

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

Publiée par la Commission Séricole 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)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
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

Statistiques 1999 / 1999 Statistics i

Article scientifique / Scientific paper

**Influence of a plant based juvenile hormone mimic, ω -formyl longifolene oxime . . .
citronellyl ether on silkworm, *Bombyx mori* L. 551**
Influence d'une mimétique d'hormone juvénile de plante, le ω -formyl, longifolène oxime
citronellyl éther, sur le ver à soie, *Bombyx mori* L. 559
K. SASHINDRAN NAIR, V. A. VIJAYAN, J. S. NAIR, K. TRIVEDI & P. K. CHINYA

Rapports techniques / Technical reports

Practical techniques of acid treatment to diapause eggs after refrigeration 563
Pratiques de traitement à l'acide des œufs diapausants après réfrigération 571
Y. Y CHEN

**Positive staining method for detection of pebrine spore *Nosema bombycis* in silkworm
Bombyx mori L. 575**
Méthode de coloration positive pour la détection des spores de *Nosema bombycis* chez
le ver à soie *Bombyx mori* L. 581
N. R. PRASAD, S. T. GOVINDHARAJU & K. S. KESHAWA REDDY

**Efficacy of bed disinfectants and botanicals against grasserie disease of silkworm,
Bombyx mori L. 585**
Efficacité de désinfectants de litière et de produits botaniques contre la maladie de la
grasserie du ver à soie *Bombyx mori* L. 591
S. MANIMEGALAI, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN

**Genetic variability and selection indices for economic quantitative traits of
multivoltine mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes 595**
Variabilité génétique et indices de sélection pour les caractères quantitatifs économiques
de génotypes polyvoltins du ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.) 607
P. KUMARESAN, R. K. SINHA, N. K. SAHNI & S. SEKAR

**Effect of NaCl salinity on internal distribution of Na⁺, K⁺, Cl⁻ et Ca²⁺ in mulberry
genotypes 611**
Effet de la salinité en NaCl sur la distribution interne de Na⁺, K⁺, Cl⁻ et de Ca²⁺
chez des génotypes de mûrier 619
S. SHAIK MOHAMED ANAS & M. VIVEKANANDAN

Seasonal bioassay response of silkworm (<i>Bombyx mori</i> L.) to the mulberry (<i>Morus</i> spp.) leaf preservation methods	623
Evaluation biologique par le ver à soie (<i>Bombyx mori</i> L.) des méthodes de conservation de la feuille de mûrier (<i>Morus</i> spp.) en fonction des saisons	633
E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN	

Development of a talc based biofungicide using <i>Trichoderma harzianum</i> and its effect on mulberry root rot disease	637
Mise au point d'un biofongicide à base de talc utilisant <i>Trichoderma harzianum</i> et son effet sur la maladie du pourrissement de la racine de mûrier	643
T. PHILIP, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH	

A simple protocol for rapid and efficient isolation of protoplast from callus cultures of mulberry (<i>Morus indica</i> L.) cv. S13	647
Un protocole simple pour l'isolement de protoplastes rapide et efficace à partir de cals de mûrier (<i>Morus indica</i> L.) du cv. S13	653
U. PAVAN, A. V. RAO, V. YASHODHARA, N. RAMA SWAMY & A. SADANANDAM	

Allocation of energy for cocoon and pupal life of matured larva of <i>Antheraea mylitta</i> (Drury) (Saturniidae), the Indian tasar silk insect	657
Distribution de l'énergie pour la vie du cocon et de la nymphe chez des larves matures d' <i>Antheraea mylitta</i> (Drury) (Saturniides), l'insecte de la soie tasar indien	661
J. PATTANAYAK & A. K. DASH	

Notes brèves / Brief notes

On the nomenclature of eri silkworm	665
Nomenclature du ver à soie eri	669
D. N. R. REDDY	

Studies on consumption and utilisation of <i>Shorea robusta</i> leaves in <i>Larva</i> larvae . . .	671
Etudes sur la consommation et l'utilisation de feuilles de <i>Shorea robusta</i> par les larves <i>Larva</i>	677
U. S. P. SINHA, S. K. MATHUR & A. K. SINHA	

Bibliographie / Bibliography	679
---	------------

Sériciculture générale / General sericulture	681
Mûrier / Mulberry	683
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology .	685
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	689
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	692
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	694
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	697
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms: silk glands	698
Soie / Silk	699

Statistiques 1999 - 1999 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 1999

Table I. 1999 cocoon and raw silk production

Pays	Cocons frais	Soie grège
Country	Fresh cocoons (tonnes)	Raw silk (tonnes)
Brésil / Brazil ⁽¹⁾	10 305	1 554
Bulgarie / Bulgaria	70	12
Cambodge / Cambodia	200	20
Chine / China	484 702 ⁽²⁾	56 958 ⁽³⁾
Colombie / Colombia	62	7
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	7.7	-
Egypte / Egypt	18.7	3.0
Inde / India ⁽⁴⁾	128 094 ⁽⁵⁾	15 544 ⁽⁶⁾
Indonésie / Indonesia	639	90
Iran	4 600	710
Italie / Italy	38.5	-
Japon / Japan	1 496	650
Madagascar	100 ⁽⁷⁾	5
Philippines	8	1.1
Roumanie / Romania	5	0.07
Syrie / Syria	38	-
Thaïlande / Thailand	2 287 ⁽⁸⁾	1 272 ⁽⁹⁾
Turquie / Turkey	133	22
Ukraine	6	0

- Non disponible / Not available.

(1) 98/99.

(2) dont 37 441 tonnes non mûrier / including 37 441 tons non mulberry.

(3) dont 968,51 tonnes non mûrier / including 968,51 tons non mulberry.

(4) 98/99.

(5) dont 1 529 tonnes de cocons eri / including 1 529 tons eri cocoons.

(6) dont 1 284 tonnes non mûrier / including 1 284 tons non mulberry.

(7) dont 40 tonnes non mûrier / including 40 tons non mulberry.

(8) les cocons frais sont seulement des bivoltins / fresh cocoons include only bivoltine.

(9) la soie grège comprend les bivoltins et les polyvoltins / raw silk includes bivoltine and polyvoltine.

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 1999

Table II. 1999 cocoon and raw silk imports and exports

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Brésil / Brazil	60	1742	-	0.863
Bulgarie / Bulgaria	0	4	0	0
Cambodge / Cambodia	0	0	0	140
Chine / China	466	8504 ⁽¹⁾	572	109 ⁽²⁾
Colombie / Colombia	-	9.3	0	0
Egypte / Egypt	0	0	160	97
France	0	0	-	228
Inde / India	112	59	-	2824 ⁽³⁾
Italie / Italy	-	23	-	2727
Japon / Japan	15	-	672	2504 ⁽⁴⁾
Madagascar	0	0	0	0
Philippines	-	-	0	5.7
Roumanie / Rumania	0	0	0	0
Syrie / Syria	0	0	0	0
Thaïlande / Thailand	0.15	396	31	234
Turquie / Turkey	50.4	0	-	-
Ukraine	0	0	0	0

- Non disponible / Not available.

(1) dont 513 tonnes non mûrier / including 513 tons non mulberry.

(2) dont 12 tonnes non mûrier / including 12 tons non mulberry.

(3) dont 847 tonnes non mûrier / including 847 tons non mulberry.

(4) dont 62 tonnes non mûrier / including 62 tons non mulberry.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 1999

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 1999

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
Country	Price paid to producers (fresh cocoons)	Export price (dry cocoons)	Import price (dry cocoons)
Brésil / Brazil	1.75	8.50	-
Bulgarie / Bulgaria	2.10	xx	xx
Cambodge / Cambodia	-	xx	xx
Chine / China	-	7.98	2.92
Colombie / Colombia	2.03	-	xx
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	1.5	-	-
Egypte / Egypt	3.5	xx	1.20
Inde / India	2.77	-	-
Iran	3.5	-	-
Indonésie / Indonesia	2.15	-	-
Italie / Italy	7	-	-
Japon / Japan	14.94	8.47	8.68
Madagascar	4.5	xx	xx
Philippines	2.66	-	xx
Roumanie / Rumania	1.5	xx	xx
Syrie / Syria	4	xx	xx
Thaïlande / Thailand	2.3	6.2	3.77
Turquie / Turkey	4.60	5	-
Ukraine	4	7	xx

- Non disponible / Not available.

xx : Pas d'exportation/d'importation de cocons / No cocoon export/import.

INFLUENCE OF A PLANT BASED JUVENILE HORMONE MIMIC, ω -FORMYL LONGIFOLENE OXIME CITRONELLYL ETHER ON SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

K. SASHINDRAN NAIR, V. A. VIJAYAN*, J. S. NAIR, K. TRIVEDY & P. K. CHINYA

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore – 570 008, Karnataka, India.

A juvenile hormone mimicking compound NL-24 (ω -formyl longifolene oxime citronellyl ether), an oxime ether of carbonyl compounds derived from longifolene of Indian turpentine oil extracted from the plant, *Pinus longifolia* Roxb., was administered to silkworm, *Bombyx mori* L. for improving the silk yield. Based on the result of an earlier preliminary screening, three concentrations of the compound, i.e. 2.5, 5 and 10 ppm were prepared in the form of an emulsion and administered topically as a single dose, to separate batches of 5th instar silkworm at 24, 48, 72 and 96 h to determine the required concentration and critical time of application for an economically favourable response. Two popular commercial silkworm hybrids, KA $\times$ NB₄D₂ (bivoltine $\times$ bivoltine) and PM $\times$ NB₄D₂ (multivoltine $\times$ bivoltine) were subjected to the experiment. The medium and absolute control were maintained in parallel to compare the results. The results showed that 5 ppm was the best concentration of the compound and 48 h of 5th instar was the most favourable age for the maximum improvement in the commercial traits. The possible role of exogenous JH compounds in eliciting favourable response in silkworm is discussed.

Keywords: JH compound, silkworm, *Bombyx mori*, economic traits.

INTRODUCTION

Juvenile hormone (JH) is one of the major circulating hormones in insects. Retention of larval features is the main function of this hormone apart from controlling other developmental and reproductive activities (Nair *et al.*, 1998). Chemical compounds that are analogous to the structure or function of JH have been identified and synthesised primarily to administer to insect pests and control them (Retnakaran *et al.*, 1985). These compounds were aptly christened as third generation pesticides. It was remarkable that these compounds, when administered to silkworm, *Bombyx mori* larvae in minute quantities elicited a hormetic response and elevated the productivity, but with a prolonged larval feeding period (Akai *et al.*, 1971). Further, it was consolidated that the silk output can be improved on JH administration to 5th instar silkworm larvae (Chang *et al.*, 1972; Nihmura *et al.*, 1972; Muroga *et al.*, 1975). However, response to such treatment varies depending on the dosage, time and number of applications (Aomori *et al.*, 1977). Among umpteen number of synthetic JH formulations surfaced at different parts of the globe particularly for pest control, many were quite effective in improving the economic traits of silkworm, *B. mori* L. (Shimada *et al.*, 1979; Akai *et al.*, 1985). Subsequently, some of these JH compounds were tried in India on an experimental basis and good results in respect of increased cocoon and cocoon shell weight were reported (Chowdhary *et al.*, 1986;

* Department of Studies in Zoology, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore – 570 006, Karnataka, India.

Trivedy *et al.*, 1993). It was also suggested that the increased productivity on JH administration need not necessarily be accompanied by a prolonged larval duration (Trivedy *et al.*, 1997). Efforts to use the indigenous JH mimicking compounds, be synthetic or of plant origin for improving the silk yield, have been extremely scant. So, in the present study, a plant based indigenous JH compound, NL-24, reported to be active on insects and effective for mosquito control has been tried for the first time for augmenting silk gland growth and enhanced cocoon production. The compound was selected out of 24 such compounds screened for the purpose, based on the bioassay results (Nair *et al.*, 1999).

