of 10 mature larvae (g)	Yield/10,000 larvae No	Wt (kg)	Single cocoon Wt. (g)	Single shell Wt. (g)	Silk ratio (%)
Traitement	Mortalité jusqu'à la IIIe mue (%)	Poids de 10 larves après la IIIe mue (g)	Poids de 10 larves mûres (g)	Rendement / 10 000 larves Nb	Poids (kg)	Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse %
Cycocoel 50ppm (T1)	3.91*	2.41*	45.22 NS	8086 NS	13.25 NS	1.74 NS	0.36 NS	20.24*
Cycocoel 100ppm (T2)	2.88**	2.46*	46.64*	8943*	14.96 NS	1.85*	0.37*	20.00*
Cycocoel 150ppm (T3)	2.34**	2.52**	48.52**	9274**	16.49**	1.92**	0.39**	20.96**
Kaolin 50ppm (T4)	5.34 NS	2.30 NS	44.68 NS	7911 NS	12.94 NS	1.72 NS	0.35 NS	19.63 NS
Kaolin 100ppm (T5)	4.30 NS	2.38 NS	47.14 NS	8896*	14.90 NS	1.80*	0.36 NS	19.98*
Kaolin 150ppm (T6)	3.37**	2.45**	47.24 NS	8905*	15.47*	1.85*	0.37*	20.01*
Control (Water spray) Témoin (Vaporisation d'eau)	5.77	2.31	44.99	7960	13.48	1.66	0.34	19.14
C.D. at 5 %	1.53	0.09	2.99	827	1.74	0.11	0.03	0.79
C.D. at 1 %	2.14	0.12	4.19	1159	2.44	0.15	0.04	1.12
Test of significance Test de signification	**	**	NS	*	**	**	*	*

* : Significant ($p > 0.05$) over control. / Significatif ($p > 0.05$) par rapport au témoin.** : Significant ($p > 0.01$) over control. / Significatif ($p > 0.01$) par rapport au témoin.

N.S. : Not significant / Non significatif.

Rearing characters:

The percentage of mortality up to III moult was recorded minimum (2.34 %) in the larvae fed with the leaves of T3, whereas maximum (5.77 %) was found in control. The larval weight (10 larvae) after III moult and at maturity before spinning (6th day of V stage) has ranged between 2.30 g. to 2.52 g. and 44.68 g. to 48.52 g. respectively. The cocoon yield per 10,000 larvae by number/by weight was found minimum (7,911 / 12.94 kg) in T4, while the maximum (9,274 / 16.49 kg) was recorded in the group of larvae fed with the leaves of T3 (Table I).

Cocoon characters:

The cocoon characters, i.e. single cocoon weight, single shell weight and silk ratio (1.92 g., 0.39 g., 20.96 %) were recorded maximum in the cocoons produced by the larvae fed on the leaves of T3, whereas minimum values were recorded (1.66 g., 0.34 g. and 19.14 %) in the control. The values of the single cocoon weight, single shell weight and silk ratio ranged between 1.72 to 1.85 g., 0.26 g. to 0.37 g. and 19.63 to 20.24 % respectively in other treatments (Table I).

It is very clear from the results that the leaf dry weight percentage showed reduction in all the treatments and the results are in agreement to the earlier works of Zelitch and Waggoner (1962), Slatyer and Bierhuizen (1964), Hanson (1972), Devenport *et al.* (1972), Srinivasa Rao (1985), who applied the anti-transpirants to the plant foliage to curtail water loss through transpiration.

In the present study, the rearing and cocoon parameters have shown significant ($P > 0.01$) improvement in T3 treatment compared to control. Most of the rearing and cocoon characters in treatment T2 and T6 have shown significant difference ($P > 0.05$) over control.

Hence, the significant ($P > 0.05$ and $P > 0.01$) improvement in all of the rearing and cocoon characters in the present study supports the earlier study of Krishnaswami (1988), Srinivasa Rao (1985) who have reported that the mulberry leaves with a good moisture content should be fed to the silkworm for its better development and also to exploit its full breed potential in order to get a successful cocoon crop. Treatment T1, T4 and T5 have not shown significant difference in most of rearing and cocoon parameters compared to control.

Furthermore, it is clear from the present observations that the 150 ppm solution of cycocoeol can be used as foliar spray to conserve the moisture in the mulberry leaves for longer period (24 hours) and can be fed to the silkworms for their better development leading to good cocoon crop harvest.

REFERENCES

- ABOU KHALED A., HAGAN R.M., DEVENPORT D.C. (1970) Effects of Kaolinite as a reflective antitranspirant on leaf temperature, transpiration, photosynthesis and water use efficiency. *Water Resources Research*, (6), 280-289.
- DEVENPORT D.C., FISHER M.A., HAGAN R.M. (1972) Some counteractive effects of antitranspirants. *Plant Physiology*, (49), 722-724.
- HANSON A.D., NELSON C.E., PEDERSEN A.R., EVERSON E.H. (1970) Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implication for drought resistance, *Crop Science* (19), 489-493.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing, *Indian Silk* (16), 7-15.
- KRISHNASWAMY S. (1988) Development of an appropriate sericulture technology in India for tropical sericulture, *Int. Cong. Trop. Seric. Proc.* 18-23 Feb. CSB publication pp 32-33.
- MATSUMURA (1952) *Lectures on Sericulture*. Ed. G. Boriah. Suryamya publishers, Bangalore, p.7.
- SLATYER R.O., BIERHUIZEN J.F. (1964) The influence of several transpiration suppressants on transpiration, photosynthesis and water use efficiency of cotton leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 17, 131-146.

- SRINIVASA RAO N.K. (1985) The effect of antitranspirants on leaf water status, stomatal resistance and yield in tomato. *Journal of Horticultural Sciences* 60, 89-92.
- ZELITCH I., WAGGONER P.E. (1962) Effect of chemical control of stomata on transpiration of intact plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1297-1299.

UTILISATION D'ANTI-TRANSPIRANTS POUR LA CONSERVATION DES FEUILLES DE MURIER DESTINEES A L'ELEVAGE DE JEUNES VERS A SOIE, *BOMBYX MORI* L., ET SON IMPACT SUR LA PRODUCTION DE COCONS

G. P. SINGH, M. T. HIMANTHRAJ, V. B. MATHUR, C. K. KAMBLE & R. K. DATTA

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

Deux anti-transpirants, i.e., le Kaolin et le Cycocoele, à trois concentrations différentes (50 ppm, 100 ppm et 150 ppm) ont été utilisés afin de préserver les feuilles de mûrier pour les vers à soie, Bombyx mori L. du jeune âge. Nous avons remarqué un pourcentage de séchage de la feuille minimum (4,25 %) avec le traitement à 150 ppm de cycocoele (T3). Les paramètres d'élevage et du cocon se sont aussi significativement améliorés chez les larves élevées sur des feuilles conservées après vaporisation d'une solution de 150 ppm de cycocoele (T3).

INTRODUCTION

Le vers à soie, *Bombyx mori* L., est un insecte monophage vorace qui se nourrit de feuilles de mûrier pendant ses stades larvaires. Les feuilles de mûrier contribuent en grande partie (38,2 %) au succès de la récolte de cocons de vers à soie (Matsumara, 1952) et donc, des feuilles de mûrier fraîches et nutritives doivent être données aux vers à soie en pleine croissance. Après la récolte des feuilles des mûriers, il se produit, jusqu'au moment où elles sont mangées par les vers à soie, une grande perte en humidité en plus de l'épuisement des nutriments de la feuille, cela spécialement dans les pays tropicaux à cause du taux de transpiration élevé.

La transpiration chez les plantes est généralement réduite en appliquant une solution très diluée de produits chimiques (anti-transpirants) aux feuillages qui referment leurs stomates, à travers lesquels le CO₂ pénètre et les vapeurs d'eau s'échappent (Zelitch et Waggoner, 1962 ; Slatyer et Bierhuizen, 1964).

L'enrobage de kaolinite (argile) diminue la température de la feuille par l'augmentation du réfléchissement et réduit la transpiration (Abou Khaled et coll., 197). Les anti-transpirants sont appliqués au feuillage de la plante afin de réduire la perte en eau (Devenport et coll., 1972 ; Srinivasa Rao, 1985). Des informations concernant l'utilisation d'anti-transpirants chez le mûrier et leur impact sur les insectes défoliants du mûrier, comme le ver à soie, sont peu nombreuses.

Le ver à soie a besoin pendant son jeune âge, pour un développement optimum, d'un pourcentage plus élevé en eau dans les feuilles de mûrier tendre (80 %) (Krishnaswami, 1978). Cette étude est donc une tentative pour découvrir les effets d'une utilisation plus étendue de produits chimiques anti-transpirants, spécialement le Kaolin et le Cycocoele sur la prévention de la perte en eau des feuilles de mûrier et sur leur impact sur le développement des larves de vers à soie, incluant aussi une évaluation de la production qualitative/quantitative des cocons.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles de mûrier tendres de la variété populaire Kanva-2 ont été utilisées pour l'expérience et données à l'hybride bivoltin NB4D2 × CC1. Les solutions de deux anti-transpirants chimiques, i.e. le cycococle et le kaolin ont été préparées à trois concentrations différentes (50 ppm, 100 ppm et 150 ppm) et référencées en traitements T1, T2, T3 et T4, T5, T6 respectivement et vaporisées sur les deux surfaces des feuilles, immédiatement après la récolte.

Les feuilles de mûrier traitées ont été conservées pendant 24 heures pour servir de nourriture. Le lot témoin a aussi été maintenu en vaporisant de l'eau sur les feuilles afin de comparer les résultats. Le pourcentage d'humidité des feuilles fraîches et des feuilles conservées pendant 24 heures ont été notés séparément pour tous les traitements comprenant le témoin ainsi que le pourcentage de séchage de la feuille. Les feuilles conservées pendant 24 heures ont servi de nourriture aux hybrides bivoltins mentionnés plus haut aux premiers stades larvaires. Pour chaque traitement, trois replicats comprenant 300 vers chacun, ont été maintenus et élevés jusqu'au filage comme l'a recommandé Krishnaswami (1978). L'expérience a été répétée trois fois pendant les différentes saisons lorsque la température de la pièce et l'humidité relative étaient de 24 °C à 28,5 °C avec 80 - 85 % d'humidité relative ; 20,5 °C à 26 °C avec 70 - 80 % d'humidité relative et 22 °C à 31 °C avec 65 - 75 % d'humidité relative pendant les saisons pluvieuses, hivernales et estivales. L'élevage de vers à soie a été conduit à une température et une humidité relative contrôlées i.e., 28 °C et 85-90 % HR pour l'élevage de jeunes vers à soie (chawky). Les données concernant l'élevage, le cocon, les paramètres de filage et d'autres caractéristiques comprenant la production des trois expériences ont été analysées statistiquement à l'aide d'un programme informatique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Séchage de la feuille :

Le pourcentage de séchage des feuilles se trouve être moins important pour tous les traitements, il a été noté au minimum (4,25 %) pour le traitement T3 qui est significativement plus faible que celui du témoin (7,78 %). Pour les autres traitements, le pourcentage varie entre 4,30 et 7,31 % (Fig. 1).

Caractéristiques d'élevage :

Le pourcentage de mortalité jusqu'à la troisième mue est minime (2,34 %) chez les larves nourries de feuilles T3, tandis que pour le témoin, il est maximum (5,77 %). Le poids de la larve (10 larves) après la troisième mue et à maturité avant le filage (6ème jours du Ve stage larvaire) va respectivement de 2,30 g à 2,52 g et de 44,68 g à 48,52 g. Le rendement en cocons pour 10 000 larves en nombre et en poids est minime (7,911 / 12,94 kg) chez T4, tandis que le maximum (9,274 / 16,49 kg) est noté chez le groupe de larves nourries de feuilles T3 (Tableau I).