MATERIALS AND METHODS

The plant based juvenoid, NL-24, an oxime ether (ω -formyl longifolene oxime citronellyl ether) of carbonyl compounds derived from longifolene, an abundantly available tricyclin sesquiterpene from Indian turpentine oil extracted from the plant, *Pinus longifolia* Roxb. was procured from National Chemical Laboratory, Pune, India. Bivoltine $\times$ bivoltine (KA $\times$ NB₄D₂) and multi $\times$ bivoltine (PM $\times$ NB₄D₂) silkworm hybrids were reared on fresh mulberry leaves in the laboratory at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH under 12:12 (L:D) photoperiod following standard procedure. On resumption to 5th instar, 225 worms of KA $\times$ NB₄D₂ and 250 worms of PM $\times$ NB₄D₂ were counted and kept in wooden rearing trays in three replicates for the administration of the JH compound. Three concentrations i.e., 2.5, 5 and 10 ppm of the compound were prepared in the form of an emulsion using a minimum quantity of acetone and tween-20, in water. The concentration range was decided through a broad-spectrum screening conducted earlier (Nair *et al.*, 1999). The emulsion was administered by spraying topically to silkworm in pre-cleaned trays @ 12.5 ml/100 worms as a single dose. After half an hour, the worms were fed with fresh mulberry leaves. Different batches were treated at 24, 48, 72 and 96 h of 5th instar. Medium control and absolute control were maintained side by side to compare the results. The larval weight was recorded at maximum growth (on the sixth day of 5th instar). On maturation of 10-20% of the worms, the larvae were mounted for spinning and on 6th day, the harvest was made. The total number of good cocoons, cocoon weight, cocoon shell weight (average of 10 males and 10 females per tray) and average filament length were recorded. Further, effective rate of rearing by number (ERR/no.) and weight (ERR/wt.), shell ratio (%) and denier of the filament were calculated as described earlier (Nair *et al.*, 1997). The experiment was repeated twice. The data of the two trials were analysed employing ANOVA to ascertain the statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the effect of application of NL-24 on the economic traits of the commercial silkworm hybrids KA $\times$ NB₄D₂ and PM $\times$ NB₄D₂ are presented in Tables I and II, respectively.

Larval weight and duration:

In KA $\times$ NB₄D₂, the larval weight was enhanced by a maximum of 7.06% when treated at 48 h with 5 ppm of the compound. This was followed by an increase of 6.19% when treated at 24 h with the same concentration. Although the medium controls showed a marginal difference in the larval weight when compared to the absolute control, these differences were not significant except that of 48 h (Table I). In PM $\times$ NB₄D₂, the improvement in larval weight on treatment of the JH compound in general was comparatively lean. But here again, the maximum increase (7.39%) was with 5 ppm concentration followed by 10 ppm when treated at 48 h. In this case, the medium control responded negatively, which was obvious from the results of treatments except that at 24 h. (Table II) An increase in larval weight on administration of JH compounds was reported earlier (Nihmura *et al.*, 1972; Akai *et al.*, 1985; Trivedy *et al.*, 1993, 1997). In almost all these cases, the increase in larval weight was accompanied by a prolongation in larval period. But in the present study, the increase in larval weight was not associated with a corresponding increase in the larval feeding period. Muroga *et al.*, (1975)

too have reported such an increase in larval weight without a difference in the developmental simultaneity when compared with the control. Recent studies by Trivedy *et al.*, (1997) have also proved that the increase in economic traits of silkworm on JH application need not necessarily be accompanied by an increase in larval feeding period.

Cocoon weight, shell weight and shell ratio:

It is clear from Tables I and II that the JH compound used in the present study is capable of eliciting positive response with regard to silk production. Though many of the treatments appeared to have exerted substantial influence on silkworm, the maximum improvement (12.14%) was observed with 5 ppm at 48 h in the case of the bivoltine hybrid. This was followed by an enhancement of 8.10% when treated at 24 h with 10 ppm. In the multi $\times$ bivoltine hybrid, the improvement was maximum (7.39%) with 5 ppm at 48 h followed by 10 ppm at 24 h (4.16%). It is obvious from the result that the trend in response to JH was similar in both the hybrids but the intensity differed depending on the hybrid, the bivoltine being more receptive to JH treatment.

Similar to that of cocoon weight, cocoon shell weight was improved substantially by the administration of the JH compound. The improvement pattern was also similar. The maximum improvement in KA $\times$ NB₄D₂ was obtained in the case of 5 ppm JH at 48 h (15.79%) followed by 5 ppm at 24 h (7.97%). But the differences among the treatments of 5 ppm and 10 ppm at 24 h, 10 ppm at 48 h and 5 ppm at 72 h were extremely marginal giving a clue that 5-10 ppm is the most suitable concentration of NL-24 required for a favourable response in this hybrid. In PM $\times$ NB₄D₂, an increase of 12.78% with 5 ppm NL-24 at 48 h and 10.44% with 10 ppm at 24 h could be recorded. Generally, the silkworm was far more receptive at 24 and 48 h in respect of enhancement in the cocoon characters compared to that of 72 and 96h. Though significant changes were not noticed in shell ratio in the case of KA $\times$ NB₄D₂, the same was substantially improved in PM $\times$ NB₄D₂ in all the treatments at 24 and 48h. This can be attributed to the comparatively lower pupal weight because the increase in cocoon weight was not exactly in tune with that in shell weight.

Many workers reported an improvement in cocoon and cocoon shell weight on the administration of JH compounds, earlier. On administration of a JH analogue, Murakoshi *et al.*, (1972) have reported an enhanced yield of 20-35%. Chang *et al.*, (1972) reported to have obtained an increase of 20-50% in cocoon and pupal weight when final instar silkworm larvae were treated up to 6th day. But the enhancement always involved an enhanced feeding period too. Muroga *et al.*, (1975) were able to get only an enhancement of 9-14% but without a change in the larval period. In 1985, Akai *et al.*, achieved a 26% increase in cocoon shell weight in repeated treatments of silkworm with JH compounds. These reports make it clear that the response of silkworm in terms of improvement in economic traits varies largely depending on the compounds used, silkworm races etc.

Effective rate of rearing by number and weight:

In KA $\times$ NB₄D₂, a notable change in ERR by number was noticed in the treatments with 5 and 10 ppm at 24 and 48 h. Such an increase was also observed with 10 ppm at 72 h. But in PM $\times$ NB₄D₂, the effective rate of rearing which may otherwise be understood as survival in a general entomological arena, was not largely affected although a marginal change was noticed with 10 ppm at 48 h. Earlier workers did not notice any remarkable change in ERR (Trivedy *et al.*, 1993).

ERR by weight, a commercially more important trait, had a substantially positive change in the treated silkworm. In KA $\times$ NB₄D₂, the improvement was to the tune of 8.73% when treated at 48 h with 5 ppm. This was followed by an improvement of 5.56% with 5 ppm application at 24 h. 10 ppm at 24 and 48 h and 5 ppm at 72 h also had significant positive changes. In PM $\times$ NB₄D₂, the maximum increase was about 8% at 48 h with 5 ppm. This increase must be attributed mainly to the increased cocoon weight on JH application along with the increase in the ERR by number.

Table 1. Effect of the JH mimic, NL-24 on the economic traits of silkworm, *Bombyx mori* L. (Hybrid: KA × NB₄D₂).Tableau 1. Effet du mimétique de JH, le NL-24 sur les traits économiques du ver à soie, *Bombyx mori* L. (Hybride KA × NB₄D₂).

Treatment Hour (V instar)	Concentration (ppm)	Larval weight (g) (10 nos.)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	ERR/ number #	ERR/ weight # (kg)	Filament length (m)	Dénier	V instar larval duration (h)
Heure de Traitement (5 ^{ème} âge)		Poids larvaire (g) (10 larves)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	ERR/ nombre #	ERR/ poids # (kg)	Longueur du filament (m)	Titre	Durée du 5 ^{ème} âge (h)
24	2.5	46.27*	1.965**	0.392**	19.92	8244**	16.31*	904.68**	2.48	168
	5	47.22**	1.989**	0.400**	20.10	8300**	16.66**	907.96**	2.50	168
	10	45.96*	2.009**	0.397**	19.75	8322**	16.62**	888.92**	2.48	168
	Medium Control	45.07	1.884	0.376	19.97	7822	15.80	846.42	2.54*	168
	Témoin moyen									
48	2.5	46.48**	1.947**	0.387**	19.87	8152	16.43**	930.09**	2.48	168
	5	47.61**	2.084**	0.429**	20.57	8300**	17.16**	962.55**	2.48	168
	10	46.17*	2.008**	0.396**	19.74	8363**	16.47**	932.75**	2.48	168
	Medium Control	46.37**	1.888	0.377	19.95	8078	16.11	846.05	2.50	168
	Témoin moyen									
72	2.5	44.50	1.978**	0.385**	19.45	8156	16.02	922.50**	2.47	168
	5	45.94*	1.988**	0.395**	19.85	8370**	16.62**	895.82**	2.50	168
	10	46.32**	1.932**	0.385**	19.92	8000	15.91	892.04**	2.50	168
	Medium Control	45.44	1.914*	0.374	19.56	8167	16.33**	847.42	2.54*	168
	Témoin moyen									
96	2.5	45.28	1.951**	0.382**	19.57	8111	16.33**	891.05**	2.46	168
	5	45.78	1.919**	0.379	19.76	8096	16.11	883.86**	2.45	168
	10	45.98*	1.905*	0.379	19.88	8181	16.07	878.02**	2.45	168
	Medium control	44.93	1.879	0.379	20.18	8033	15.60	820.45	2.40	168
	Témoin moyen									
Absolute control		44.47	1.859	0.370	19.92	7989	15.78	827.56	2.44	168
Témoin absolu										
SE ±		0.488	0.015	0.002	0.189	73	0.145	13.25	0.021	
CD at 5%		1.379	0.042	0.007	0.536	205	0.408	37.43	0.058	NS
CD at 1%		1.832	0.056	0.009	0.712	273	0.543	49.75	0.077	

Based on 10000 worms / # basé sur 10000 vers. * Significant at $P < 0.05$ / * Significatif au seuil de $P < 0.05$.
 **Significant at $P < 0.01$ / ** Significatif au seuil de $P < 0.01$. NS: Non significant / Non significatif.

Table II. Effect of the JH mimic, NL-24 on the economic traits of silkworm, *Bombyx mori* L. (Hybrid: PM × NB₄D₂).Tableau II. Effet du mimétique de JH, le NL-24 sur les traits économiques du ver à soie, *Bombyx mori* L. (Hybride PM × NB₄D₂).

Treatment Hour (V instar)	Concentration (ppm)	Larval weight (g) (10 nos.)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	ERR/ number #	ERR/ weight# (kg)	Filament length (m)	Denier	V instar larval duration (h)
Heure de Traitement (5 ^{ème} âge)		Poids larvaire (g) (10 larves)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	ERR/ nombre #	ERR/ poids # (kg)	Longueur du filament (m)	Titre	Durée du 5 ^{ème} âge (h)
24	2.5	40.90*	1.982**	0.363**	18.30**	8610	14.58*	844.59**	2.46	156
	5	40.93*	2.004**	0.367**	18.35**	8500	14.71**	853.81**	2.48	156
	10	40.89	2.017**	0.369**	18.30**	8660	14.80**	812.28	2.47	156
	Medium control	40.52	1.942*	0.346**	17.90	8680	14.22	795.76	2.50	156
	Témoin moyen									
48	2.5	41.58**	1.993**	0.364**	18.27**	8680	14.81**	857.10**	2.48	156
	5	43.00**	2.039**	0.377**	18.51**	8660	15.32**	911.55**	2.47	156
	10	41.71**	1.977**	0.360**	18.25**	8790**	14.78**	868.28**	2.45	156
	Medium control	39.56	1.859	0.331	17.80	8560	14.50	796.08	2.47	156
	Témoin moyen									
72	2.5	40.93*	1.961**	0.355**	18.17*	8580	14.70**	835.00*	2.45	156
	5	40.79	1.939*	0.355**	18.32**	8690*	15.10*	841.80**	2.49	156
	10	40.80	1.945*	0.349**	18.00	8670	14.48	817.35	2.47	156
	Medium control	39.07*	1.906	0.334	17.51	8610	14.70**	797.46	2.52	156
	Témoin moyen									
96	2.5	40.85	1.919	0.352**	18.35**	8620	14.80**	823.16	2.46	156
	5	40.56	1.948*	0.349**	17.94	8620	14.56	794.26	2.46	156
	10	40.21	1.961**	0.351**	17.92	8490	14.58*	808.51	2.44	156
	Medium control	38.10**	1.895	0.325*	17.14	8480	14.04	770.45	2.42	156
	Témoin moyen									
Absolute control		40.04	1.898	0.334	17.61	8580	14.20	777.56	2.45	156
Témoin absolu										
SE ±		0.284	0.014	0.03	0.165	37	0.127	16.18	0.021	NS
CD at 5%		0.805	0.039	0.008	0.465	107	0.359	45.71	0.058	
CD at 1%		1.069	0.051	0.010	0.618	142	0.478	60.74	0.077	

Based on 10000 worms / # base sur 10000 vers. * Significant at $P < 0.05$ / * Significatif au seuil de $P < 0.05$.**Significant at $P < 0.01$ / ** Significatif au seuil de $P < 0.01$. NS: Non significant / Non significatif.