Caractéristiques du cocon :

Les caractéristiques du cocon, i.e., le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse sont maximales chez les cocons produits par les larves nourries sur les feuilles de T3 (1,92 g ; 0,39 g ; 20,96 %), tandis que des valeurs minimales sont notées concernant le témoin (1,66 g ; 0,34 g et 19,14 %). Les valeurs du poids d'un cocon, du poids d'une coque et de la richesse soyeuse varient respectivement entre 1,72 et 1,85 g ; 0,26 et 0,37 et 19,63 et 20,24 % pour les autres traitements (Tableau I).

Il est très clair, d'après les résultats, que le pourcentage de séchage de la feuille est réduit pour tous les traitements et les résultats sont en accord avec les premiers travaux de Zclitch et Waggoner (1962), Slatyer et Bierhuizen (1964), Hanson (1972), Devenport et coll. (1972), Srinivasa Rao (1985), qui ont appliqué des anti-transpirants aux feuillages des mûriers afin de réduire la perte en eau par la transpiration.

Dans cette étude, les paramètres d'élevage et du cocon sont améliorés de façon significative ($P>0,01$) avec le traitement T3 en comparaison avec le témoin. La plupart des caractéristiques d'élevage et du cocon pour les traitements T2 et T6 sont significativement différentes ($P>0,05$) par rapport au témoin.

L'amélioration significative ($P>0,05$ et $P>0,01$) pour toutes les caractéristiques de l'élevage et du cocon montrée dans cette étude renforce l'étude antérieure de Krishnaswami (1988), Srinivasa Rao (1985) qui a noté que les feuilles de mûrier avec un bon contenu en humidité doivent être données aux vers à soie pour un meilleur développement mais aussi pour exploiter le potentiel de production afin d'obtenir une bonne récolte de cocons. Les traitements T1, T4 et T5 n'ont pas donné de différence significative par rapport au témoin pour la plupart des paramètres d'élevage et du cocon.

De plus, il est évident, d'après les présentes observations, que la solution de cycocoele à 150 ppm peut être utilisée comme vaporisateur foliaire pour la conservation de l'humidité des feuilles de mûrier pendant une plus longue période (24 heures) et peut être donnée aux vers à soie pour un meilleur développement menant à une bonne récolte de cocons.

NITROGEN FERTILIZER RECOMMENDATION OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) BASED ON MITSCHERLICH-BRAY CONCEPT

P.C. BOSE* & S.K. MAJUMDER*

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

A field experiment was undertaken at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore under irrigated red loamy soil to study the biomass production of mulberry at different levels of nitrogen fertilization. The obtained data were utilized by applying Mitscherlich-Bray concept to estimate the important parameters responsible for mulberry growth and production, namely, theoretical maximum yield (A), efficiency factor for soil nutrient (c1) and efficiency factor for added fertilizer nutrient (c). By utilising the estimated c1 and c values, a ready reckoner of nitrogen fertilizer recommendation for mulberry has been prepared.

Keywords: Mitscherlich-Bray concept, theoretical maximum yield, efficiency factor, ready reckoner, biomass, soil characteristics.

INTRODUCTION

The objective of the present study is to find out the mulberry biomass yield, yield increase from fertilizer use and fertilizer requirement directly from simple soil tests. Substantial reports on the effect of fertilization and other agronomical practices on the yield and quality of mulberry leaf are available (Pain, 1965 ; Kasiviswanathan and Iyengar, 1970 ; Ray *et al.*, 1973). But, the interpretation of experimental field results is limited to generalisations as no single experimental field soil can represent the varying nutrient deficiencies present within that type or on other types of soils. Areas of any given soil type may vary greatly with respect to their nutrient deficiencies, partly because of natural variation and also as a result of the soil management previously practised. Thus, the fertilizer requirement should vary correspondingly. Keeping this fact in consideration, a field experiment was conducted at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, under irrigated red loamy soil to observe the variation in biomass yield of mulberry under varying levels of nitrogen fertilizer. Subsequent attempt has also been made to subject the obtained data to Mitscherlich-Bray equation with a view to develop nitrogen fertilizer recommendation reckoner for different levels of available soil nitrogen.

THEORETICAL RELATIONS

The relationship between biomass yield, added fertiliser and the amount of the nutrient already present in the soil is expressed by Mitscherlich's equation referred to as "The law of action of the growth factors". Mitscherlich's equation is based on the assumption that "The yield increases in proportion to the amount by which the current yield falls of the maximum yield, A" (Spillman and Lang, 1942).

$$dy/dx = (A - y) c \dots\dots\dots(1)$$

* Present address: Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

Where, y = yield, x = amount of nutrient added per amount of soil, A = maximum yield and c = proportionality constant.

The integration of this equation leads to Mitscherlich's equation as follows :

$$\log (A - y) = \log A - c (x + b) \dots \dots (2)$$

Where, x = units of nutrients added per amount of soil and b = original nutrient content expressed in units of the added nutrient x .

The equation (2) is further modified by Bray (1944) as follows :

$$\log (A - y) = \log A - (c_1 b + cx) \dots \dots (3)$$

Where, c_1 = efficiency factor for soil nutrient and c = efficiency factor for added fertilizer nutrient.

The equation (3) is referred to as Mitscherlich-Bray equation and the same was utilized by Shete and Sonar (1993) for fertilizer recommendation trial on sorghum. The theoretical maximum yield (A) was obtained by extrapolating the plot of $\log y$ versus $1/x$ and subsequent calculations had been done to evaluate mean c_1 and c values. On the basis of estimated A , c_1 and c values, fertilizer requirement was computed for the common range of soil test values.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was conducted with varying levels of nitrogen and uniform levels of phosphorus and potassium. The experiment comprised of four levels of nitrogen as treatments, i.e., 0, 200, 300, and 400 kg/ha/yr alongwith the recommended doses of phosphorus and potassium, i.e., 120 kg/ha/yr each, for each of the treatments. The initial soil characteristics and concerned references for the analytical methods adopted are presented in Table I.

Table I. Initial characteristics of soil under experimentation.

Tableau I. Caractéristiques initiales du sol sous expérimentation.

	Characteristics	Reference of the analytical methods followed
	Caractéristiques	Référence des méthodes analytiques suivies
Texture	Loamy / Argileux	Black, 1965
pH	8.17	Jackson, 1973
Electrical conductivity (dSm^{-1}) <i>Conductivité électrique</i>	0.246	Jackson, 1973
Organic carbon (%) <i>Carbone organique (%)</i>	0.30	Black, 1965
Alkaline $\text{KMnO}_4\text{-N}$ (kg ha^{-1})	180.0	Subbiah and Asija, 1956
Olsen/Bray-P (kg ha^{-1})	11.4	Jackson, 1973
$\text{NH}_4\text{OAC-K}$ (kg ha^{-1})	198.6	Jackson, 1973

The experiment was laid out in randomised block design with Kanva 2 mulberry variety and the plantation was maintained following the recommended package of practices. Treatments were applied in five split doses after 20 days of pruning in each crop. The irrigation schedule was once in ten days. A basal dose of farmyard manure at the rate of 20 t/ha/yr was applied. Five harvests were taken in a year. The plantation was bottom pruned every time. Leaf and shoot yield data were recorded cropwise.

RESULTS AND DISCUSSION

Annual biomass yield of mulberry under varying levels of nitrogen application is presented in Table II. It is evident from the results that the application of nitrogen increased the biomass yield considerably and the finding is in conformity with the earlier reports (Ray *et al.*, 1973 ; Das *et al.*, 1993). The data obtained were subjected to Mitscherlich-Bray equation and the parameters of the equation, namely, theoretical maximum yield (A), efficiency factor for soil nutrient (c_1) as well as efficiency factor for added fertiliser nutrient (c) were estimated, following the procedure as described in theoretical relations (Table II). "b" (native soil nutrient) value used in the above computation is presented in Table I as alkaline $\text{KMnO}_4\text{-N}$.

Table II. Mulberry biomass yield and efficiency coefficients of soil and nitrogen fertilizer.

Tableau II. Coefficients de rendement et d'efficacité du sol et de l'engrais azoté pour la biomasse du mûrier.

N (Kg/ha/yr) applied (x)	Yield (y) obtained (t/ha/yr)	Calculated log y	1/x	c_1	c	c_1/c
<i>N appliqué (kg/ha/an) (x)</i>	<i>Rendement (y) obtenu (t/ha/an)</i>	<i>log y calculé</i>				
0	24.855	-	-	0.0011	-	
200	33.145	1.520	0.0050		0.000530	
300	41.484	1.618	0.0033		0.000700	1.538
400	48.231	1.683	0.0025		0.000915	
Mean / Moyenne				0.0011	0.000715	
Theoretical maximum yield <i>Rendement maximum théorique</i>	66.830	1.825				

Table III. Nitrogen fertilizer recommendation chart for mulberry.**Tableau III. Tableau de recommandations en engrais azoté pour le mûrier.**

Soil test value	Mulberry biomass yield, % of theoretical maximum				
<i>Valeur du sol</i>	<i>Rendement de la biomasse du mûrier, % du maximum théorique</i>				
N (Kg/ha)	60	65	70	75	80
Fertiliser N (kg/ha/yr) required / <i>Engrais azoté nécessaire (kg/ha/an)</i>					
100	403	484	577	688	824
125	364	445	539	649	785
150	326	407	500	611	747
175	287	368	462	572	708
200	249	330	424	534	670
225	210	292	385	495	631
250	172	253	347	457	593
275	133	215	308	418	555
300	95	176	270	380	516
325	56	138	231	342	478
350	18	99	193	303	439
375	0	61	154	265	401
400	0	22	116	226	362

The mean c_1 and c values were employed again in the equation (3) and recommendation chart for nitrogen fertilizer was computed for the common range of soil test values from 100 to 400 kg ha⁻¹ of alkaline KMnO₄-N. Nitrogen recommendation chart is presented in Table III.

REFERENCES

BLACK C.A. (1965) Methods of soil analysis. Am. Soc. Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.

- BRAY R.H. (1944) Soil-plant relations: I. The quantitative relation of exchangeable potassium to crop yields and to crop response to potash additions. *Soil Science*, 58, 305-324.
- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GUPTA Y.K., GHOSH A., DATTA R.K. (1993) Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and spacing on growth, yield and nutritional quality of mulberry under rainfed conditions. *Ind. J. Seric.*, 33(2), 201-207.
- JACKSON M.L. (1973) Soil chemical analysis. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi.
- KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1970) Effect of plant densities, methods of leaf harvest and nitrogen fertilization on the leaf yield of irrigated mulberry in Mysore state. *Ind. J. Seric.*, 9(1), 43-48.
- PAIN A.K. (1965) Effect of N.P.K. fertilizers and their combinations on the yield and nutritive value of mulberry. *Ind. J. Seric.*, 4(1), 1-8.
- RAY D., MANDAL L.N., PAIN A.K., MANDAL S.K. (1973) Effect of NPK and farmyard manure on the yield and nutritive values of mulberry leaf. *Ind. J. Seric.*, 12(1), 7-12.
- SHETE B.G., SONAR K.R. (1993) Nitrogen and phosphorus requirements of sorghum based on Mitscherlich-Bray concept in an inceptisol. *Ind. Soc. Soil Sci.*, 41(3), 574-576.
- SPILLMAN W.J., LANG E. (1942) The law of diminishing returns, World Book Co.
- SUBBIAH B.V., ASIJA G.L. (1956) A rapid procedure for the estimation of available nitrogen in soil. *Curr. Sci.*, 25, 259-261.