Filament length and denier:

The increased cocoon shell weight is aptly reflected in the filament length in the present study. An enhancement of 16.31 and 17.23% was observed in KA $\times$ NB₄D₂ and PM $\times$ NB₄D₂ hybrids, respectively in the batches treated with 5 ppm NL-24 at 48 h (Tables I & II). Increase in filament length almost corresponding to that in cocoon shell weight is visible in the other treatments also. At the same time, there was no substantial change in the denier. This is to be appreciated because, if the thicker cocoon shell is unwound to shorter filament of thicker denier, the industry may not accept it as widely known.

The results of the present investigation clearly point out that the natural or synthetic JH mimics tested bioactive in other insects can be judiciously employed in sericulture for the benefit of the industry. The compound used in the present study, ω -formyl longifolene oxime citronellyl ether has been proved to be effective in controlling the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis (Sawaikar *et al.*, 1995).

The present results clearly show that although JH mimicking compounds influence the silk production positively, it is largely dependent on the dose and time of application as stated earlier (Akai *et al.*, 1988, Trivedy *et al.*, 1993). When cocoon/cocoon shell weight was improved, a corresponding improvement in larval weight was also noticed. It is obvious that the changes in larval weight were not as prominent as that in cocoon shell weight. This probably gives an indication that an elevated larval weight is not a prerequisite for improved cocoon shell weight. It sounds more sensible to read Daillic (1979) that silk gland is a target organ of JH and it grows independent of other organs after a temporary inhibition, on JH administration.

The point to be stressed here is that the enhancement in the major commercial traits was not accompanied by a prolonged feeding period. This might be due to a direct stimulatory effect of the compound on protein synthesis in silk gland as suggested by Kajiura and Yamashita (1989). Another possibility is the increased efficiency of treated batches in converting the ingested food, so that more silk is synthesised from unit quantity of food. These changes at the physiological or molecular level might be the result of an alteration in the ratio of the circulating hormones.

It may be surmised that the JH mimic, ω -formyl longifolene oxime citronellyl ether can be used in sericulture as it can improve the commercial traits of silkworm, though it is originally considered as a third generation pesticide. On elaborate bioassay, it has become clear that the compound at 5 ppm concentration when treated at 48 h of 5th instar elicits the most favourable response in silkworm in improving the economic parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly grateful to Dr D. D. Sawaikar, NCL, Pune for providing the JH compound. They are also grateful to Dr R. K. Datta, Director, CSRTI, Mysore for extending all the facilities to undertake the study.

REFERENCES

- AKAI H., KIGUCHI K. & MORI K. (1971) Increased accumulation of silk protein according to JH induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* L. Appl. Entomol. Zool., 6, 218-220.
 AKAI H., KIMURA K., KIUCHI M. & SHIBUKAWA A. (1985) Increase of silk production by repeated treatments with a juvenile hormone analogue. J. Seric. Sci. Jpn., 54(4), 297-299.
 AOMORI S., OZAWA Y. & NIHMURA M. (1977) Timely administration of synthetic compounds with the juvenile hormone activity to silkworm larvae reared on an artificial diet. J. Seric. Sci. Jpn., 46(1), 69-76.

- CHANG C. F., MURAKOSHI S. & TAMURA S. (1972) Giant cocoon formation in the silkworm *Bombyx mori* L. topically treated with methylenedioxyphenyl derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 36(4), 692-694.
- CHOWDHARY S. K., SEHNAL F., RAJ S. K., RAJU P. S. & MATHUR S. (1986) Giant cocoon formation in *Bombyx mori* L., topically treated with juvenile hormone SJ-42-F. *Sericologia*, 26(4), 455-459.
- DAILLIE J. (1979) Juvenile hormone modifies larvae and silk gland development in *Bombyx mori*. *Biochimie*, 61, 275-281.
- KAJIURA Z. & YAMASHITA O. (1989) Super growth of silk glands in the dauer larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by a juvenile hormone analogue. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 58(1), 39-46.
- MAGADUM V. B. & MAGADUM S. B. (1991) Influence of Manta on some economical characters of Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval. *Korean J. Seric. Sci.*, 33(2), 93-96.
- MURAKOSHI S., CHANG C. F. & TAMURA S. (1972) Increase in silk production by the silkworm *Bombyx mori* L. due to oral administration of a juvenile hormone analog. *Agric. Biol. Chem.*, 36(4), 695-696.
- MUROGA A., NAKAJIMA M., AOMORI S., OZAWA Y. & NIHMURA M. (1975) Utilisation of the synthetic juvenile hormone analog to the silkworm rearing on mulberry leaves. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 44(4), 267-273.
- NAIR K. S., TRIVEDY K., MAGADUM S. B. & DATTA R. K. (1997) Improvement of economic characters of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. by a phytohormone, Absciscic acid. *J. Entomol. Res.*, 21(4), 343-349.
- NAIR K. S., TRIVEDY K. & CHINYA P. K. (1998) Juvenile hormone mimics and silk productivity. *Indian Silk*, 37(8), 23-25.
- NAIR K. S., VIJAYAN V. A., NAIR J. S. & TRIVEDY K. (1999) Juvenilomimic compounds for enhanced productivity in silkworm *Bombyx mori* L. — A screening. *Indian J. Seric.*, 38(2), 119-124.
- NIHMURA M., AOMORI S., MORI K. & MATSUI M. (1972) Utilisation of synthetic compounds with juvenile hormone activity for the silkworm rearing. *Agric. Biol. Chem.*, 36(5), 889-892.
- RETNAKARAN A., GRANETT J. & ENNIST T. (1985) Insect growth regulators. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 12 Insect Control. Eds. Kertkut, G. A. and Gilbert, L. I., Pergamon Press, Oxford. p. 527-601.
- SAWAIKAR D. D., SINHA B., HEBBALKAR G. D., SHARMA R. N. & PATWARDHAN S. A. (1995) Products active on mosquitoes: Part VII—Synthesis and biological activity of longifolene derivatives. *Indian J. Chem.* 34B, 832-835.
- SHIMADA S., KAMADA A. & ASANO S. (1979) Studies on the utilisation of methoprene, a synthetic compound with juvenile hormone activity, for silkworm rearing. II. An aspect of silk formation in the silkworm, *Bombyx mori*, applied with methoprene examined by the vital staining with thionine. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 48(4), 282-286.
- TRIVEDY K., REMADEVI O. K., MAGADUM S. B. & DATTA R. K. (1993) Effect of juvenile hormone analogue, labomin on the growth and economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 32(2), 162-168.
- TRIVEDY K., NAIR K. S., AHSAN M. M. & DATTA R. K. (1997) A juvenile hormone mimic modulated enhancement in silk productivity in silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 36(1), 35-38.

INFLUENCE D'UNE MIMETIQUE D'HORMONE JUVENILE DE PLANTE, LE ω -FORMYL, LONGIFOLENE OXIME CITRONELLYL ETHER, SUR LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

K. SASHINDRAN NAIR, V. A. VIJAYAN*, J. S. NAIR, K. TRIVEDI & P. K. CHINYA

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore – 570 008, Karnataka, Inde.

Un mimétique d'hormone juvénile le NL-24 (ω -formyl longifolène oxime citronellyl éther), un éther oxime de composés carbonylé dérivés du longifolène d'huile de térébenthine indien, extrait de la plante *Pinus longifolia* Roxb. a été administré au ver à soie *Bombyx mori* L. pour améliorer le rendement en soie. D'après le résultat d'un criblage préliminaire précédent, nous avons préparé trois concentrations du composé, c'est à dire 2,5 ; 5 et 10 ppm sous la forme d'une émulsion et nous les avons administrées de manière topique en une dose, à des lots différents de vers à soie du 5^{ème} âge, dans les 24 h, 48 h, 72 h et 96 h afin de déterminer la concentration nécessaire et le moment critique de l'application pour une réponse économiquement favorable. Deux hybrides commerciaux populaires du ver à soie, KA $\times$ NB₄D₂ (bivoltin $\times$ bivoltin) et PM $\times$ NB₄D₂ (polyvoltin $\times$ bivoltin) sont soumis à l'expérience. Les témoins avec adjuvant et absolu sont maintenus en parallèle pour comparer les résultats. Les résultats montrent que 5 ppm est la meilleure concentration pour le composé et 48 h du 5^{ème} âge est l'âge le plus favorable pour une amélioration maximum des traits commerciaux. Nous discutons du rôle possible des composés JH exogènes dans la provocation d'une réponse favorable chez le ver à soie.

INTRODUCTION

L'hormone juvénile (JH) est l'une des principales hormones qui circulent chez les insectes. Le maintien du caractère larvaire est la fonction principale de cette hormone et elle contrôle également d'autres activités au cours du développement et de la reproduction (Nair et coll., 1998). On a identifié et mis au point des composés chimiques qui sont analogues à la structure ou à la fonction de la JH dans un premier temps pour lutter contre les insectes nuisibles (Retnakaran et coll., 1985). Ces composés ont été pertinemment baptisés pesticides de la troisième génération. Lorsqu'ils sont administrés au ver à soie *Bombyx mori* en petites quantités, ils suscitent une réponse hormétique et augmentent la productivité, mais sans qu'il y ait un prolongement de la période de nourrissage larvaire (Akai et coll., 1971). De plus, on a déduit que la production de soie peut être améliorée avec l'administration de JH aux larves du ver à soie du 5^{ème} âge (Chang et coll., 1972 ; Nihmura et coll., 1972 ; Muroga et coll., 1975). Cependant, la réponse à un tel traitement varie en fonction de la dose, de la période et du nombre d'applications (Aomori et coll., 1977). Parmi les nombreuses formulations de JH synthétiques qui sont apparues à la surface du globe surtout pour lutter contre les insectes, il y en a beaucoup qui améliorent les caractères économiques du ver à soie, *B. mori* L. (Shimada et coll., 1979 ; Akai et coll., 1985). Par la suite, certains de ces composés de JH ont été essayés en Inde

* Department of Studies in Zoology, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore – 570 006, Karnataka, India.

expérimentalement et on a rapporté de bons résultats pour l'augmentation du poids du cocon et de la coque (Chowdhary et coll., 1986 ; Trivedy et coll., 1993). On a aussi suggéré que l'augmentation de la productivité par l'administration de JH n'est pas nécessairement accompagnée par une prolongation de la durée larvaire (Trivedy et coll., 1997). Très peu d'efforts ont été faits pour utiliser les composés indigènes imitant les JH qu'ils soient synthétiques ou dérivés des plantes pour améliorer le rendement en soie. Nous avons donc essayé pour la première fois dans cette étude, un composé JH indigène à base de plante, le NL-24, signalé pour son activité sur les insectes et son efficacité pour lutter contre les moustiques dans le but d'augmenter la croissance de la glande séricigène et d'améliorer la production de cocons. Le composé a été sélectionné parmi 24 composés criblés dans ce but, d'après les résultats de l'évaluation biologique (Nair et coll., 1999).

MATERIELS ET METHODES

Nous avons obtenu le juvénioïde à base de plante, le NL-24, un éther oxime (ω -formyl longifolène oxime citronellyl éther) de composés carbonyle dérivé du longifolène, un sesquiterpène tricyclique abondamment disponible dans l'huile de térébenthine indien, extrait de la plante *Pinus longifolia* Roxb. auprès du Laboratoire Chimique National, de Pune, en Inde. Des hybrides bivoltin $\times$ bivoltin (KA $\times$ NB₄D₂) et poly $\times$ bivoltin (PM $\times$ NB₄D₂) de ver à soie ont été élevés avec des feuilles de mûrier fraîches en laboratoire à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et $75 \pm 5\%$ d'humidité relative sous une photopériode de 12 : 12 (L : O) en suivant la procédure habituelle. A la reprise du 5^{ème} âge, 225 vers de KA $\times$ NB₄D₂ et 250 vers de PM $\times$ NB₄D₂ sont comptés et conservés dans des plateaux d'élevage en bois en trois répétitions pour l'administration du composé de JH. Trois concentrations, c'est à dire 2,5 ; 5 et 10 ppm du composé sont préparées sous la forme d'une émulsion en utilisant une quantité minimum d'acétone et de tween-20 dans l'eau. Les concentrations ont été décidées grâce à un criblage à spectre large réalisé précédemment (Nair et coll., 1999). L'émulsion est administrée en la vaporisant de manière topique sur le ver à soie dans des plateaux préalablement nettoyés, à raison de 12,5 ml / 100 vers en une dose. Après une demi-heure, les vers sont nourris avec des feuilles de mûrier fraîches. Différents lots sont traités dans les 24, 48, 72 et 96 h du 5^{ème} âge. Les témoins avec adjuvant et absolu sont maintenus côte à côte pour comparer les résultats. Le poids larvaire est enregistré lors de la croissance maximum (le sixième jour du 5^{ème} âge). Lorsque 10 à 20 % des vers sont matures, les larves sont montées pour le filage et le 6^{ème} jour, on procède à la récolte. Le nombre total de cocons sains, le poids du cocon, le poids de la coque (moyenne de 10 mâles et de 10 femelles par plateau) et la longueur moyenne du filament sont enregistrés. De plus, le taux effectif d'élevage en nombre (ERR/nbre) et en poids (ERR/pds.), la richesse soyeuse (%) et le titre du filament sont calculés d'après les méthodes antérieures (Nair et coll., 1997). L'expérience est répétée deux fois. Les données des deux essais sont analysées en employant l'analyse de variance pour s'assurer de leur signification statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'effet de l'application de NL-24 sur les traits économiques des hybrides commerciaux du ver à soie KA $\times$ NB₄D₂ et PM $\times$ NB₄D₂ sont présentées dans les Tableaux I et II respectivement.

Poids et durée larvaires :

Chez KA $\times$ NB₄D₂, le poids larvaire s'améliore jusqu'à un maximum de 7,06 %, quand il est traité à 48 h avec 5 ppm du composé. On note une augmentation de 6,19 % quand on le traite à 24 h avec la même concentration. Bien que les témoins avec adjuvant montrent une différence marginale pour le poids larvaire quand on les compare au témoin absolu, ces différences ne sont pas significatives sauf à 48 h (Tableau I). Chez PM $\times$ NB₄D₂, l'amélioration du poids larvaire avec le traitement à base de composé JH est en général comparativement faible. Mais là encore, l'augmentation maximum

(7,39 %) se produit avec la concentration de 5 ppm, suivie par 10 ppm à 48 h. Dans ce cas, le témoin avec adjuvant répond négativement sauf à 24 h (Tableau II). Une augmentation du poids larvaire lors de l'administration de composés JH a été signalée précédemment (Nihmura et coll., 1972 ; Akai et coll., 1985 ; Trivedy et coll., 1993, 1997). Dans la plupart des cas, l'augmentation du poids larvaire est accompagnée par un prolongement de la période larvaire. Mais dans cette étude, l'augmentation du poids larvaire n'est pas associée à une augmentation correspondante de la période de nourrissage larvaire. Muroga et coll., (1975) ont aussi rapporté une telle augmentation du poids larvaire sans différence dans la simultanéité du développement. Les études récentes par Trivedy et coll., (1997) ont aussi prouvé que l'amélioration des traits économiques du ver à soie lorsqu'on applique de la JH n'est pas nécessairement accompagnée par une augmentation de la période de nourrissage larvaire.

Poids du cocon, poids de la coque et richesse soyeuse :

Il est clair d'après les tableaux I et II que le composé JH utilisé dans cette étude est capable de susciter une réponse positive par rapport à la production de soie. Bien que de nombreux traitements semblent avoir exercé une influence importante sur le ver à soie, on a observé l'amélioration maximum (12,14 %) avec 5 ppm à 48 h dans le cas de l'hybride bivoltin. Elle est suivie par une amélioration de 8,10 % quand on le traite à 24 h avec 10 ppm. Chez l'hybride poly × bivoltin, l'amélioration est maximum (7,39 %) avec 5 ppm à 48 h, suivi par 10 ppm à 24 h (4,16 %). La tendance de réponse à la JH est similaire chez les deux hybrides mais l'intensité diffère en fonction de l'hybride, l'hybride bivoltin étant plus réceptif au traitement avec de la JH.

Comme pour le poids du cocon, le poids de la coque s'améliore beaucoup grâce à l'administration du composé de JH. L'amélioration maximum chez KA × NB₄D₂ est obtenue avec 5 ppm de JH à 48 h (15,79 %) suivie par 5 ppm à 24 h (7,97 %). Mais les différences entre les traitements de 5 ppm et de 10 ppm à 24 h, de 10 ppm à 48 h et de 5 ppm à 72 h sont extrêmement marginales, ce qui indique que 5 à 10 ppm est la concentration la plus adaptée de NL-24 pour une réponse favorable de cet hybride. Chez PM × NB₄D₂, on enregistre une augmentation de 12,78 % avec 5 ppm de NL-24 à 48 h et de 10,44 % avec 10 ppm à 24 h. En général, le ver à soie est beaucoup plus réceptif à 24 et 48 h pour l'amélioration des caractères du cocon comparé à 72 et 96 h. Bien qu'on n'enregistre pas de changements significatifs pour la richesse soyeuse dans le cas de KA × NB₄D₂, on note des améliorations importantes chez PM × NB₄D₂ avec tous les traitements à 24 et 48 h. Cela peut être attribué au poids nymphal comparativement plus faible parce que l'augmentation du poids du cocon ne suit pas exactement celle de la coque.

De nombreux chercheurs ont rapporté précédemment une amélioration du poids du cocon et du poids de la coque lorsqu'on administre des composés JH. Lors de l'administration d'un analogue de JH, Murakoshi et coll., (1972) ont rapporté une amélioration du rendement de 20 à 35 %. Chang et coll., (1972) ont rapporté avoir obtenu une augmentation de 20 à 50 % du poids du cocon et de la chrysalide quand les larves de ver à soie du dernier âge sont traitées jusqu'au 6^{ème} jour. Mais l'amélioration implique toujours l'augmentation de la période de nourrissage. Muroga et coll., (1975) n'ont réussi à obtenir qu'une amélioration de 9 à 14 % mais sans changement de la durée larvaire. En 1985, Akai et coll., ont obtenu une augmentation de 26 % du poids de la coque avec des traitements répétés du ver à soie avec des composés de JH. Il est clair d'après ces rapports que la réponse du ver à soie en terme d'amélioration des caractères économiques varie en grande partie en fonction des composés utilisés, des races de vers à soie, etc....

Taux effectif d'élevage en nombre et en poids :

Chez KA × NB₄D₂, on remarque un changement notable de l'ERR en nombre avec les traitements de 5 et 10 ppm à 24 et 48 h. Une telle augmentation a aussi été observée avec 10 ppm à 72 h. Mais chez PM × NB₄D₂, le taux effectif d'élevage qui peut être compris comme la survie, n'est pas grandement affecté bien qu'on remarque un changement marginal avec 10 ppm à 48 h. Auparavant, les chercheurs n'avaient pas remarqué de changement remarquable de l'ERR (Trivedy et coll., 1993).

L'ERR en poids, un trait commercialement plus important, enregistre un changement positif substantiel chez les vers à soie traités. Chez KA $\times$ NB₄D₂, il y a une amélioration de 8,73 % quand ils sont traités à 48 h avec 5 ppm, cela est suivi par une amélioration de 5,56 % avec une application de 5 ppm à 24h : 10 ppm à 24 et 48 h et 5 ppm à 72 h donnent également des changements positifs. Chez PM $\times$ NB₄D₂, l'augmentation maximum est d'environ 8 % à 48 h avec 5 ppm. Cette augmentation pourrait être principalement attribuée à l'augmentation du poids du cocon avec l'application de JH et à l'augmentation de l'ERR en nombre.

Longueur du filament et titre :

Dans cette étude, l'augmentation du poids de la coque se reflète pertinemment sur la longueur du filament. On observe une amélioration de 16,31 et 17,23 % chez KA $\times$ NB₄D₂ et PM $\times$ NB₄D₂ respectivement chez les lots traités avec 5 ppm de NL-24 à 48 h (Tableaux I et II). Une augmentation de la longueur du filament correspondant presque à celle du poids de la coque est aussi visible avec les autres traitements. Au même moment, il y a un changement substantiel du titre. Cela doit être apprécié parce que, si une coque plus épaisse peut se dérouler en un filament plus court au titre plus épais, l'industrie pourrait ne pas l'accepter.

Les résultats de cette étude indiquent clairement que les mimétiques de JH naturels ou synthétiques qui sont bioactifs chez d'autres insectes peuvent être judicieusement employés en sériciculture pour le bénéfice de l'industrie. Le composé utilisé dans cette étude, le ω -formyl longifolène oxime citronellyl éther s'avère efficace pour lutter contre le moustique *Culex quinquefasciatus*, le porteur de la filariose (Sawaikar et coll., 1995).

Les résultats présents montrent clairement que bien que les composés imitant la JH influencent la production de soie de manière positive, cela dépend en grande partie de la dose et du moment d'application, comme nous l'avons précisé plus haut (Akai et coll., 1988 ; Trivedy et coll., 1993). Quand le poids du cocon / de la coque s'améliorent, on remarque une amélioration correspondante du poids larvaire. Il est évident que les changements de poids larvaire ne sont pas aussi importants que ceux du poids de la coque. Cela indique probablement qu'un poids larvaire élevé n'est pas une condition nécessaire à une amélioration du poids de la coque. Il semble plus probable à la lecture de Daillie (1979) que la glande séricigène est un organe cible de la JH et qu'elle croît indépendamment des autres organes après une inhibition temporaire, avec l'administration de JH.

Ce que l'on doit souligner ici est que l'amélioration des principaux traits commerciaux n'est pas accompagnée par un prolongement de la période de nourrissage. Cela pourrait être dû à l'effet stimulant direct du composé sur la synthèse des protéines dans la glande séricigène, comme l'ont suggéré Kajiura et Yamashita (1989). Une autre possibilité est que les lots traités convertissent la nourriture ingérée de manière plus efficace, de sorte que plus de soie est synthétisée à partir d'une quantité unitaire de nourriture. Ces changements au niveau physiologique ou moléculaire pourraient être le résultat d'une altération du rapport des hormones en circulation.

On peut admettre que le mimétique de JH, le ω -formyl longifolène oxime citronellyl éther peut être utilisé en sériciculture car il peut améliorer les traits commerciaux du ver à soie, bien qu'il soit considéré à l'origine comme un pesticide de la troisième génération. Lors d'une évaluation biologique minitueuse, il est devenu clair que le composé à une concentration de 5 ppm quand il est administré à 48 h du 5^{ème} âge suscite une réponse favorable chez le ver à soie quant à l'amélioration des paramètres économiques.