RECOMMANDATION CONCERNANT L'ENGRAIS AZOTE POUR LE MURIER (*MORUS ALBA* L.) BASEE SUR LE CONCEPT DE MITSCHERLICH-BRAY

P.C. BOSE* & S.K. MAJUMBER*

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

Une expérimentation a été entreprise au 'Central Sericultural Research and Training Institute', Mysore, avec un sol irrigué argileux rouge afin d'étudier la production du mûrier à différents taux d'engrais azoté. Les données obtenues ont été utilisées en appliquant le concept de Mitscherlich-Bray, pour estimer les paramètres importants responsables de la croissance et de la production du mûrier. Ces paramètres sont : le rendement maximum théorique (A), le facteur d'efficacité pour le nutriment du sol (c₁) et le facteur d'efficacité des engrais ajoutés (c). En utilisant les valeurs estimées c₁ et c, un barème de recommandation d'engrais azoté pour le mûrier a été préparé.

INTRODUCTION

L'objectif de cette étude est de connaître le rendement de la biomasse du mûrier, l'augmentation du rendement avec l'utilisation de engrais et les besoins en engrais à partir de simples tests du sol. Des rapports substantiels sur les effets de l'amendement et d'autres pratiques agronomiques concernant le rendement et la qualité de la feuille de mûrier sont disponibles (Pain, 1965 ; Kasiviswanathan et Iyengar, 1970 ; Ray et coll., 1973). Mais l'interprétation des résultats des expérimentations est limitée à des généralités car aucune expérimentation simple ne peut représenter les différentes carences de nutriments dans un type de sol ou un autre. Des zones d'un type de sol donné peuvent être très différentes en ce qui concerne les déficiences en nutriments, cela en partie à cause des variations naturelles mais aussi des pratiques agricoles antérieures. L'engrais nécessaire varie en fonction de ces faits. Une expérimentation a donc été menée au 'Central Sericultural Research and Training Institute', Mysore, sur un sol irrigué argileux rouge afin d'observer les variations de rendement de la biomasse du mûrier sous différents taux d'engrais azoté. Une tentative de soumettre les données obtenues à l'équation de Mitscherlich-Bray avec l'intention de développer un barème de recommandations pour différents sols nécessitant un apport en azote a été ensuite menée.

RELATIONS THEORIQUES

La relation entre le rendement de biomasse, l'engrais ajouté et le taux de nutriment déjà présent dans le sol est exprimée par l'équation de Mitscherlich comme "La loi de l'action des facteurs de croissance". L'équation de Mitscherlich est basée sur l'hypothèse que "le rendement s'accroît en proportion du montant par lequel le rendement courant n'atteint pas le rendement maximum, A" (Spillman et Lang, 1942).

$$dy/dx = (A - y) c \dots\dots(1)$$

* Adresse actuelle : Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, W.B., Inde.

Où, y = rendement, x = montant de nutriment ajouté par unité de sol, A = rendement maximum et c = constante de proportionalité.

L'intégration de cette équation mène à l'équation de Mitscherlich suivante :

$$\log(A - y) = \log A - c(x + b) \dots\dots\dots(2)$$

Où, x = unités de nutriment ajoutées par unité de sol et b = contenu originel en nutriment exprimé en unités de nutriment ajoutées x .

L'équation (2) est ensuite modifiée par Bray (1944) :

$$\log(A - y) = \log A - (c_1b + cx) \dots\dots\dots(3)$$

Où, c_1 = facteur d'efficacité pour le nutriment du sol, c = facteur d'efficacité pour l'engrais ajouté.

L'équation (3) se rapporte à celle de Mitscherlich-Bray et a été utilisée par Shete et Sonar (1993) pour l'essai concernant les recommandations d'amendement pour le sorgho. Le rendement maximum théorique (A) a été obtenu en extrapolant le traçage de $\log y$ par $1/x$ et les calculs suivants ont été faits pour évaluer les valeurs moyennes de c_1 et c . Sur la base des valeurs estimées A , c_1 et c , le besoin en engrais est évalué pour le test des valeurs des sols communs.

MATERIELS ET METHODES

Une expérience sur le terrain a été menée avec différents taux d'azote et des taux uniformes de phosphore et de potassium. L'expérience consiste en quatre taux d'azote comme traitements, c'est à dire, 0, 200, 300, et 400 kg/ha/an avec les doses recommandées de phosphore et de potassium, c'est à dire, 120 kg/ha/an chacun, pour chacun des traitements. Les caractéristiques initiales du sol et les références concernant les méthodes analytiques adoptées sont présentées dans le tableau I.

L'expérience a été menée par échantillonnage aléatoire sur la variété de mûrier Kanva 2 et la plantation a été entretenue en suivant les pratiques recommandées. Les traitements ont été appliqués en cinq doses 20 jours après la taille pour chaque récolte. L'irrigation est effectuée une fois tous les 10 jours. Une fumure de base à un taux de 20 t/ha/an a été appliquée. Cinq récoltes ont été faites sur une année. Les plants ont été taillés totalement à chaque fois. Les données concernant le rendement en feuilles et en tiges ont été notées à chaque récolte.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le rendement annuel de la biomasse du mûrier sous différents taux d'azote est présenté dans le tableau II. Il est clair, d'après les résultats, que l'application d'azote augmente considérablement le rendement de la biomasse et le résultat est en conformité avec les premiers rapports (Ray et coll., 1973 ; Das et coll., 1993). Les données obtenues ont été soumises à l'équation Mitscherlich-Bray et les paramètres de l'équation ont été estimés (le rendement maximum théorique (A), le facteur d'efficacité pour les nutriments du sol (c_1) ainsi que le facteur d'efficacité des nutriments ajoutés (c), en suivant la procédure ainsi décrite dans les relations théoriques (Tableau II). La valeur " b " (nutriment originel du sol) utilisée dans l'estimation est présentée dans le tableau I comme $Kmn04-N$ alcalin.

Les valeurs moyennes c_1 et c ont été utilisées une nouvelle fois dans l'équation (3) et le tableau de recommandation d'engrais azoté a été calculé pour des sols compris dans une fourchette ordinaire à partir de 100 jusqu'à 400 kg ha⁻¹ de $KMnO_4-N$ alcalin. Les recommandations en azote sont présentées dans le tableau III.

NITROGEN METABOLISM DURING THE PROGRESSIVE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *SAMIA CYNTHIA RICINI* BOISDUVAL

B. L. KRISHNAPPA, D. N. R. REDDY & K. C. NARAYANASWAMY

Department of Sericulture, College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065, India.

The total nitrogen content in *Samia cynthia ricini* eggs remained constant (61.3735 ± 0.2760 to 61.8295 ± 0.1955 $\mu\text{g}/\text{mg}$ egg) during the development of embryo. Fluctuations were noticed in protein nitrogen (between 40.8048 ± 1.4986 and 55.4666 ± 0.4159 $\mu\text{g}/\text{mg}$ egg) and non protein nitrogen (between 5.9809 ± 0.4350 and 20.7513 ± 1.5177 $\mu\text{g}/\text{mg}$ egg). The level of various protein fluctuates during development depicted an over all decrease during embryogenesis, the decrease being less than that of nitrogen. A positive relationship appeared to exist between the days of development and total nitrogen, non protein nitrogen, crude protein and insoluble proteins. On the other hand, the days of development appeared to have a negative relationship with protein nitrogen, total proteins, collagenous proteins and soluble proteins. The changes in the levels of nitrogen and proteins during embryonic development are discussed.

Keywords: Embryonic development, nitrogen, proteins, *Samia cynthia ricini*

INTRODUCTION

During the process of embryogenesis, metabolic activities occur for the growth and differentiation of the cells. The eggs of *Samia cynthia ricini* Boisduval being cleidoic type cannot draw nutrients from outside or cannot throw off from inside the egg, except for oxygen and carbondioxide. Among the major food reserves, protein accounts for only a small fraction of the total materials utilised for development in cleidoic eggs and there is only a slight decrease in the original supply of proteins (Needham, 1931). According to Pant and Sharma (1968), the levels of total egg nitrogen and shell nitrogen remain constant during the embryogenesis of *Philosamia ricini*. With advancement of age, the protein nitrogen and non - protein nitrogen decrease. However, the amino - nitrogen decreases till the third day but increases subsequently. In the eggs of *Antheraea mylitta*, the total protein level decreases during early developmental stages, but re - attains the original level on the sixth day (Pant and Sharma, 1976). The total protein content in the eggs of *P. ricini* decreases on the first day from the initial higher level and remains constant till third day. The decrease may be related to the process of proteolysis and deamination, so as to produce glucosamine required for chitin biosynthesis (Singh and Singh, 1979). Keeping in view these observations the present studies on the variation of the nitrogen and proteins in *S. c ricini* during embryogenesis were made.

MATERIAL AND METHODS

The eggs of *S. c. ricini* were obtained by rearing the plain white race of eri silkworm on castor leaves, as described by Basiah (1988). Eggs of known age in five samples of 100 each, were subjected

to nitrogen and protein analysis from the day of oviposition till egg hatching at 24 hours intervals, according to Lowry *et al.* (1951) and Jayaraman (1981). The mean values with standard deviations and correlation coefficients were calculated for all the analytical values as described by Sunderaraj *et al.* (1972).

RESULTS AND DISCUSSION

The variations observed in nitrogen and protein contents during embryogenesis of *S. c. ricini* eggs are presented in Tables I and II.

Table I. Changes in the levels of nitrogen during embryogenesis of *S. c. ricini*.

Tableau I. Changements des niveaux d'azote pendant l'embryogenèse de *S. c. ricini*.

Days of development of egg	Total nitrogen (µg/mg egg)	Protein nitrogen (µg/mg egg)	Non-protein (µg/mg egg)
<i>Nombre de jours de développement des oeufs</i>	<i>Azote total (µg/mg d'oeuf)</i>	<i>Azote protéique (µg/mg d'oeuf)</i>	<i>Non-protéique (µg/mg d'oeuf)</i>
0	61.3735 ± 0.2760	50.5450 ± 0.7589	10.8286 ± 0.5024
1	61.6673 ± 0.2569	48.7184 ± 0.8801	12.9488 ± 0.8401
2	61.7090 ± 0.3319	41.8914 ± 1.2822	19.8176 ± 1.2609
3	61.5561 ± 0.3081	40.8048 ± 1.4986	20.7513 ± 1.5177
4	61.5120 ± 0.3131	44.6621 ± 0.7159	16.8499 ± 0.5735
5	61.4800 ± 0.1331	54.8910 ± 0.6055	6.5890 ± 0.7336
6	61.4474 ± 0.1964	55.4666 ± 0.4159	5.9809 ± 0.4350
7	61.4730 ± 0.4114	46.1222 ± 0.9263	15.3508 ± 1.0034
8	61.5547 ± 0.4905	41.8677 ± 1.4409	19.6869 ± 1.2951
9	61.5502 ± 0.1319	47.5784 ± 1.9318	13.9525 ± 1.9442
10	61.8295 ± 0.1955	43.2099 ± 1.1759	18.4195 ± 1.2175

Table II. Changes in the levels of different proteins during embryogenesis of *S. c. ricini*Tableau II. Changements des niveaux des différentes protéines pendant l'embryogenèse de *S. c. ricini*

Days of development of egg	Total crude protein (µg/mg egg)	Total protein (µg/mg egg)	Insoluble protein (µg/mg egg)	Soluble protein (µg/mg egg)	Collagenous protein (µg/mg egg)
Nb. de jours de développement des oeufs	Protéines brutes totales (µg/mg d'oeuf)	Protéines totales (µg/mg d'oeuf)	Protéines insolubles (µg/mg d'oeuf)	Protéines solubles (µg/mg d'oeuf)	Collagène (µg/mg d'oeuf)
0	383.5845 ± 1.7251	315.9660 ± 4.7431	252.4813 ± 5.6166	63.4646 ± 1.2425	81.1767 ± 2.0343
1	385.4205 ± 1.6075	305.4901 ± 5.5004	243.6354 ± 4.6543	60.8547 ± 0.9368	87.3004 ± 1.2928
2	385.6813 ± 2.0748	261.8213 ± 8.0135	198.3679 ± 8.3955	63.4534 ± 0.8561	85.1744 ± 1.3824
3	385.7258 ± 1.9256	225.0306 ± 9.3663	190.7754 ± 9.6815	64.2552 ± 0.3935	80.2364 ± 1.1946
4	384.4502 ± 1.9582	279.1382 ± 4.7470	213.2986 ± 4.0239	65.8396 ± 1.0912	77.9438 ± 1.9414
5	384.2497 ± 0.8319	343.0689 ± 3.7842	280.2281 ± 3.8871	62.8408 ± 0.6175	74.4060 ± 1.0705
6	384.0465 ± 1.2275	346.6659 ± 2.5998	290.0198 ± 2.6405	56.6461 ± 0.3424	57.7388 ± 1.7360
7	384.2061 ± 2.5716	288.2635 ± 5.7956	268.9673 ± 5.0348	19.2962 ± 0.9307	48.0187 ± 0.4846
8	384.7167 ± 3.0654	261.6735 ± 9.0061	240.6409 ± 8.6917	21.0324 ± 1.4320	42.0064 ± 0.8080
9	384.6888 ± 0.8246	297.3651 ± 12.0739	278.6284 ± 12.0569	23.7387 ± 0.3716	62.7081 ± 0.6422
10	386.4343 ± 1.2219	270.0621 ± 7.3496	246.0756 ± 7.2360	24.1865 ± 0.7434	68.4927 ± 1.1199

Nitrogen is the main constituent of proteins and amino acids. There was no change in the total nitrogen content of the egg during development. However, the highest level of nitrogen level was recorded on the tenth day (61.8295 ± 0.1955 µg/mg egg) and the lowest on the day of oviposition (61.3735 ± 0.2760 µg/mg fresh weight of eggs). According to Chapman (1972), the total nitrogen content of insect eggs remain constant during development. Pant and Sharma (1968) also observed a constant level of nitrogen in *P. ricini* eggs during embryogenesis. However, little fluctuations in total nitrogen content were noticed in the egg, which might be due to an active metabolism of proteins. The total nitrogen content of eggs had a positive relation with the days of development ($r = 0.2520$),

but the correlation appeared to be non - significant. The total protein nitrogen initially decreased up to the fourth day ($44.6621 \pm 0.7159 \mu\text{g}/\text{mg egg}$) but increased on the fifth ($54.8910 \pm 0.6055 \mu\text{g}/\text{mg egg}$). It gradually decreased with development touching $43.2099 \pm 1.1759 \mu\text{g}/\text{mg egg}$ on the tenth day, before hatching. The increase on the fifth day in protein nitrogen, could be due to active synthesis of cellular protein nitrogen in blastokinesis and organogenesis. The view was supported by the fact that there was a corresponding decrease in the level of non-protein nitrogen on day six. The decrease in the level of total protein nitrogen during the later stage of development suggests its utilization for the organogenesis and chitin biosynthesis.

Pant and Sharma (1968) observed similar inverse relationship of protein and non-protein nitrogen content in *P. ricini* eggs during embryogenesis. The protein nitrogen content of the egg had a negative relationship with the days of development ($r = -0.1873$), while the non-protein nitrogen showed a positive relationship ($r = 0.1940$). However, the correlation coefficients were non-significant.

The protein content on fresh weight basis remained constant throughout the embryonic development. However, maximum protein level was noticed on the tenth day ($386.4343 \pm 1.2219 \mu\text{g}/\text{mg egg}$) and minimum on the day of oviposition ($383.5845 \pm 1.7251 \mu\text{g}/\text{mg egg}$). Pant and Sharma (1976) observed a decrease in the protein level during early developmental stages of *A. mylitta* eggs. Similar trend was observed in *P. ricini* also (Pant and Nautiyal, 1974). A higher level of free amino acids during initial stages of eggs was reported in *P. ricini* (Pant and Sharma, 1968; Singh and Singh, 1979). Based on the results obtained it could be assumed that during embryogenesis (germband formation and organogenesis), the breakdown of yolk protein occurs for the synthesis of new cellular proteins. The increase in the level of total proteins on the fifth day may be for blastokinesis (Krishnappa, 1989). The significant decrease on the eighth day (stage of head pigmentation) confirms the total protein participation for chitin synthesis. There appeared a non-significant negative correlation ($r = -0.1886$) with the days of development and protein of the egg.

The collagenous proteins forming the major components for the structure of cells, showed an initial increase in their levels but later on established a consistent decrease with development till the seventh day. The decline and breakdown in the collagenous protein content is attributed for the head pigmentation and chitin biosynthesis which had a negative and significant correlation with the days of development.

The soluble proteins on the first day was $60.8547 \pm 0.9368 \mu\text{g}/\text{mg egg}$, reached a maximum on fourth day ($65.8396 \pm 1.0912 \mu\text{g}/\text{mg egg}$) with further reduction towards hatching. It may be noted that soluble protein is an energy yielding component which will not involve in the body building process of the embryo. On the first day, the vitellophages were observed with germ band formation (Krishnappa, 1989). Accumulation of soluble proteins may be attributed to the requirements of energy for blastokinesis on the fourth day. On the eighth day, pigmentation of the head was noticed followed by the appearance of other chitinous structures like setae and legs. The process may consume a lot of energy, hence sudden depletion in the level of soluble proteins on the seventh day. However, the fact can be supported by a concomitant increase in the level of non protein nitrogen during the period, thus establishing a negative correlation ($r = -0.3089$) between soluble protein and non-protein nitrogen content. Further, the soluble protein content showed a negative significant correlation with the days of development ($r = -0.8809$). Generally, change in the protein levels are associated with its utilization for the organogenesis and chitin biosynthesis during the progressive embryonic development.

REFERENCES

- BASIAH J. M. M. (1988) Consumption and utilization of castor and tapicoca by the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval. M. Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, P. 128.
 CHAPMAN R. F. (1972) The insect structure and function E. U. Press, London, pp. 345-369.
 JAYARAMAN J. (1981) Laboratory manual in biochemistry. Wiley Eastern Ltd., Bangalore, P. 178.

- KRISHNAPPA B. L. (1989) Embryology of *Samia cynthia ricini* Boisduval (*Lepidoptera: Saturniidae*). M. Sc. (Agri.) Thesis, UAS, Bangalore, P. 116.
- LOWERY O. H., ROSEBOROUGH N. J., FARR A. L., RANDAL R. J. (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- NEEDHAM J. (1931) Chemical Embryology. Cambridge Univ. Press. Cambridge, P. 2021.
- PANT R., SHARMA K. K. (1968) Changes in nitrogenous compounds during embryonic development of *Philosamia ricini*. *Indian J. Expt. Biol.*, 6: 110-112.
- PANT R., SHARMA K. K. (1976) Variation in glycogen, total carbohydrates, free sugars, proteins, total free amino acids and some enzymes during embryonic development in *Antheraea mylitta*. *Curr. Sci.*, 45: 125-128.
- PANT R., NAUTIYAL G. C. (1974) Changes in protein, glycogen, free sugar content and active phosphorylase activity during embryogenesis of *Philosamia ricini*. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 80: 121-126.
- SINGH S. P., SINGH O. P. (1979) Changes in protein turn over and related biochemical correlates during embryonic development of *Philosamia ricini*. *Entomon*, 4: 327-329.
- SUNDERARAJ N., NAGARAJU J. S., VENKATARAMU M. N., JAGANATH M. K. (1972) Design and Analysis of Field Experiments. UAS Miss. Ser. 22, Bangalore, P. 424.

METABOLISME DE L'AZOTE AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *SAMIA CYNTHIA* *RICINI* BOISDUVAL

B. L. KRISHNAPPA, D. N. R. REDDY* & K. C. NARAYANASWAMY

Department of Sericulture, College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, GKVK,
Bangalore - 560 065, Inde.

La teneur en azote total des oeufs de *Samia cynthia ricini* demeure constante ($61,3735 \pm 0,2760$ à $61,8295 \pm 0,1955 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeufs) pendant le développement de l'embryon. Des fluctuations ont été remarquées dans la teneur en azote protéique (entre $40,8048 \pm 1,4986$ et $55,4666 \pm 0,4159 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeufs) et dans l'azote non protéique (entre $5,9809 \pm 0,4350$ et $20,7513 \pm 1,5177 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeufs). La fluctuation du niveau des diverses protéines pendant le développement s'inscrit dans une diminution globale pendant l'embryogenèse, la diminution étant moins importante que celle de l'azote. Une relation positive semble exister entre le nombre de jours de développement et l'azote total, l'azote non protéique, les protéines brutes et les protéines insolubles. Par ailleurs, le nombre de jours de développement est corrélé négativement avec l'azote protéique, les protéines totales, les collagènes et les protéines solubles. Les changements des niveaux d'azote et de protéines pendant le développement embryonnaire sont examinés.

INTRODUCTION

Pendant le processus de l'embryogenèse, les activités métaboliques servent à la croissance et à la différenciation des cellules. Les oeufs de *Samia cynthia ricini* Boisduval étant de type à coquille, ils ne peuvent puiser leurs nutriments à l'extérieur, ni ne peuvent les rejeter de l'intérieur de l'oeuf, si ce n'est pour l'oxygène et le dioxyde de carbone. Parmi les réserves de nourriture les plus importantes, les protéines ne sont responsables que d'une petite portion de l'ensemble des matériaux utilisés pour le développement à l'intérieur des oeufs à coquille et la réserve originelle en protéines ne diminue que très peu (Needham, 1931). Selon Pant et Sharma (1968), les niveaux d'azote total de l'oeuf et de la coquille, demeurent constants pendant l'embryogenèse de *Philosamia ricini*. Avec l'âge, l'azote protéique et l'azote non protéique diminuent. Cependant, l'azote aminée diminue jusqu'au troisième jour, mais augmente ensuite. Dans les oeufs de *Antheraea mylitta*, le niveau des protéines totales diminue pendant les premiers stades de développement, mais regagne son niveau d'origine le sixième jour (Pant et Sharma, 1976). La teneur en protéines totales des oeufs de *P. ricini* diminue à partir du premier jour, à partir du niveau initial le plus haut et demeure constante jusqu'au troisième jour. La diminution pourrait être reliée au processus de protéolyse et de désamination, afin de produire la glucosamine requise pour la biosynthèse de la chitine (Singh et Singh, 1979). Au vu de ces observations, l'étude actuelle a été entreprise afin de déterminer la variation de l'azote et des protéines chez *S. c. ricini* pendant l'embryogenèse.