PRACTICAL TECHNIQUES OF ACID-TREATMENT TO DIAPAUSE EGGS AFTER REFRIGERATION

Y.-Y CHEN

Department of Sericulture and Apiculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, P. R. China

A practical technique of acid-treatment of diapause eggs after refrigeration has been studied in large quantity in the most popular commercial hybrids Quifeng × Baiyu in this paper. Results showed that 18 to 26 days aestivation when put into cold storage is safe for acid-treatment of diapause eggs after refrigeration, and the shortest refrigeration duration for the best hatching rate is 65 days for Quifeng × Baiyu or 60 days for Baiyu × Quifeng, and less than 55 days would significantly affect the hatching rate. Laboratory test and practical production proved that the improved techniques for the diapause eggs with acid-treatment gave a good performance of hatching rate and had no negative effect on larval health and cocoon quantity character. This method can be considered as a very useful solution for practical management of egg production.

Key words: Silkworm eggs, acid treatment, refrigeration.

INTRODUCTION

The technique of acid-treatment of the diapause eggs after refrigeration is an important method to supply spring-produced bivoltine hybrids in late autumn rearing season or autumn-produced hybrids for the spring rearing season in tropical or subtropical sericulture areas where the rearing season lasts longer, and it is also considered as a good solution for the problem of shortage of hybrids in autumn rearing season in temperate regions (Feng, 1993). However this technique has been rarely used in the practical production due to the less uniform hatching ability and lower hatching rate in south-east China, where acid-treatment of non-diapause eggs after refrigeration has been the best method for spring-produced eggs to be supplied for autumn rearing. There are only two commercial egg production crops year round and over 60% hybrid eggs are produced in spring season in the main sericultural regions of southeast China. Generally, a well-conceived processing plan is made for the distribution of the hybrids to the rearers for five crops of commercial cocoon production around the year and the hybrid will follow up the specific treatment according to practical plan. However, from time to time, there will be some extra demands or some unexpected factors to cause a shortage of hybrids in a certain rearing season. In 1998, there was a big shortage of hybrid eggs to meet the cocoon producer's need in the autumn rearing season in Zhejiang Province of P. R. China, and there was no other way to get so many hybrids from other provinces either. Meanwhile, there were a lot of hybrids produced in the spring season which had already past the refrigeration time for acid-treatment of non-diapause eggs after chilling. Therefore, the experiment was carried out based on the practical demands for improving the techniques of acid-treatment of the diapause eggs after refrigeration. 38,000 boxes of spring-produced diapause eggs, Quifeng × Baiyu and the reciprocal, which had been past 18-26 days after oviposition, have been successfully acid-treated after cold-storage with the improved acid-treatment techniques, and obtained satisfactory results such as practical hatching rate was over 95% in the laboratory and one-day hatching rate in farmers' house was over 90%, cocoon

yield was equal to that of normal acid-treated lots. The technique adopted and the results summarized here might be beneficial for commercial silkworm egg producers.

MATERIALS AND METHODS

The hybrids used were the reciprocals of Quifeng × Baiyu (abbreviates as QB) and Baiyu × Qiufeng (abbreviates as BQ), a high temperature and humidity resistant combination for summer and autumn rearing. Egg age is 18-26 days after oviposition to be transferred into cold storage.

Pretreatment of diapause eggs:

The spring-produced diapause eggs laid in the starched egg-clothes were soaked in the water, then washed down and cleaned by further washing, disinfected with a bleaching liquid which contained 2% effective chlorine. After having completely washed away the disinfectants and fully dried, the eggs were thinly spread in the wooden trays, protected for 4-6 hours under 21~22 °C, then transferred into the vestibule under 12.5° C for 48 hours before being put into the cold storage under 5~5.5° C.

Duration of cold-storage:

To supply the cocoon producers, the eggs were taken out for acid treatment after 60 ~ 62 days (three days are needed to finish the acid treatment of the total amount) in the cold storage. To investigate the suitable duration of cold storage, 50, 55, 60 and 65 days were tested.

Acid treatment method:

To study the optimum time of acid treatment, duration of acid-treatment for 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 minutes were tested respectively. Eggs after being acid treated were divided into two groups, group I (abbreviates as QBN and BQN): directly starts incubation, group II (abbreviates as QBC and BQC): refrigeration for 5 days under 5°C after acid treated. Always go through the intermediate temperature before or after refrigeration.

Based on the experimental results, the acid treatment standard for commercial supply is as follows:

Concentration of HCl: specific gravity	1.094
Temperature of HCl solution:	47.8 °C,
Duration of HCl treatment:	7 minutes.

Eggs after cold storage went through the vestibule at 12.5°C for 4~6 hours, and were preserved for 2 hours under natural temperature before acid treatment commences.

The eggs were spread on the wooden trays at 20~22°C for 26~28 hours after acid treatment. They have to be transferred to the vestibule under 12.5 °C for 1~2 days when most of the eggs were developed into the C₁ stages. The treatment afterwards was the same as the usual egg incubation procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Hatching performance with different treatments:

It was the first time that the diapause eggs were acid treated in such a large scale in this region in history. In order to obtain the optimum condition for acid-treatment and accumulate experiences, investigation on the hatching rate with different cold-storing duration, acid-treatment time and cold-storing method was designed and experiments were carried out in a small scale. Results are shown in fig. 1, 2 and 3.

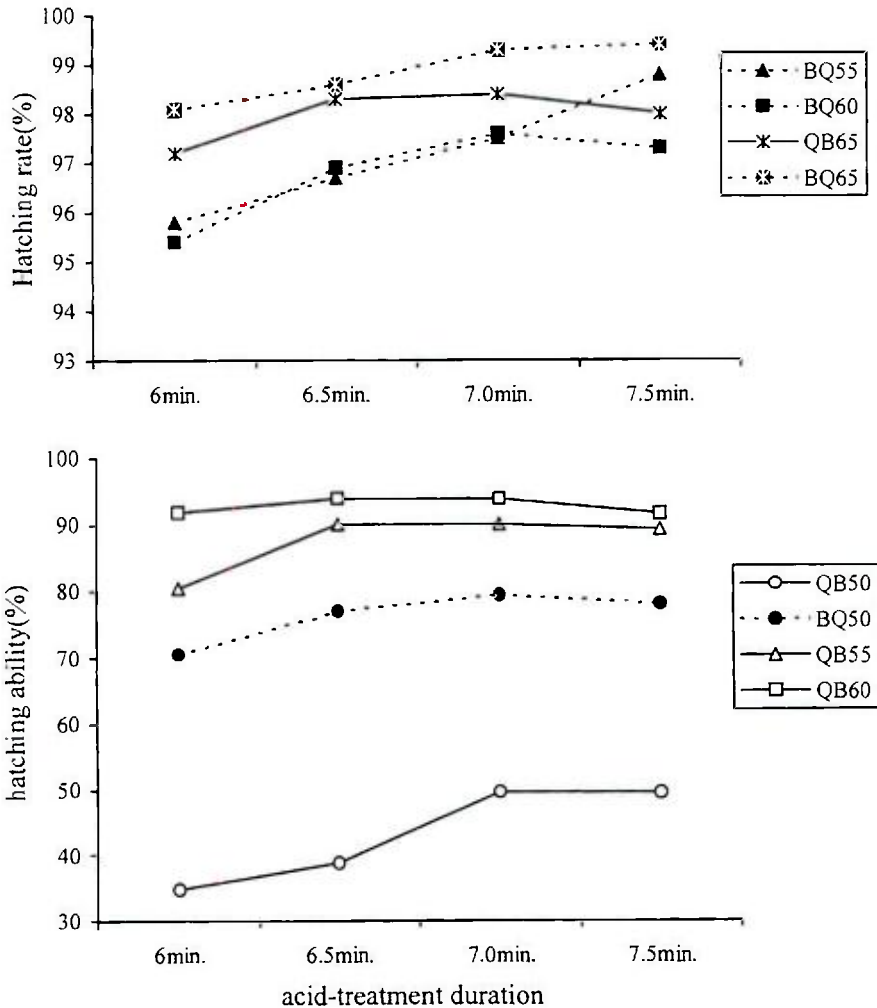


Fig. 1. Relation of acid treatment duration with the hatching hability.

Fig. 1. Relation entre la durée de truitement à l'acide et la capacité d'éclosion.

Fig. 1 is divided into two parts, so as to get a clear picture when the hatching rates are very close if the cold-storage duration is 60 days or over. Fig. 1 shows that:

i. The hatching rate increased with the increase of cold-storage duration, and hatching rates were all very high (over 90%) if cold storage duration is over 60 days, therefore, minimum 60 days of cold storage is suggested for this acid treatment method. Generally, a much longer cold storage duration (90-110 days) was required in previous reports (Li, 1989; Gao 1988). It is proved that as short as 60 days cold storage is good enough to attain a high hatching rate with the improved techniques.

ii. Between 6~7.5 minutes of the acid-treatment duration, the hatching rate increased as the increase of acid-treatment duration. However, if the cold-storage duration was 55 days or more, the optimum duration is 7.0 minutes, and the suitable range is 6.5–7.5 minutes. No significant difference

in hatching rate could be observed when the duration of cold-storage is 60 days or over. However, the acid treatment duration of 6.0 minutes for Chinese race and 6.5 minutes for Japanese race had been set as the standard in practical production by the normal acid treatment method to diapause eggs after refrigeration (Xu, 1999).

iii. The reciprocal hybrid (Baiyu $\times$ Qiufeng) had better performance of hatching rate than the positive cross (Qiufeng $\times$ Baiyu), especially significant when the cold-storage duration was 55 days or less (refer to the lines of QB50 with BQ 50, QB55 with BQ55). Therefore, it should be suggested that the hybrid Baiyu $\times$ Qiufeng be chosen when shorter cold-storage duration is necessary in the practical production. As for other combinations of popularized hybrids, specific experiment should be carried out.

Effect of cold storage after acid treatment on hatching rate is shown in fig. 2. Duration of acid treatment is 7 minutes in this experiment based on the above experiment result.

Significant difference can be observed if the duration of cold storage before acid treatment is less than 65 days. Most significant difference was observed when the cold-storage duration before acid treatment was only 50 days, and the positive effect decreased with the increase of cold-storage duration before acid treatment. There is no significant difference observed when the cold-storage duration reached 65 days.

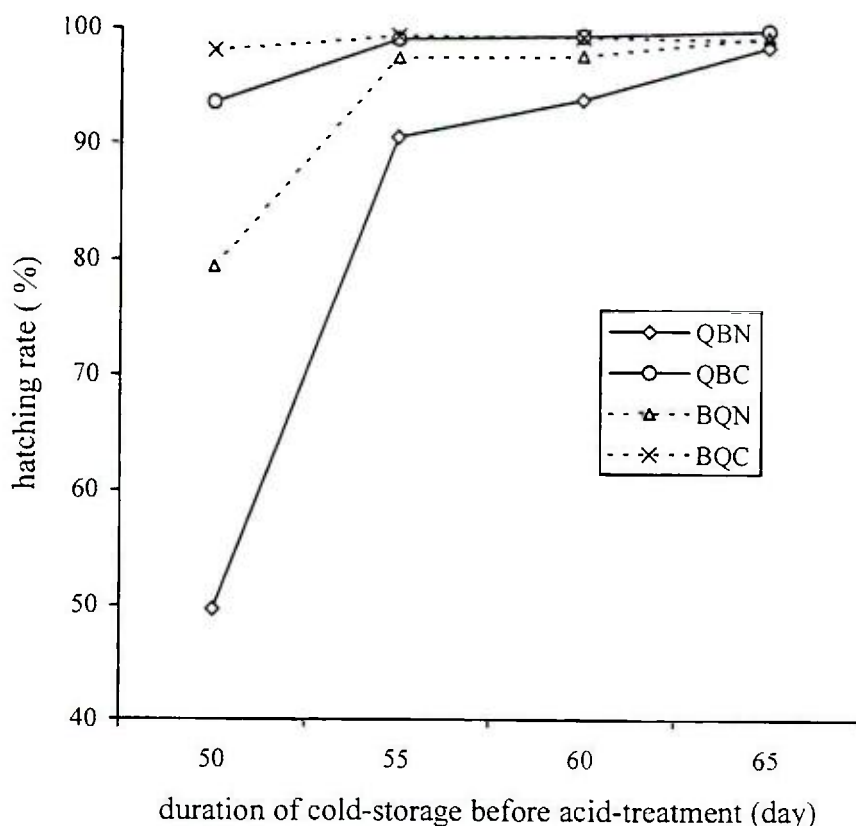


Fig. 2. Effect of cold storage after acid treatment on hatching rate.

Fig. 2. Effet du stockage au froid après le traitement à l'acide sur le taux d'éclosion.

If the eggs were cold-stored for 5 days after acid treatment, 5 days should be added to the total cold-storage duration on top of the cold-storage duration before acid treatment. In order to investigate the difference of the effect of cold-storage on the hatching rate with the continuous method before acid treatment and the two-step method before and after acid treatment, treatments of QBN and BQN in group I were compared with treatments of QBC and BQC in group II with 5 days less of cold-storage duration before acid treatment, results are shown in fig. 3. The hatching ability showed a better performance with the two-step cold storage than with the continuous method before acid treatment. The difference was more significant in the cross of Quifeng $\times$ Baiyu than in the cross of Baiyu $\times$ Quifeng, and also increased with the decrease of cold storage duration before acid treatment. It was suggested to adopt the two-step cold storage method as shown in the present paper when shorter cold storage duration has to be chosen in the practical situation.

Performance of hybrids supplied for commercial cocoon production:

The hatching rate of each batch of diapause eggs treated with acid after refrigeration is shown in table I. The practical hatching rates of both reciprocals are over 95%, when the aestivation duration is between 18~26 days, and the duration of cold-storage is over 60 days. Previous report had shown (Cai 1989, Feng 1993) that the egg age should be between 7 to 10 days if the cold storage duration is planned to be 90-110 days, and 10-20 days for 110-130 days. The present case is that the eggs were already 18-26 days old when the necessary actions were required. The results have proved that over 20 days of egg age for the short time cold storage (about 60 days) is safe when the acid treatment duration increased to 7 minutes instead of 6 minutes for Chinese races and 6.5 minute for Japanese races. However, the egg age should not be over 30 days, otherwise the hatching rate dramatically dropped down. This point will not be discussed here before further systematical experiment is carried out.

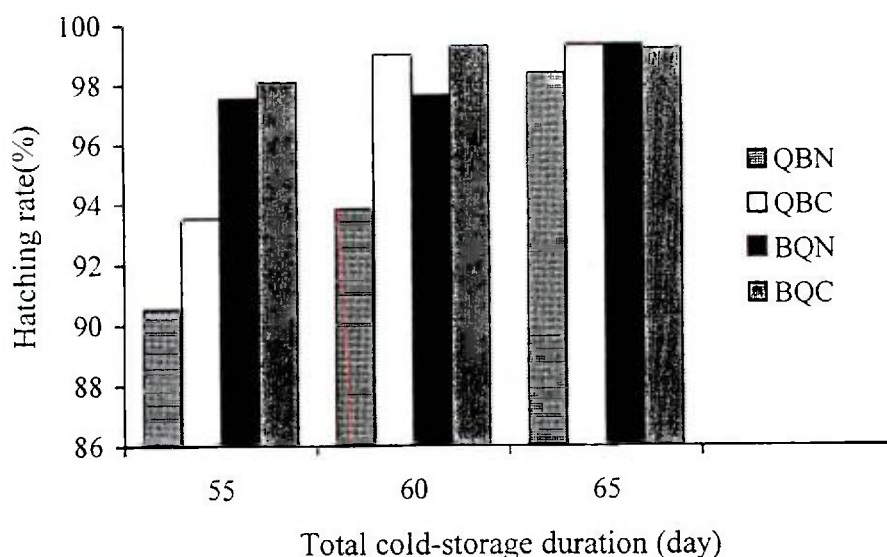


Fig. 3. Effect of cold storage duration in continuity or two-step on the hatching rate.

Fig 3. Effet de la durée de stockage au froid avec la méthode continue ou en deux étapes sur le taux d'éclosion.

Table I. Hatching rate of acid treated diapause eggs after refrigeration. (Performance in the laboratory)*Tableau I. Taux d'éclosion d'oeufs diapausants traités à l'acide après réfrigération. (Performance en laboratoire).*

Silkworm hybrids	Lot No.	Egg age	Duration of cold storage	Practical hatching rate (%)
<i>Hybrides de vers à soie</i>	<i>No. de lot</i>	<i>Age de l'oeuf</i>	<i>Durée du stockage au froid</i>	<i>Taux d'éclosion pratique (%)</i>
Qiufeng×Baiyu	12	19~23	60	96.0
Qiufeng×Baiyu	14	18~23	60	99.1
Qiufeng×Baiyu	8	20~23	60	99.7
Qiufeng×Baiyu	6	20~23	61	99.5
Qiufeng×Baiyu	6	21~26	61	97.1
Baiyu × Qiufeng	11	18~22	62	96.9
Baiyu × Qiufeng	13	18~22	60	99.1
Baiyu × Qiufeng	5	21~26	62	96.7
Baiyu × Qiufeng	5	22~23	61	98.6
Baiyu × Qiufeng	11	21~23	61	98.0

Moreover, we had also investigated the hatching rates in the incubation center and farmers' house, and attained following results as shown in table II.

Table II. Hatching rates investigated in the incubation center and farmers' condition.*Tableau II. Taux d'éclosion dans le centre d'incubation et chez les fermiers.*

Hybrids name	Lot No.	In the incubation center		In farmer's condition	
		One day hatching rate	Two day hatching rate	One day hatching rate	Two day hatching rate
<i>Nom de l'hybride</i>	<i>No. de lot</i>	<i>Dans le centre d'incubation</i>		<i>Chez un fermier</i>	
		<i>Taux d'éclosion en un jour</i>	<i>Taux d'éclosion en deux jours</i>	<i>Taux d'éclosion en un jour</i>	<i>Taux d'éclosion en deux jours</i>
Qiufeng × Baiyu	12	92.0	95.8	91.5	93.9
Baiyu × Qiufeng	13	94.3	98.9	92.8	95.1
Average / Moyenne		93.2	97.4	92.2	94.5

The hatching rate in the incubation center is also very high, over 95%, though it is a little lower than in the laboratory. The result in the incubation center might be more accurate for its larger scale and practical incubation conditions and techniques. The hatching rate investigated in the farmer's house was lower than that in the incubation center, that might be caused by the unstable temperature and humidity for the supplementary incubation in the farmers' house, however, one day hatching rate over 93% is good enough in the situation of farmer's practice.

Furthermore, we have investigated the cocoon yield in four villages of Gaoqiao town, a total of 32 farmers with 64.8 boxes of eggs, and the average cocoon production per box was 32kg, while the average of the whole town is 30kg, which means the performance of these specially treated eggs are a little better than the average. Another case in Xiatang village of Zhongguang Town, 409.2 boxes of these eggs were supplied, and average cocoon yield per box was 34.5kg, while the average of the whole town is 33.8kg. All above results showed that there is no negative effect on larval health and cocoon quantity character when the diapause eggs were treated by the improved acid treatment techniques.

Based on the above results, the improved technique for the diapause eggs with acid-treatment was proved to be successful by the performance of hatching rate both in laboratory and practical production, and also the rearing performance in the farmers' house. This method might be considered as a very useful solution for practical management of egg production.

SUMMARY

1) Acid-treatment of diapause eggs after refrigeration, between 18–26 days of the egg age after oviposition to be put into cold storage is safe, but should not be over 30 days.

2) To attain the best hatching rate, the shortest duration of cold storage is 65 days for the cross of Qiufeng × Baiyu, and 60 days for the cross of Baiyu × Qiufeng. And the suitable cold-storage duration is 55 days or over, less than 55 days will significantly affect the hatching rate.

3) If it was impossible to reach 55 days in practical situation, to use the reciprocal hybrid of Baiyu × Qiufeng could achieve better result.

4) If the acid treated eggs are directly put into the incubation room, their hatching rate would be lower than that of acid treated eggs preserved in the cold-storage for 5 days under 5°C before incubation commences. Note, no matter whether the eggs are entering or released from the cold storage, they must be kept in a vestibule under 12.5°C for at least two hours.

5) Relatively longer duration of acid-treatment could increase the degree of acid stimulation on eggs, which would increase the hatching rate, the ideal duration was 7 minutes in the condition of eggs used in the present paper.

6) The above investigation is only based on the combination of Qiufeng × Baiyu and its reciprocal, the difference with other popularized hybrids will be further investigated.

REFERENCES

- FENG J.-X. 1993 science and technology of silkworm eggs. Publishing House of Agriculture Science, Beijing, China, p118-132.
- CAI R.-A. 1989, Studies on the relation between cold-storage duration and hatching rate for commercial silkworm eggs for acid treatment after refrigeration. *Acta Sericologica Sinica*, 15(1), 63-64
- LIN F.-H. 1989, Techniques to prolong controlling duration of acid treatment and its practical application. *Bulletin of Sericulture*, 20(2):49-50.
- GAO C. - Z. 1988 Experiment on acid treatment for diapause eggs.
- XU J.-L., editor, 1999, A Practical Manual for Sericulture Industry. Pp 260-263. Publishing House of China Agricultural University. Beijing, China.

PRATIQUES DE TRAITEMENT A L'ACIDE DES ŒUFS DIAPAUSANTS APRES REFRIGERATION

Y. Y. CHEN

Department of Sericulture and Apiculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, P. R. China.

Nous avons étudié dans cet article une technique pratique de traitement à l'acide d'une grande quantité d'œufs diapausants après réfrigération avec les hybrides commerciaux les plus populaires Quifeng × Baiyu. Les résultats montrent que 18 à 26 jours d'estivation avant qu'on ne les stocke au froid sont sans danger pour le traitement à l'acide des œufs diapausants après la réfrigération. La durée de réfrigération la plus courte pour le meilleur taux d'éclosion est de 65 jours pour Quifeng × Baiyu ou de 60 jours pour Baiyu × Quifeng et une durée inférieure à 55 jours a un effet significatif sur le taux d'éclosion. Les tests en laboratoire et de production pratique prouvent que les techniques améliorées de traitement à l'acide des œufs diapausants donnent de bonnes performances de taux d'éclosion et n'ont pas d'effet négatif sur la santé larvaire et la quantité de cocons. Cette méthode peut être considérée comme une solution très utile pour la gestion pratique des œufs destinés à la production.

INTRODUCTION

Le traitement à l'acide des œufs diapausants après réfrigération est une méthode importante pour fournir des hybrides bivoltins produits au printemps à la fin de l'élevage d'automne ou des hybrides produits en automne pour la saison d'élevage du printemps suivant dans les zones séricicoles tropicales ou subtropicales ou la saison d'élevage dure plus longtemps, et il est aussi considéré comme une bonne solution au problème du manque d'hybrides pendant la saison d'élevage de l'automne dans les régions tempérées (Feng, 1993). Cependant, cette technique avait rarement été utilisée de manière pratique pour la production commerciale dans le sud-est de la Chine, où le traitement à l'acide des œufs non diapausants après réfrigération est la meilleure solution pour que les œufs produits au printemps puissent être utilisés en automne à cause de la capacité d'éclosion moins uniforme et d'un taux d'éclosion plus bas. Il y a seulement deux récoltes commerciales d'œufs dans l'année et plus de 60 % des œufs hybrides sont produits au printemps dans les principales régions séricicoles du sud-est de la Chine. Généralement, on met sur pied un plan de traitement bien adapté pour la distribution des hybrides aux éleveurs afin d'avoir cinq récoltes commerciales dans l'année et l'hybride suivra un traitement spécifique en fonction du plan. Cependant, de temps en temps, il y a des besoins supplémentaires ou des facteurs inattendus qui entraînent un manque d'hybrides pendant une certaine saison d'élevage. En 1998, il y a eu une demande importante en œufs hybrides pour répondre aux besoins des producteurs de cocons pendant la saison d'élevage d'automne dans la province de Zhejiang en Chine, et il n'a pas été possible d'obtenir autant d'hybrides dans d'autres provinces. Entre-temps, de nombreux hybrides avaient été produits au printemps, mais qui avaient déjà dépassé le délai pour la réfrigération avant le traitement à l'acide des œufs non diapausants. Ainsi, nous avons entrepris notre expérience en tenant compte des besoins pratiques dans le but d'améliorer les techniques de traitement à l'acide après la réfrigération. 38 000 boîtes d'œufs diapausants produits au printemps de Quifeng × Baiyu et de son réciproque, âgés de 18 à 26 jours ont été traitées avec succès à l'acide après avoir été stockés au froid en utilisant les techniques améliorées de traitement à

l'acide. Des résultats satisfaisants ont été obtenus, le taux pratique d'éclosion en laboratoire est de plus de 95 %, et le taux d'éclosion en un jour chez un fermier est supérieur à 90 %, le rendement en cocons est égal à celui des lots normaux traités à l'acide. Cette technique et les résultats rassemblés ici pourraient être bénéfiques pour les producteurs d'oeufs de vers à soie destinés au commerce.