MATERIEL ET METHODES

Les oeufs de *S. c. ricini* ont été obtenus en élevant la race ordinaire blanche du ver à soie eri sur des feuilles de ricin, ainsi que le décrit Basiah (1988). Des oeufs d'âge connu ont été répartis en cinq groupes de 100. Ils ont été soumis à une analyse d'azote et de protéines, toutes les 24 heures, depuis le jour de la ponte jusqu'à l'éclosion, selon Lowry et coll., (1951) et Jayaraman (1981). Les valeurs moyennes avec écart type et coefficients de corrélation ont été calculés pour toutes les valeurs analysées selon Sunderaraj et coll., (1972).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les variations observées pour les teneurs en azote et en protéines pendant l'embryogenèse des oeufs de *S. c. ricini* sont présentées dans les Tableaux I et II.

L'azote est le composant principal des protéines et des acides aminés. Il n'y a pas de changement dans la teneur en azote total des oeufs pendant leur développement. Cependant, le niveau le plus élevé d'azote est enregistré le dixième jour ($61.8295 \pm 0.1955 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf) et le moins élevé, le jour de la ponte ($61.3735 \pm 0.2760 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids frais des oeufs). Selon Chapman (1972), la teneur en azote total des oeufs des insectes demeure constante pendant leur développement. Pant et Sharma (1968) observèrent également un niveau constant d'azote dans les oeufs de *P. ricini* pendant l'embryogenèse. De petites fluctuations dans la teneur en azote total ont été remarquées dans les oeufs, ce qui pourrait être dû à un métabolisme actif des protéines. La teneur en azote total des oeufs est en relation positive avec les jours de développement ($r = 0.2520$), mais la corrélation semble être non-significative. L'azote protéique total diminue jusqu'au quatrième jour ($44.6621 \pm 0.7159 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf) mais augmente le cinquième jour ($54.8910 \pm 0.6055 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf). Il diminue progressivement avec le développement des oeufs pour atteindre $43.2099 \pm 1.1759 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf le dixième jour, juste avant l'éclosion. L'augmentation de l'azote protéique le cinquième jour, pourrait être due à une synthèse active d'azote protéique cellulaire au cours de la blastokinèse et de l'organogenèse. Cette supposition est corroborée par le fait qu'il existe une diminution correspondante du niveau d'azote non protéique le sixième jour. La diminution du niveau de l'azote protéique total pendant le dernier stade de développement, suggère que celui-ci est utilisé pour l'organogenèse et la biosynthèse de la chitine.

Pant et Sharma (1968) observèrent une relation inverse similaire entre les teneurs en azote protéique et en azote non protéique chez *P. ricini*, pendant l'embryogenèse. La teneur en azote protéique des oeufs est en relation négative avec les jours de développement ($r = -0.1873$), tandis que l'azote non-protéique est en relation positive ($r = 0.1940$). Cependant, les coefficients de corrélation sont non-significatifs.

La teneur en protéines sur la base du poids frais demeure constante pendant la totalité du développement embryonnaire. Le niveau maximum des protéines est observé le dixième jour ($386.4343 \pm 1.2219 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf) et le niveau minimum le jour de la ponte ($383.5845 \pm 1.7251 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf). Pant et Sharma (1976) observèrent une diminution du niveau des protéines pendant les premiers stades de développement des oeufs de *A. mylitta*. Une tendance similaire a également été observée chez *P. ricini* (Pant et Nautiyal, 1974). Un niveau plus élevé d'acides aminés libres pendant les premiers stades a été rapporté chez *P. ricini* (Pant et Sharma, 1968 ; Singh et Singh, 1979). Si l'on se base sur les résultats obtenus, on peut affirmer que pendant l'embryogenèse (formation de la bandelette germinative et organogenèse), la dissociation des protéines du jaune se produit pour la synthèse de nouvelles protéines cellulaires. L'augmentation du niveau en protéines totales le cinquième jour, pourrait être liée à la blastokinèse (Krishnappa, 1989). La diminution significative le huitième jour (stade de la pigmentation de la tête) confirme la participation des protéines totales à la synthèse de la chitine. Une corrélation négative non significative ($r = -0.1886$) apparaît entre les jours de développement et les protéines des oeufs.

Les protéines collagènes formant les principaux composants de la structure des cellules, montrent une augmentation initiale de leurs niveaux, mais diminuent de manière uniforme pendant le développement jusqu'au septième jour. Le déclin et la dégradation des protéines collagènes sont attribués à la pigmentation de la tête et à la biosynthèse de la chitine, qui sont en corrélation négative et significative avec les jours de développement.

La teneur en protéines solubles est de $60,8547 \pm 0,9368 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf au premier jour, elle atteint un maximum le quatrième jour ($65,8396 \pm 1,0912 \mu\text{g} / \text{mg}$ d'oeuf) avec une diminution plus importante vers l'éclosion. Les protéines solubles sont un composant de rendement d'énergie qui n'est pas pris en compte dans le processus de formation du corps de l'embryon. Au premier jour, on observe les vitellophages avec la formation de la bandelette germinative (Krishnappa, 1989). L'accumulation des protéines solubles semble devoir être attribuée aux besoins en énergie de la blastokinèse le quatrième jour. Le huitième jour, la pigmentation de la tête est suivie de l'apparition d'autres structures chitineuses telles que les soies et les pattes. Le processus peut consommer beaucoup d'énergie, ce qui explique l'épuisement soudain des protéines solubles le septième jour. Cependant, le niveau peut être soutenu par une augmentation simultanée du niveau de l'azote non protéique pendant cette période, établissant ainsi une corrélation négative ($r = -0,3089$) entre les protéines solubles et la teneur en azote non protéique. En outre, la teneur en protéines solubles est corrélée négativement et de manière significative avec les jours de développement ($r = -0,8809$). Les variations des niveaux de protéines sont généralement associées avec leur utilisation pour l'organogenèse et la biosynthèse de la chitine pendant le développement progressif de l'embryon.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Mûrier	659
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	661
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	663
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	665
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	669
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	677
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	679
Silkworms: silkglands	
Soie	681
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) Portugais / <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.

Mûrier

Mulberry

Evaluation of rotary tillers for intercultivation in rainfed mulberry garden.

Evaluation des labours rotatifs pour l'interculture dans les plantations de mûriers.

GOWDA C., SHANKA A.

Department of Agricultural Engineering and Department of Sericulture, UAS, Bangalore 560 065, India.

1998 Mysore J. Agric. Sci., Vol. 32(2), 131-135. (E)

Mulberry as an intercrop in coconut gardens over years.

Mûriers comme culture intercalée dans les plantations de noix de coco.

JAYARAMAIAH M., DEVAIAH C.

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore 560 065, India.

1998 Mysore J. Agric. Sci., Vol. 32(2), 136-141. (E)

Study on the broken leafstalk type of mulberry bacterial disease.

Etude sur le type de rupture de pétiole dues aux maladies bactériennes du mûrier.

MAO J., DU H., PU G., TAN S.

Sericultural College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1999 Canye Kexue, Vol. 25(4), 203-207. (C,e)

S1635: a mulberry variety for Eastern and North-eastern in India.

S1635 : une variété de mûrier pour l'Est et le Nord-Est de l'Inde.

VIJAYAN K. *et al.*

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

1999 Indian Silk, Vol. 38(7), 22-24. (E)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Impact of seasons on pure Mysore breed of silkworm, *Bombyx mori* in seed cocoon generation.
Impact des saisons sur les races Pure Mysore de ver à soie, *Bombyx mori* à la génération des cocons destinés au grainage.

BABU T. *et al.*

SCPC, Denkanikottai, Tamil Nadu, India.

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(8), 5-8. (E)

Pathogenic action of surface-antigen protein of *Nosema bombycis* to silkworm.

Action pathogène de l'antigène de surface de *Nosema bombycis* pour le ver à soie.

CUI H. *et al.*

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 261-262. (C)

Germination rates of microsporidian spores and their invading activities to cell line.

Taux de germination des spores de microsporidiens et activité invasive pour la lignée cellulaire.

GONG C., SYOJI H.

Sericultural College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 213-216. (C,e)

Breeding of Densonucleosis (DNV) resistance near-isogenic line and RAPD molecular markers.

Obtention de lignées presque isogéniques résistantes à la densonucléose (DNV) et marqueurs moléculaires RAPD.

HE Y., HE S., LU C., XIANG Z.

The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 217-220. (C,e)

Scientific and practical methods of silkworm disease management.

Méthodes scientifiques et pratiques de gestion des maladies des vers à soie.

NATARAJU B. *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570008, India.

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(8), 16-20. (E)

Search for food habit mutations hidden in native races of the silkworm, *Bombyx mori*, and their mode of inheritance.

Recherche des mutations cachées concernant les habitudes de nourriture chez les races de *Bombyx mori*, et leur mode de transmission héréditaire.

OHNUMA A.

1999 *Reports of the Silk Science Research Institute*, Vol. 47, 5-49. (J,e)

Evaporative cooling systems for silkworm seed production.

Systèmes de refroidissement par évaporation pour la production de graines de ver à soie.

PRASAD G.V. *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Rayachoti, India.

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(8), 9-15. (E)

Lime and its application in silkworm disease management.

La chaux et ses applications dans la gestion des maladies du ver à soie.

PRASAD N.R.

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

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(7), 12-14. (E)

Breeding of a marking sex-limited silkworm variety Qiu.Xi x Xia D for summer and autumn rearing.

Lignage d'une variété de ver à soie à marquage limité au sexe, Qiu.Xi x Xia D pour les élevages d'été et d'automne.

SHEN X., LI Y., MIAO M., TANG S., LI G.

The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 208-212. (C,e)

Detection of the spores of *Nosema antheraea* by monoclonal antibody technique.

Détection de spores de *Nosema antheraea* par anticorps monoclonal.

TANG X., HUANG Z., NING B., ZHANG C.

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

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 221-224. (C,e)

Replication of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus in permissive and non-permissive lepidopteran cell lines.

Réplication du virus de la polyédrose nucléaire de *Spodoptera exigua* dans les lignées cellulaires permissives et non-permissives de lépidoptères.

YANASE T., YASUNAGA C., KAWARABATA T.

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

1999 *Acta. Virol.*, Vol. 42(5), 293-298. (E)

Effects of the storage procedures of fresh silkworm cocoon on microclimate and moisture content of cocoon shell in a heap of cocoon.

Effets des procédures de stockage des cocons frais de ver à soie sur le taux d'humidité des coques de cocons dans un amas de cocons.

ZHENG X. *et al.*

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 263-265. (C)

Study on a microsporidian *Vairimorpha* MG4 separated from silkworm, *Bombyx mori*.

Etude d'un microsporidien, *Vairimorpha* MG4, du ver à soie *Bombyx mori*.

ZHENG X. *et al.*

Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510642, China.

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 225-229. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

A report on the breeding of a new big cocoon variety of Tussah silkworm 91584.

Un rapport sur l'obtention d'une nouvelle variété à gros cocon de ver à soie Tussah (91584).

REN S. *et al.*

1999 Canye Kexue, Vol. 25(4), 266. (C)

Viability of tasar hybrids - A perspective.

Viabilité des hybrides tasars - Une perspective.

SHANKAR RAO K.V. *et al.*

Regional Tasar Research Station, Jagdalpur, Madhya Pradesh, India.

1999 Indian Silk, Vol. 38(7), 15-17. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

A complete full-length non-LTR retrotransposon, BMC1, on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*.

Un rétrotransposon non-LTR complet, BMC1, sur le chromosome W du ver à soie, *Bombyx mori*.
ABE H. *et al.*

Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

1998 Genes Gene.t Syst., Vol. 73(6), 353-358. (E)

Genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, nsd-1, in the silkworm, *Bombyx mori*.

Carte génétique des marqueurs RAPD associés au gène réfractaire à la denonucléose, nsd-1, chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

ABE H. *et al.*

Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

1998 Genes Genet. Syst., Vol. 73(4), 237-242. (E)

Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences.