MATERIELS ET METHODES

Les hybrides utilisés sont les réciproques de Quifeng × Baiyu (abréviation QB) et Baiyu × Quifeng (abrévies BQ), une combinaison résistante à l'humidité et à une température élevée pour l'élevage d'été et d'automne. L'œuf est stocké au froid quand il est âgé entre 18 à 26 jours.

Pré-traitement des œufs diapausants :

Les œufs diapausants produits au printemps pondus sur des tissus amidonnés sont trempés dans de l'eau, puis lavés et nettoyés avec un rinçage supplémentaire, désinfectés avec de l'eau de javel contenant 2 % de chlore. Après avoir complètement rincé les désinfectants et avoir séché complètement les œufs, ils sont finement étalés sur des plateaux en bois, et conservés pendant 4 à 6 h à 21-22°C, puis sont transférés dans une pièce à moins de 12,5° C pendant 48 heures avant d'être stockés au froid à 5-5,5° C.

Durée du stockage au froid :

Pour fournir les producteurs de cocons, les œufs sont sortis pour le traitement à l'acide après 60 à 62 jours de stockage au froid. (il faut trois jours pour effectuer le traitement à l'acide de la totalité). Pour déterminer la durée convenable de stockage au froid, nous avons essayé 50, 55, 60 et 65 jours.

Méthode de traitement à l'acide :

Pour étudier le moment optimum de traitement à l'acide, on teste respectivement une durée de traitement de 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5 minutes. Les œufs après avoir été traités à l'acide sont divisés en deux groupes, groupe I (abréviation QBN et BQN) : mise immédiate en incubation, groupe II (abréviations QBC et BQC) : réfrigération pendant 5 jours en dessous de 5° C après avoir été traités à l'acide. Il faut toujours passer par une température intermédiaire avant ou après la réfrigération.

D'après les résultats expérimentaux, la norme de traitement à l'acide pour la production commerciale est la suivante :

Concentration en HCl : gravité spécifique	1,094
Température de la solution HCl :	47,8° C
Durée du traitement HCl :	7 minutes.

Les œufs après avoir été stockés au froid passent par une pièce à 12,5° C pendant 4 à 6 h et sont conservés pendant 2 h à une température naturelle avant que le traitement à l'acide commence.

Les œufs sont étalés sur des plateaux en bois à 20-22° C pendant 26 à 28 heures après le traitement à l'acide. Il faut ensuite les transférer à 12,5° C pendant 1 à 2 jours quand la plupart des œufs se sont développés aux stades C1. Le traitement qui suit est le même que dans le cadre de la procédure habituelle d'incubation des œufs.

RESULTATS ET DISCUSSION

Performance d'éclosion avec des traitements différents :

C'est la première fois dans l'histoire que des œufs diapausants ont été traités à l'acide à une aussi grande échelle dans cette région. De manière à obtenir des conditions optimums de traitement à l'acide et à accumuler les expériences, une étude sur le taux d'éclosion avec des durées différentes de stockage

au froid, de durée de traitement à l'acide et de méthode de stockage au froid a été conçue et des expériences ont été réalisées à une petite échelle. Les résultats sont présentés dans les figs. 1, 2 et 3.

La figure 1 est divisée en deux parties, de manière à avoir une image précise quand les taux d'éclosion sont très proches si la durée de stockage au froid dépasse 60 jours. La fig. 1 montre que :

i. Le taux d'éclosion augmente quand la durée de stockage au froid augmente et les taux d'éclosion sont tous très élevés (plus de 90 %) si la durée de stockage au froid dépasse 60 jours ; on conseille donc une durée minimum de stockage au froid de 60 jours avec cette méthode de traitement à l'acide. Généralement, une durée de stockage beaucoup plus longue (90 à 110 jours) était recommandée dans les rapports précédents (Li, 1989 ; Gao 1988). Il est prouvé qu'une durée aussi courte que 60 jours de stockage au froid est assez bonne pour atteindre un taux d'éclosion avec les techniques améliorées.

ii. Avec une durée de traitement entre 6 à 7,5 minutes, le taux d'éclosion augmente quand la durée de traitement augmente. Cependant, si la durée de stockage au froid est de 55 jours ou plus, la durée optimum est de 7 minutes et la durée convenable est de 6,5 à 7,5 minutes. On n'observe pas de différence significative pour le taux d'éclosion quand la durée de stockage au froid est de 60 jours ou plus. Cependant, une durée de traitement de 6 minutes pour la race chinoise et de 6,5 minutes pour la race japonaise avait été établie comme norme de production avec la méthode normale de traitement à l'acide des œufs diapausants après réfrigération (Xu, 1999).

iii. L'hybride réciproque (Baiyu × Qiufeng) a de meilleures performances de taux d'éclosion que le croisement (Qiufeng × Baiyu), cela est surtout significatif quand la durée du stockage au froid est inférieure à 55 jours (se référer aux lignées de QB50 avec BQ 50, QB55 avec BQ55). On pourrait donc conseiller d'avoir recours à l'hybride Baiyu × Qiufeng quand une durée de stockage plus courte est nécessaire dans la production pratique. Quant aux autres combinaisons d'hybrides populaires, il faudrait réaliser des expériences spécifiques.

L'effet du stockage au froid après le traitement à l'acide sur le taux d'éclosion est présenté dans la fig. 2. La durée du traitement à l'acide est de 7 minutes dans cette expérience d'après les résultats expérimentaux cités plus haut.

On observe une différence significative si la durée du stockage au froid avant le traitement à l'acide est inférieure à 65 jours. Une différence très significative est observée quand la durée du stockage au froid avant le traitement à l'acide n'est que de 50 jours et l'effet positif baisse quand la durée du stockage au froid avant le traitement à l'acide augmente. On n'observe pas de différence significative quand la durée de stockage au froid atteint 65 jours.

Si les œufs sont stockés au froid pendant 5 jours après le traitement à l'acide, il faut ajouter 5 jours de plus à la durée totale du stockage au froid avant le traitement à l'acide. De manière à étudier les différences entre la méthode continue avant le traitement à l'acide et la méthode en deux étapes avant et après le traitement à l'acide, les traitements de QBN et BQN dans le groupe I sont comparés aux traitements de QBC et BQC dans le groupe II avec 5 jours de moins de stockage au froid avant le traitement à l'acide et les résultats sont présentés dans la fig. 3. Le taux d'éclosion est meilleur avec le stockage en deux étapes qu'avec la méthode continue avant le traitement à l'acide. La différence est plus significative avec le croisement Quifeng × Baiyu qu'avec le croisement de Baiyu × Qiufeng, et augmente aussi lorsque la durée du stockage au froid avant le traitement à l'acide baisse. Il est conseillé d'adopter une méthode de stockage en deux étapes comme celle que nous présentons dans cet article quand des durées de stockage au froid plus courtes doivent être choisies dans la pratique.

Performance des hybrides destinés à la production commerciale de cocons :

Le taux d'éclosion de chaque lot d'œufs diapausants traités à l'acide après la réfrigération est présenté dans le Tableau I. Les taux pratiques d'éclosion des deux réciproques sont de plus de 95 %, quand la durée d'estivation dure entre 18 à 26 jours et le stockage au froid plus de 60 jours. Un rapport

précédent avait montré (Cai 1989, Feng 1993) que l'œuf devrait être âgé de 7 à 10 jours si on prévoyait que le stockage dure de 90 à 110 jours et de 10 à 20 jours si on prévoyait que le stockage dure de 110 à 130 jours. Dans le cas présent, les œufs ont déjà 18 à 26 jours quand les actions nécessaires sont réalisées. Les résultats prouvent qu'il est sans danger que l'œuf soit âgé de plus de 20 jours pour une durée de stockage au froid courte (environ 60 jours) quand la durée de traitement à l'acide passe de 6 minutes à 7 minutes pour les races chinoises et à 6,5 minutes pour les races japonaises. Cependant, l'œuf ne doit pas être âgé de plus de 30 jours, autrement le taux d'éclosion baisse brutalement. Cet aspect ne fera pas l'objet d'une discussion ici avant que des expériences systématiques supplémentaires soient réalisées.

Le taux d'éclosion dans le centre d'incubation est aussi très élevé, plus de 95 %, bien qu'il soit un peu plus faible qu'en laboratoire. Les résultats dans le centre d'incubation sont peut être plus justes parce qu'ils sont obtenus à une plus grande échelle pour les conditions et les techniques d'incubation. Le taux d'éclosion chez les fermiers est plus faible que celui dans le centre d'incubation, ce qui pourrait être dû à la température instable et à l'humidité de la magnanerie, cependant, un taux d'éclosion en un jour de plus de 93 % est assez bon dans une magnanerie de fermier.

De plus, nous avons étudié le rendement en cocons dans quatre villages près de la ville de Gaoqiao, soit un total de 32 fermiers avec 64,8 boîtes d'œufs et une production moyenne de cocons par boîte de 32 kg, tandis que la moyenne de l'ensemble de la ville est de 30 kg, ce qui veut dire que les performances des œufs traités spécialement sont un peu meilleures que la moyenne. Dans le cas du village de Xiatang près de la ville de Zhongguang, 409,2 boîtes d'œufs ont été fournies et le rendement moyen en cocons par boîte est de 34,5kg, tandis que la moyenne de la ville est de 33,8kg. Tous les résultats ci-dessus montrent qu'il n'y a pas d'effet négatif sur la santé larvaire et sur les caractères quantitatifs du cocon quand on a recours aux techniques améliorées de traitement à l'acide des œufs diapausants.

D'après les résultats ci-dessus, la technique améliorée de traitement à l'acide des œufs diapausants s'avère efficace compte tenu du taux d'éclosion à la fois en laboratoire et dans le centre d'incubation et aussi d'après la performance d'élevage chez les fermiers. Cette méthode pourrait être considérée comme une solution très utile pour la gestion pratique des œufs destinés à la production.

RESUME

1) Pour le traitement à l'acide des œufs diapausants après réfrigération, on peut stocker sans danger les œufs au froid quand ils sont âgés entre 18 à 26 jours, mais ils ne doivent pas être âgés de plus de 30 jours.

2) Pour atteindre le meilleur taux d'éclosion, la durée la plus courte de stockage est de 65 jours pour le croisement Qiufeng × Baiyu et de 60 jours pour le croisement Baiyu × Qiufeng. Et la durée de stockage qui convient est de 55 jours ou plus, en dessous de 55 jours cela a des effets sur le taux d'éclosion.

3) S'il est impossible d'atteindre 55 jours dans les conditions pratiques, l'utilisation de l'hybride réciproque Baiyu × Qiufeng pourrait donner de meilleurs résultats.

4) Si les œufs traités à l'acide sont directement mis dans la pièce d'incubation, leur taux d'éclosion sera moins important que celui des œufs traités à l'acide conservés au froid pendant 5 jours à moins de 5° C avant que l'incubation ne commence. Il faut noter que quand les œufs rentrent ou quittent la pièce de stockage au froid, il doivent être placés dans une pièce à moins de 12,5 ° C pendant au moins deux heures.

5) Une durée relativement plus longue de traitement à l'acide pourrait augmenter le degré de stimulation de l'acide sur les œufs, ce qui augmenterait le taux d'éclosion, la durée idéale étant de 7 minutes pour les œufs utilisés dans cette étude.