Identification de nouveaux RAPDs sur le chromosome W du ver à soie domestique, *Bombyx mori*, et du ver à soie sauvage, *B. mandarina*, et la séquence nucléotidique de leurs éléments rétrotransposables.

ABE H. *et al.*

Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

1998 Genes Genet. Syst., Vol. 73(4), 243-254. (E)

Expression of C and E1 gene of HCV in silkworm with recombinant BmNPV.

Expression des gènes E1 et C de HCV chez le ver à soie avec un BmNPV recombinant.

CAO G. *et al.*

Center of Biotechnology, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

1999 Canye Kexue, Vol. 25(4), 230-236. (E)

Integration of *Bombyx mori* R2 sequences into the 28s ribosomal RNA genes of *Drosophila melanogaster*.

Intégration des séquences R2 de *Bombyx mori* dans les gènes d'ARN ribosomique 28s de *Drosophila melanogaster*.

EICKBUSH D.G., LUAN D.D., EICKBUSH T.H.

Department of Biology, University of Rochester, Rochester, New York 14627-0211, USA.

1999 *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 20(1), 213-223. (E)

High-level expression of secreted glycoproteins in transformed lepidopteran insect cells using a novel expression vector.

Expression élevée de glycoprotéines sécrétées dans les cellules de lépidoptères transformées en utilisant un nouveau vecteur d'expression.

FARRELL P.J. *et al.*

Department of Medical Biochemistry, The University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 1N4, Canada.

1999 *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 60(6), 656-663. (E)

Transformed Lepidopteran insect cells: new sources of recombinant human tissue plasminogen activator.

Cellules de Lépidoptères transformées ; nouvelles sources d'activateur de plasminogène recombinant de tissus humains.

FARRELL P.J., BEHIE L.A., IATROU K.

Departments of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 1N4, Canada.

1999 *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 64(4), 426-433. (E)

An alternative intronic promoter of the *Bombyx* A3 cytoplasmic actin gene exhibits a high level of transcriptional activity in mammalian cells.

Un promoteur intronique alternatif du gène d'actine cytoplasmique A3 de *Bombyx* montre un haut niveau d'activité transcriptionnelle dans les cellules de mammifères.

FATYOL K., ILLES K., SZALAY A.A.

Center for Molecular Biology and Gene Therapy, School of Medicine, Loma Linda University, CA 92354, USA.

1999 *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 261(2), 337-345. (E)

Inducible gene expression of moricin, a unique antibacterial peptide from the silkworm (*Bombyx mori*).

Expression inductible du gène de moricine, un peptide antibactérien unique du ver à soie (*Bombyx mori*).

FURUKAWA S. *et al.*

Laboratory of Applied Zoology, Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

1999 *Biochem. J.*, Vol. 340(1), 265-271. (E)

A practical method for introducing sex-limited markers of silkworm, *Bombyx mori*.

Une méthode pratique pour introduire des marqueurs limités au sexe chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

HE K., HUANG J., ZHU X., XIA J.

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

1999 *Canye Kexue*, Vol. 25(4), 246-248. (C,e)

Molecular genetic relationship between *Bombycidae* and *Saturniidae* based on the mitochondria DNA encoding of large and small rRNA.

Relations génétiques moléculaires entre *Bombycidae* et *Saturniidae* basées sur l'ADN mitochondrial codant pour les ARNr petit et grand.

HWANG J.S. *et al.*

National Sericulture and Entomology Research, R.D.A., Suwon, South Korea.

1999 *Genet. Anal.*, Vol. 15(6), 223-228. (E)

The comparative molecular study between *Bombycidae* and *Saturniidae* based on mtDNA RFLP and cytochrome oxidase I gene sequences: implication for molecular evolution.

L'étude comparative moléculaire entre *Bombycidae* et *Saturniidae* basée sur les RFLP d'ADNmt et les séquences du gène de la cytochrome-oxydase I : implication pour l'évolution moléculaire.

HWANG J.S. *et al.*

National Sericulture and Entomology Research, R.D.A., Suwon, Korea.

1999 *Z. Naturforsch.*, Vol. 54(7-8), 587-594. (E)

Characterization of baculovirus repeated open reading frames (bro) in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

Caractérisation des cadres de lecture ouverte répétés (bro) chez le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

KANG W. *et al.*

Laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, Wako, Japan.

1999 *J. Virol.*, Vol. 73(12), 10339-10345. (E)

Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants.

Caractérisation moléculaire de mutants du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

KATSUMA S. *et al.*

Department of Agricultural and Environmental Biology, University of Tokyo, Japan.

1999 *Arch. Virol.*, Vol. 144(7), 1275-1285. (E)

Relationship between the BmXDHI gene and the oq translucent-skin silkworm mutant.

Relation entre le gène BmXDHI et le ver à soie mutant oq à peau translucide.

KOMOTO N., YUKUHIRO K., TAMURA T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 357-363. (E,j)

Molecular structure of the copia-like retrotransposable element Yokozuna on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure moléculaire de l'élément rétrotransposable de type Copia, Yokozuna, sur le chromosome W du ver à soie, *Bombyx mori*.

OHBAYASHI F. *et al.*

Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

1998 *Genes Genet. Syst.*, Vol. 73(6), 345-352. (E)

TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods.

Répétitions de séquences télomériques TTAGG dans les chromosomes d'insectes et autres arthropodes.

SAHARA K., MAREC F., TRAUT W.

Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

1999 *Chromosome Res.*, Vol. 7(6), 449-460. (E)

Bm kettin, homologue of the *Drosophila* kettin gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and it's not dosage compensated.

Kettine Bm, homologue du gène de kettine de la *Drosophila*, est localisé sur le chromosome Z chez *Bombyx mori* et n'est pas compensé par dosage génique.

SUZUKI M.G., SHIMADA T., KOBAYASHI M.

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Japan.

1999 *Heredity*, Vol. 82(2), 170-179. (E)

The influence of triploidy on gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*.

L'influence de la triploidie sur l'expression des gènes chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

SUZUKI M.G., SHIMADA T., YOKOYAMA T., KOBAYASHI M.

Department of Agricultural and Environmental Biology, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

1999 *Heredity*, Vol. 82(6), 661-667. (E)

Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector.

Transformation de la lignée germinale du ver à soie *Bombyx mori* L. en utilisant un vecteur dérivé du transposon piggyBac.

TAMURA T. *et al.*

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

2000 *Nature Biotechnology*, Vol. 18(1), 81-84. (E)

Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization.

Différenciation moléculaire des chromosomes sexuels explorée par hybridation génomique comparative.

TRAUT W., SAHARA K., OTTO T.D., MAREC F.

Institut für Biologie, Medizinische Universität zu Lubeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lubeck, Germany.

1999 *Chromosoma*, Vol. 108(3), 173-180. (E)

Construction and characterization of bacterial artificial chromosomalibraries from the silkworm, *Bombyx mori*.

Construction et caractérisation de banques de chromosomes artificiels bactériens du ver à soie, *Bombyx mori*.

WU C. *et al.*

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1999 *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 261(4-5), 698-706. (E)

Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus.

Ciblage de gène chez le ver à soie à l'aide de baculovirus.

YAMAO M. *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto, Japan.

1999 *Genes Dev.*, Vol. 13(5), 511-516. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

A baculovirus anti-apoptosis gene homolog of the *Trichoplusia ni* granulovirus.

Un homologue du gène anti-apoptose de baculovirus chez le granulovirus de *Trichoplusia ni*.

BIDESHI D.K., ANWAR A.T., FEDERICI B.A.

Graduate Program in Genetics, Department of Entomology University of California, Riverside, California, USA.

1999 *Virus Genes*, Vol. 19(2), 95-101. (E)

Interactions between Ca²⁺ and cAMP in ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of *Bombyx mori*.

Interactions entre Ca²⁺ et cAMP dans la sécrétion d'ecdystéroïde des glandes prothoraciques de *Bombyx mori*.

DEDÓS S.G., FUGO H.

Department of Biological Production, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

1999 *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol. 154(1-2), 63-70. (E)

Involvement of calcineurin in the signal transduction of PBAN in the silkworm, *Bombyx mori*.

Implication de la calcineurine dans le signal de transduction de PBAN chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

FONAGY A. *et al.*

Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.

1999 *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 124(1), 51-60. (E)

Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitin oligomers in the silkworm, *Bombyx mori*.

Induction de l'expression de gènes de protéines antibactériennes par des oligomères de chitine chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

FURUKAWA S., TANIAI K., YANG J., SHONO T., YAMAKAWA M.

Laboratory of Applied Zoology, Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1999 *Insect. Mol. Biol.*, Vol. 8(1), 145-148. (E)

Isolation and structure determination of a paralytic peptide from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Isolement et détermination de la structure d'un peptide paralysant de l'hémolymphe du ver à soie, *Bombyx mori*.

HA S.D., NAGATA S., SUZUKI A., KATAOKA H.

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Bunkyo-ku, Japan.

1999 *Peptides*, Vol. 20(5), 561-568. (E)

Effect of octopamine on the activity of juvenile-hormone esterase in the silkworm *Bombyx mori* and the red flour beetle *Tribolium freemani*.

Effet de l'octopamine sur l'activité de l'estérase d'hormone juvénile chez le ver à soie *Bombyx mori* et la coccinelle rouge *Tribolium freemani*.

HIRASHIMA A. *et al.*

Graduate School, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan.

1999 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 116(3), 373-381. (E)

Biological activities of a novel lectin derived from silkworm faeces: characteristics changes of mouse peritoneal macrophages by the lectin.

Activités biologiques d'une nouvelle lectine dérivée des fèces de vers à soie : changements de caractéristiques des macrophages péritonéaux de souris par la lectine.

HIRAYAMA E. *et al.*

Institutes of Molecular and Cellular Biology for Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University, Japan.

1999 *Cell. Struct. Funct.*, Vol. 23(5), 303-313. (E)

Cloning and sequence analysis of the aminopeptidase N isozyme (APN2) from *Bombyx mori* midgut.

Clonage et analyse de séquence de l'isozyme de l'aminopeptidase N (APN2) de l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

HUA G., TSUKAMOTO K., IKEZAWA H.

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Aichi, Japan.

1998 *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 121(2), 213-222. (E)

Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*.

Identification d'un peptide prothoracicostatique dans le cerveau de la larve chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

HUA Y.J. *et al.*

Laboratory of Bioactive Substances, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1999 *J. Biol. Chem.*, Vol. 274(44), 31169-31173. (E)

The enzyme that synthesizes tetrahydrobiopterin from 6-pyruvoyl-tetrahydropterin in the lemon mutant silkworm consists of two carbonyl reductases.

L'enzyme qui synthétise la tétrahydrobioptérine à partir de la 6-pyruvoyl tétrahydroptérine chez le mutant jaune du ver à soie consiste en deux carbonyl-réductases.

IINO T., TAKIKAWA S.I., YAMAMOTO T., SAWADA H.

Department of General Studies, Nihon University, Sakurajosui 3-25-40, Setagayaku, Tokyo 156, Japan.

2000 *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 373(2), 442-446. (E)

Minimum structure of peptidoglycan required for induction of antibacterial protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*.

Structure minimum de peptidoglycane nécessaire pour l'induction de la synthèse de la protéine antibactérienne chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

IKETANI M. *et al.*

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Japan.

1999 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 29(1), 19-24. (E)

The stage-and cell-specific expression of the *Bombyx mori* diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (BomDH-PBAN) gene in the transformed *Drosophila*.

Expression spécifique du gène du neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone et d'hormone de diapause de *Bombyx mori* (BomDH-PBAN) chez la drosophile transformée.

ISHIDA Y., NIIMI T., YAMASHITA O.

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, 464-8601, Japan.
1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 417-427. (E,j)

An assay system for insect bioactive substances in plants utilizing polyphagous silkworm races and an artificial diet impregnated with plants or plant extracts and presence of ecdysone like substance in spinach, *Spinacia oleracea*.

Un essai de substances bioactives dans des plantes utilisant des races de vers à soie polyphages et un aliment artificiel imprégné de plantes ou d'extraits de plantes et présence de substance "ecdysone like" chez l'épinard, *Spinacia oleracea*.

ISHII S., TAKABA M.

Sericulture Branch, Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station, 3-2-1 Fueda, Tateoka, Yamagata-Ken, 995-024, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 381-386. (J,e)

Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut.

Clonage de l'ADNc de la phosphatase alcaline soluble et bases moléculaires de la nature polymorphique chez les isozymes de phosphatase alcaline de l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

ITO M., KANAMORI Y., TAKAO M., EGUCHI M.

Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Japan.

1999 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 29(2), 121-129. (E)

Neuroendocrine cascade involved in molting and metamorphosis in the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*.

Mise en jeu d'une cascade neuroendocrine dans la mue et la métamorphose chez le ver de la pomme de terre douce, *Agrius convolvuli*.

JIANG Y., KIGUCHI K., AIZONO Y.

Division of Bioscience, The Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 387-395. (E,j)

Combinative stimulation inactivates sex pheromone production in the silkworm moth, *Bombyx mori*.

La stimulation combinée inactive la production de phéromone sexuelle chez le papillon du ver à soie, *Bombyx mori*.

KARUBE F., KOBAYASHI M.

Laboratory of Insect Genetics and Bioscience, Faculty of Agriculture, Tokyo University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

1999 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 42(2), 111-118. (E)

Cloning and expression of apolipophorin-III from the common cutworm, *Spodoptera litura*.

Clonage et expression de l'apolipophorine-III du ver commun des moissons, *Spodoptera litura*.

KIM E., KIM S.H., CHOI C.S., PARK Y.I., KIM H.R.

Department of Biology, Korea University, Seoul, Korea.

1999 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 39(4), 166-173. (E)

Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*.

Biosynthèse des protéines plasmatiques majeures dans la culture primaire de cellules du corps adipeux du ver à soie, *Bombyx mori*.

KISHIMOTO A., NAKATO H., IZUMI S., TOMINO S.

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Japan.

1999 *Cell. Tissue Res.*, Vol. 297(2), 329-335. (E)

The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains.

La protéine de liaison de lipopolysaccharides participant à la formation de nodule hémocytaire chez *Bombyx mori* est un nouveau membre de la super famille des lectines de type C avec deux domaines de reconnaissance de carbohydrates en tandem.

KOIZUMI N. *et al.*

Depart. of Applied Biol. Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Japan.

1999 *FEBS Lett.*, Vol. 443(2), 139-143. (E)

Structure and expression of tandemly duplicated xanthine dehydrogenase genes of the silkworm (*Bombyx mori*).

Structure et expression de gènes de xanthine-déshydrogénase dupliqués en tandem chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

KOMOTO N., YUKUHIRO K., TAMURA T.

Department of Insect Genetics and Breeding, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1999 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 8(1), 73-83. (E)

Cloning and sequence of a cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage et séquence d'un ADNc d'une protéase très basique du suc digestif du ver à soie, *Bombyx mori*.

KOTANI E. *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Japan.

1999 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 8(2), 299-304. (E)

Trypsin inhibitor polymorphism in the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*.

Polymorphisme de l'inhibiteur de trypsine dans le cocon du ver à soie, *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M., HIRANO H.

The Silk Science Research Institute of the Dainippon Raw Silk Foundation, Hyakunincho 3-25-1, Shinjuku-ku, 169-0073, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 397-403. (Ej)

Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*.

Structure primaire et fonctions possibles d'un inhibiteur de trypsine de *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M., HIRANO H.

The Silk Science Research Institute of the Dainippon Raw Silk Foundation, Shinjuku-ku, Japan.

1999 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 259(1-2), 120-126. (E)

Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*.

Structure disulfure de la protéine fixant la phéromone du papillon du ver à soie, *Bombyx mori*.

LEAL W.S., NIKONOVA L., PENG G.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Japan.

1999 *FEBS Lett.*, Vol. 464(1-2), 85-90. (E)

Prothoracicotropic activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*.

Activité prothoracicotrope de SBRPs, les peptides "insuline" du ver à soie *Samia cynthia ricini*.
NAGATA K. *et al.*

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan.

1999 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 266(2), 575-578. (E)

Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system.

Effet cinétique de l'hémolymphe de ver à soie sur la mort retardée de cellule hôte dans un système baculovirus - cellule d'insecte.

RHEE W.J., KIM E.J., PARK T.H.

School of Chemical Engineering, Seoul National University, Kwanak-Gu Shilim-Dong San 56-1, Seoul 151-742, Korea.

1999 Biotechnol. Prog., Vol. 15(6), 1028-1032. (E)

Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*.

Analyse structurelle et assemblage de pont disulfure de deux protéines de liaison d'odeurs chez *Bombyx mori*.

SCALONI A., MONTI M., ANGELI S., PELOSI P.

Centro Internazionale Servizi di Spettrometria di Massa-Iabbam, National Research Council, Naples 80131, Italy.

1999 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 266(2), 386-391. (E)

Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. coli* infection.

Induction des isozymes de la carboxylestérase chez *Bombyx mori* par infection avec *E. coli*.

SHIOTSUKI T., KATO Y.

Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ibaraki, Japan.

1999 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 29(8), 731-736. (E)

Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*.

Clonage moléculaire et caractérisation d'un ADNc codant pour une protéine de la cuticule larvaire de *Bombyx mori*.

SHOFUDA K., TOGAWA T., NAKATO H., TOMINO S., IZUMI S.

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Minamiosawa, Japan.

1999 Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., Vol. 122(1), 105-109. (E)

Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L.

Impact toxique des insecticides organophosphorés sur l'activité acétylcholinestérase chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

SURENDRA NATH B., SURENDRA KUMAR R.P.

Department of Zoology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, 515 003, India.

1999 Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol. 42(2), 157-162. (E)

Ecdysone has an effect on the regeneration of midgut epithelial cells that is distinct from 20-hydroxyecdysone in the silkworm *Bombyx mori*.

L'ecdysone a un effet sur la régénération des cellules épithéliales de l'intestin moyen qui est distinct de la 20-hydroxyecdysone chez le ver à soie *Bombyx mori*.

TANAKA Y., YUKUHIRO F.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, 305-8634, Japan.

1999 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 116(3), 382-395. (E)

Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation.

Phéromones d'insectes - un panorama de la biosynthèse et de la régulation endocrine.

TILLMAN J.A., SEYBOLD S.J., JURENKA R.A., BLOMQUIST G.J.

Department of Biochemistry, 330, University of Nevada, Reno 89557-0014, USA.

1999 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 29(6), 481-514. (E)

Two concentric protein shell structure with spikes of silkworm *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus revealed by small-angle neutron scattering using the contrast variation method.

Deux structures concentriques de la coque protéique possédant des pointes sont visibles sur le virus de la polyédrose cytoplasmique du ver à soie *Bombyx mori* par diffusion de neutrons en utilisant la méthode de variation de contraste.

TOMITA M. *et al.*

Department of Chemistry for Materials, Mie University, Tsu, 514-8507, Japan.

1999 *J. Biochem.*, Vol. 125(5), 916-922. (E)

Influence of juvenile hormone and mating on oogenesis and oviposition in the codling moth, *Cydia pomonella*.

Influence de l'hormone juvénile et de l'accouplement sur l'ovogenèse et l'oviposition chez la pyrale des pommes, *Cydia pomonella*

WEBB T.J. *et al.*

Institute of Plant Sciences, Applied Entomology, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

1999 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 41(4), 186-200. (E)

Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes.

Changement de configuration de la protéine liant la phéromone de *Bombyx mori* induit par le pH et par l'interaction avec des membranes.

WOJTASEK H., LEAL W.S.

Laboratory of Chemical Prospecting, 1-2 Ohwashi, Tsukuba 305-8634, Japan.

1999 *J. Biol. Chem.*, Vol. 274(43), 30950-30956. (E)

Molecular characterization of the cDNA encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Bombyx mandarina*.

Caractérisation moléculaire de l'ADNc codant pour l'hormone de diapause et le neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone chez *Bombyx mandarina*.

XU W., SATO Y., YAMASHITA O.

Laboratory of Sericultural Science and Entomoresources, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 373-379. (Ej)

Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*.

Protéines immunes et expression de leurs gènes chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

YAMAKAWA M., TANAKA H.

Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ibaraki, Japan.

1999 *Dev. Comp. Immunol.*, Vol. 23(4-5), 218-289. (E)

Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme.

La région proximale de la protéinase à cystéine de *Bombyx mori* fonctionne comme chaperone intramolécule pour promouvoir le repliement correct de l'enzyme mature.

YAMAMOTO Y. *et al.*

Department of Biochemistry and Radiation Biology, College of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

1999 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 42(3), 167-178. (E)

Purification and characterization of *Bombyx* cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation des inhibiteurs spécifiques de protéase à cystéine de *Bombyx*, à partir de l'hémolymphe de *Bombyx mori*.

YAMAMOTO Y. *et al.*

Department of Biochemistry and Radiation Biology, College of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan.

1999 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 42(2), 110-129. (E)

A novel inhibitor protein for *Bombyx* cysteine proteinase is homologous to propeptide regions of cysteine proteinases.

Une nouvelle protéine inhibitrice de la protéase à cystéine de *Bombyx mori* est homologue aux régions propeptidiques des protéases à cystéine.

YAMAMOTO Y., WATABE S., KAGEYAMA T., TAKAHASHI S.Y.

Department of Biochemistry and Radiation Biology, College of Agriculture, Yamaguchi University, Japan.

1999 *FEBS Lett.*, Vol. 448(2-3), 257-260. (E)

cDNA and deduced amino acid sequences of apolipoprotein-III from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*.

ADNe et déduction des séquences d'acides aminés des apolipoprotéine-III de *Bombyx mori* et *Bombyx mandarina*.

YAMAUCHI Y. *et al.*

Graduate School of Bio-Application and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

2000 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 43(1), 16-21. (E)

Studies on the antioxidative activity of cocoon shell, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'activité antioxydante de la coque du cocon de *Bombyx mori*.

YAMAZAKI M., NAKAMURA N., KURIOKA A., KOMATSU K.

Silk Science Research Institute, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

1999 *Reports of the Silk Science Research Institute*, Vol. 47, 1-4. (J)

cDNA cloning and gene expression of cecropin D, an antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage d'ADNc et expression du gène de la cécropine D, une protéine antibactérienne chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

YANG J. *et al.*

Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ibaraki, Japan.

1999 *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 122(4), 409-414. (E)

cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*.

Clonage et expression d'ADNc de la toxine Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* fixant l'aminopeptidase N de 120 kDa de *Bombyx mori*.

YAOI K. *et al.*

Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-0054, Japan.

1999 *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1444(1), 131-137. (E)

***Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N.**

Région de l'aminopeptidase N de *Bombyx mori* liant la toxine Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*.

YAOI K. *et al.*

Graduate School of Bio-Application and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Japan.

1999 *FEBS Lett.*, Vol. 463(3), 221-224. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Ecdysone 20-monooxygenase in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: enzymatic properties and developmental changes.

Ecdysone 20-monooxygénase dans les oeufs de ver à soie, *Bombyx mori* : propriétés enzymatiques et changements au cours du développement.

HORIKE N., SONOBE H.

Department of Biology, Konan University, Kobe, Japan.

1999 *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, Vol. 41(1), 9-17. (E)

Diapause-associated transcription of BmETs, a gene encoding an ETS transcription factor homolog in *Bombyx mori*.

Transcription de BmETs associée à la diapause, un gène codant un homologue de facteur de transcription ETS chez *Bombyx mori*.

SUZUKI M.G., TERADA T., KOBAYASHI M., SHIMADA T.

Department of Agricultural and Environmental Biology, University of Tokyo, Japan.

1999 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 29(4), 339-347. (E)

Molecular mechanism of diapause in *Bombyx mori*. 2. Diapause determination and expression of diapause hormone gene in pupal stage.

Mécanisme moléculaire de la diapause chez *Bombyx mori*. 2. Détermination de la diapause et expression du gène de l'hormone de diapause au stade de la chrysalide.

XU W.H.

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

1999 *I Chuan Hsueh Pao*, Vol. 26(2), 107-111. (C)

Behavior of centrioles during meiosis in the male silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera).

Comportement des centrioles pendant la méiose chez le ver à soie mâle, *Bombyx mori* (Lepidoptera).

YAMASHIKI N., KAWAMURA N.

Biology Laboratory, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

1998 *Dev. Growth. Differ.*, Vol. 40(6), 619-630. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Expression of elongation factor 1 beta' in *Escherichia coli* and its interaction with elongation factor 1 alpha from silk gland.

Expression du facteur d'allongement bêta 1 chez *Escherichia coli* et ses interactions avec le facteur d'allongement alpha 1 de la glande séricigène.

KAMIIE K. *et al.*

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Engineering, Aomori University, Japan.

1999 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 63(4), 666-671. (E)

Embryonic silk gland development in *Bombyx*: molecular cloning and expression of the *Bombyx* trachealess gene.

Développement embryonnaire de la glande séricigène chez *Bombyx* : clonage moléculaire et expression du gène "sans trachée" de *Bombyx*.

MATSUNAMI K. *et al.*

Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji-cho, Okazaki 444-8585, Japan.

1999 *Dev. Genes Evol.*, Vol. 29(9), 507-514. (E)

Small ampullate glands of *Nephila clavipes*.

Petites glandes ampoulaire de *Nephila clavipes*.

ORTIZ R. *et al.*

Graciela C. Candelas, Department of Biology, University of Puerto Rico, San Juan 00931-3360, Puerto Rico.

2000 *J. Exp. Zool.*, Vol. 286(2), 114-119. (E)

Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*.

Détermination du site de liaison disulfure entre les chaînes lourde et légère de fibroïne de soie produites par *Bombyx mori*.

TANAKA K. *et al.*

Laboratory of Molecular Biology, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan.

1999 *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1432(1), 92-103. (E)

Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*.

Intéraction hydrophobique de P25, contenant des chaînes d'oligosaccharides liées à l'Asn, avec le complexe H-L de fibroïne de soie produite par *Bombyx mori*.

TANAKA K., INOUE S., MIZUNO S.

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan.

1999 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 29(3), 269-276. (E)

Biology of spider silk.

Biologie de la soie d'araignée.

VOLLRATH F.

Department of Zoology, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark.

1999 Int. J. Biol. Macromol., Vol. 24(2-3), 81-88. (E)

Relationship between the molecular structure and the adhesive properties of sericin protein.

Relation entre la structure moléculaire et les propriétés adhésives de la sérine.

ZHU L.

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

1999 Canye Kexue, Vol. 25(4), 237-241. (C,e)

Soie

Silk

Spider (*Araneus diadematus*) cocoon silk: a case of non-periodic lattice crystals with a twist.

Soie du cocon d'araignée (*Araneus diadematus*) : un cas de réseau cristallin non périodique avec une torsion.

BARGHOUT J.Y., THIEL B.L., VINEY C.

University of Oxford, Department of Materials, UK.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 211-217. (E)

The effect of post-spin drawing on spider silk microstructure: a birefringence model.

L'effet de la post-rotation sur la microstructure de la soie d'araignée : un modèle de biréfringence.

CARMICHAEL S., BARGHOUT J.Y., VINEY C.

University of Oxford, Department of Materials, UK.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 219-226. (E)

Protein and amino acid composition of silks from the cob weaver, *Latrodectus hesperus* (black widow).

Composition en acides aminés et en protéines des soies de l'araignée, *Latrodectus hesperus* (veuve noire).

CASEM M.L., TURNER D., HOUCHIN K.

Joint Science Department, The Claremont Colleges, W.M. Keck Science Center, Claremont, CA 91711, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 103-108. (E)

The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function.

L'étude mécanique des soies d'araignée : de la séquence de la fibroïne aux fonctions mécaniques.

GOSLINE J.M., GUERETTE P.A., ORTLEPP C.S., SAVAGE K.N.

Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada.

1999 *J. Exp. Biol.*, Vol. 202(23), 3295-3303. (E)

Short and long range order of the morphology of silk from *Latrodectus hesperus* (Black Widow) as characterized by atomic force microscopy.

Ordres de faible et forte amplitude dans la soie de *Latrodectus hesperus* (veuve noire), caractérisés par microscopie atomique.

GOULD S.A., TRAN K.T., SPAGNA J.C., MOORE A.M., SHULMAN J.B.

W.M. Keck Science Center, The Claremont Colleges, CA 91711-5916, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 151-157. (E)

Molecular chain orientation in supercontracted and re-extended spider silk.

Orientation de la chaîne moléculaire dans la soie d'araignée supercontractée et ré-étendue.

GRUBB D.T., JI G.

Department of Materials Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 203-210. (E)

Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins.

Hypothèses pour corréler la séquence, la structure et les propriétés mécaniques des protéines de soie d'araignée.

HAYASHI C.Y., SHIPLEY N.H., LEWIS R.V.

Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie 82071-3944, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 271-275. (E)

Impact of fungal growth on the physical properties of silk fabric.

Impact de la croissance fongique sur les propriétés physiques des tissus de soie.

IRAMMA G. *et al.*

Head of Dept. of Textiles and Clothing and RA, Dharwad, India.

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(8), 24-27. (E)

Orientation, structure, wet-spinning, and molecular basis for supercontraction of spider dragline silk.

Orientation, structure, filage humide et bases moléculaires de la supercontraction de la soie de toile d'araignée.

JELINSKI L.W. *et al.*

Center for Advanced Technology in Biotechnology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 197-201. (E)

Dimorphism of polyglycine I: structural models for crystal modifications.

Dimorphisme de la polyglycine I : modèles structuraux des modifications cristallines.

KAJAVÄ A.V.

Swiss Institute for Experimental Cancer Research, CH-1066 Epalinge s/ Lausanne, Switzerland.

1999 *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, Vol. 55(2), 436-442. (E)

Dyeability of chitosan-treated tussah silk by Benzopurpurine 4B.

Capacité de teinture à la benzopurpurine 4B de la soie tussah traitée au chitosan.

KAKO T., KATAYAMA A.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 429-431. (J)

Degumming, dyeing and structural properties of wild silkmoth cocoons spinning yarns from *Anaphe*, *Cricula trifenestrata* and *Attacus atlas* Linnaeus.

Décreusage, teinture et propriétés structurales des fils des cocons de papillons sauvages filés par *Anaphe*, *Cricula trifenestrata* et *Attacus atlas* Linnaeus.

KATO H., HATA T., YASUTA K., KANDA C.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 405-415. (J,e)

Degumming of cocoon shell of Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*, using hot pressurized water.

Décreusage de la coque des cocons du ver à soie du chêne japonais, *Antheraea yamamai*, en utilisant de l'eau chaude sous pression.

KAWAHARA Y., TAMURA H.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 433-435. (J)

Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual.

Variabilité des propriétés mécaniques des soies d'araignée à trois niveaux : interspécifique, intraspécifique et intraindividuel.

MADSEN B., SHAO Z.Z., VOLLRATH F.

Department of Zoology, Aarhus C, Denmark.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 301-306. (E)

Structure and twist level of silks string for use in racket sports.

Structure et niveau de torsion des cordes de soie utilisées pour les raquettes de sport.

MATSUMOTO Y., SAITO H., MOROOKA H., HARAKAWA K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386-8567, Japan.

1999 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 68(5), 365-371. (Ej)

Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy.

Investigation de la morphologie nanofibrillaire dans les fibres de soies par microscopie diffuse aux rayons X et par microscopie atomique.

MILLER L.D., PUTTHANARAT S., EBY R.K., ADAMS W.W.

Department of Polymer Science, The University of Akron, OH 44325-3909, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 159-165. (E)

Tasar silk wall coverings and hangings.

Couvertures murales et tentures de soie tasar.

MOON M.A.

Central Sericultural Tasar Research Institute, Bhagalpur, India.

1999 *Indian Silk*, Vol. 38(8), 21-23. (E)

Transmission of vibrations in funnel and sheet spider webs.

Transmission de vibrations dans des toiles d'araignée.

NAFTILAN S.A.

Joint Science Department, Keck Science Center, The Claremont Colleges, CA 91784, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 289-293. (E)

Is the mechanical strength of spider's drag-lines reasonable as lifeline?

La force mécanique des soies d'araignée peut-elle être utilisée comme ligne de sauvetage ?

OSAKI S.

Department of Life Science, Shimane University, Matsue, Japan.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 283-287. (E)

Aspects of X-ray diffraction on single spider fibers.

Aspects de diffraction des rayons X sur les fibres simples d'araignée.

RICKEL C. *et al.*

European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 179-186. (E)

In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin.

Evaluation *in vitro* du potentiel inflammatoire de la fibroïne de soie.

SANTIN M., MOTTA A., FREDDI G., CANNAS M.

Human Anatomy, University of East Piedmont "A. Avogadro", via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy.

1999 *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 46(3), 382-389. (E)

The effect of solvents on spider silk studied by mechanical testing and single-fibre Raman spectroscopy.

L'effet de solvants sur la soie d'araignée étudié par tests mécaniques et spectroscopie Raman.

SHAO Z., YOUNG R.J., VOLLRATH F.

Department of Zoology, Aarhus University, Aarhus C, Denmark.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 295-300. (E)

Ca-adsorption and apatite deposition on silk fabrics modified with phosphate polymer chains.

Absorption de calcium et dépôt d'apatite sur les tissus de soie modifiés avec des chaînes de polymère de phosphate.

TAMADA Y., FURUZONO T., TAGUCHI T., KISHIDA A., AKASHI M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

1999 *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, Vol. 10(7), 787-793. (E)

Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*.

Structure et fonction de la voie de production de la soie chez l'araignée *Nephila edulis*.

VOLLRATH F., KNOIGHT D.P.

Department of Zoology, Aarhus University, Aarhus C, Denmark.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 243-249. (E)

Designing recombinant spider silk proteins to control assembly.

Modelage de protéines de soie d'araignée recombinantes pour contrôler l'assemblage.

WINKLER S. *et al.*

Tufts University, Biotechnology Center, Department of Chemical Engineering, Medford, MA 02155, USA.

1999 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 24(2-3), 265-270. (E)

Improved biosensor for glucose based on glucose oxidase-immobilized silk fibroin membrane.

Biodétecteur de glucose amélioré, basé sur l'immobilisation de la glucose-oxydase sur une membrane de fibroïne.

ZHANG Y.Q., ZHU J., GU R.A.

Biotechnology College, Suzhou University, P.R. China.

1999 *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 75(2-3), 215-233. (E)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4^{ème} édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