6) Cette étude ne porte que sur la combinaison Qiufeng × Baiyu et son réciproque, les différences avec les autres hybrides populaires seront étudiées plus tard.

POSITIVE STAINING METHOD FOR DETECTION OF PEBRINE SPORE *NOSEMA BOMBYCIS* IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

N. R. PRASAD, S. T. GOVINDHARAJU & K. S. KESHAWA REDDY

KSSRDI, Thalaghattapura, Kanakapura Road, Bangalore – 560 062, India.

*An effective, quick and simple method of differentiation of pebrine spore from non pebrine spore and artifacts during mother moth examination, was a prerequisite when a large number of silk moths were examined for pebrine spore in grainage centres. In the field condition, examination for pebrine spore in homogenate of mother moth without centrifugation, filtering and staining posed problem of precise detection of pebrine spore due to the presence of such artifacts and non pebrine spores. A simple positive staining method was developed and described, which differentiated pebrine spore *Nosema bombycis* from non pebrine spores in silkworm *Bombyx mori* L. The method increased the visibility of the pebrine spores from spore resembling non pebrine artifacts by differential staining. One percent crystal violet stain with a pretreatment with ten percent potassium permanganate solution (KMnO₄) stained the spores in less than two minutes. The paper describes the methodology of staining, results and its advantages.*

Keywords: *Nosema bombycis*, pebrine, *Bombyx mori*, silkworm, detection, staining, artifacts, moth examination.

INTRODUCTION

Nosema bombycis Nageli (Microsporidian: Nosematidae) infects silkworm *Bombyx mori* L. and causes the disease known as pebrine. Heavy mortality resulting in cocoon crop losses were recorded in countries practising sericulture (Barman, 1990; Lefroy, 1916; Samson *et al.*, 1990; Subba Rao *et al.*, 1991; Tatsuke, 1971). The disease spreads vertically from generation to generation by transovarial transmission through eggs and horizontally in the population per oral feeding of contaminated leaf (Pasteur 1870). The pebrine spore released into the environment by contamination, survived in the rearing environment six to eight months retaining some viability (Patil and Muniraju, 1991 unpublished). The only method being followed to control the disease was by strict moth examination, destruction of infected moth and the crop and thorough disinfection (Ishihara, 1982). Hence visibility of the spore in the homogenate of moth was the crucial stage in controlling the primary contamination in addition to supply of disease free layings to the farmers.

In the field condition the grainers examine large number of mother moth in an unit time and the visibility of the spore in the homogenate of the moth was affected by the interference of debris of cells and tissues, fat globules and scales (Geetha Bai *et al.*, 1994). These difficulties were more when the spore load in the moth was less. Hazard and Weiser (1968) reported difficulties in accurate identification of the microsporidian due to dimorphis exhibited. *Nosema bombycis* and closely related species were diagnosed with the use of antibody sensitized latex (Grobov and Rodinova, 1985; Hayashiya and Ayuzawa, 1987; Watanabe, 1987), fluorescent antibody technique (Sato *et al.*, 1981). Further, monoclonal antibody technique (Kohler and Milstein, 1975) and immunodiagnosis

(Senguptha *et al.*, 1993) were also reported. But these methods are not being practiced in the field because of their complexity and of the time taken and cost involved. In addition, these methods involve greater technical skills which are not able to be followed by a moth tester in a grainage centre. Hence for a quick and clear visibility of spores among the spore resembling artifacts like fat globules, debris, a positive staining method was developed and its advantages were discussed.

MATERIALS AND METHODS

Different biological stains i.e methyle blue, malachite green, giemsa, sudan, crystal violet were used to stain the pebrine spore with respect to duration and specificity of staining. Purified and impure spore suspensions were used to study the specificity of staining. Pebrinised moths were used to get spores along with the debris of cells and tissues required for differential staining.

Experimental infection of the silkworm:

Larvae of silkworm *Bombyx mori* L. on fifth instar first day were infected with spores of *Nosema bombycis* per oral feeding with the leaf smeared with spores (10^4 spores / ml) and the worms were reared till they spun cocoons or died to infection. The female moths emerged out of the cocoons (which were pebrinised) were used for preparation of homogenate required for the study.

Preparation of homogenate:

The abdomen of the infected moth was crushed using pestel and mortar. One to two drops of 2% potassium hydroxide solution and one or two drops of 10% potassium carbonate were added to the homogenate mixed thoroughly and crushed again. Potassium hydroxide softens the tissue by disrupting cell membranes and potassium carbonate helped in dissolving and minimizing fat globules which interfered with visibility of spore (Geetha Bai *et al.*, 1994).

Staining method:

The stains selected were prepared and used as per Bancraft (1975); Cantwell (1974) and Pears (1972). Pebrine spores were stained in purified form and along with tissue debris, fat globules and such other artifacts present in the homogenate of mother moth.

Positive staining method:

a) A small drop of homogenate of the moth was taken on one end of a slide and smeared towards the other end with the help of another clean micro slide.

b) Then the slide was passed over the flame of spirit lamp 2-3 times after the smear was dried in the air.

c) The slide was then pretreated by dipping in 20% potassium permanganate solution for 15 seconds then washed in tap water by keeping the smeared side down.

d) Two to three drops of 2% crystal violet stain was dropped over the smear for one to one and half minutes, then the excess stain was poured and the slide was washed in water either dipping in water bath or in running tap. The excess stain was reduced by dipping for 1-2 sec. in propanol.

e) The slide was then mounted using a cover slip immediately and observed under the microscope if it is a temporary slide. For permanent slides DPX mountant was used. If the slide needs to be observed after weeks, the smears were prepared and heat fix over the flame and the slides were stored till observation. While observing the stored slides, staining procedures from a to e were followed.

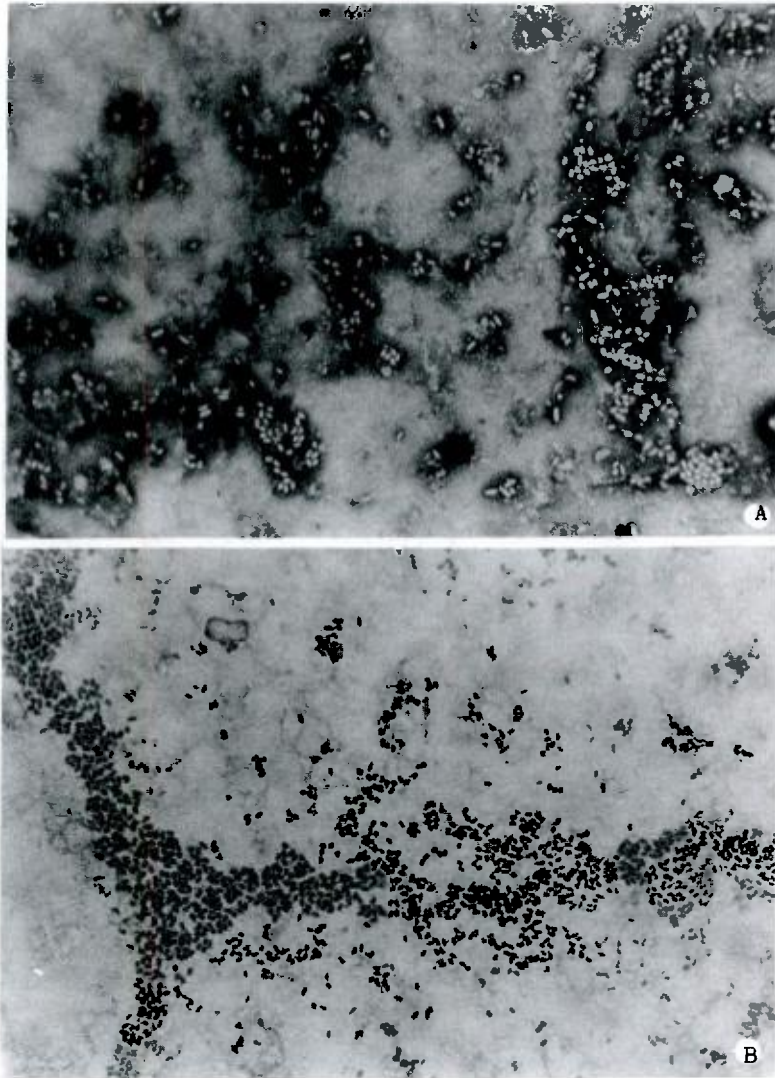


Plate I / Planche I.

A. Pebrine spore *Nosema bombycis* with tissue and other artifacts. Background negative stain (India ink) showing non pebrine and artifacts as bright objects.

A. Spores de pébrine *Nosema bombycis* avec les artefacts et débris de tissus. Coloration négative de fond (encre de Chine) montrant ce qui n'est pas de la pébrine et les artefacts comme des objets brillants.

B. Pebrine spore *Nosema bombycis*. Positive stain (crystal violet) showing only pebrine spores taking stain leaving other artifacts unstained. (1:1 water and propanol as destaining agent).

B. Spores de pébrine *Nosema bombycis*. Coloration positive (violet de méthylène) montrant seulement les spores de pébrine qui se colorent et ne colorant pas les autres artefacts (eau propanol 1:1 comme agent de décoloration).

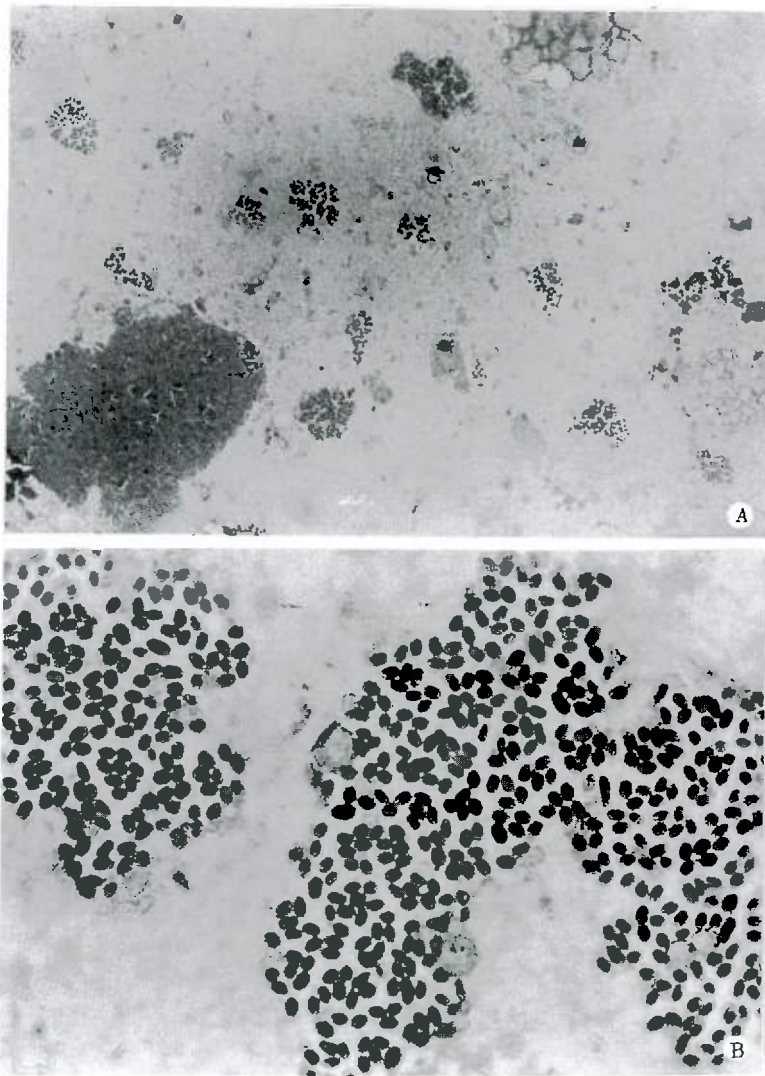


Plate II / Planche II.

A. Pebrine spore *Nosema bombycis* with tissue and other artifacts (under low power 10 ×) showing differential staining of positive staining method. Grades of staining from pink to dark purple. Dark purple objects are pebrine spores.

A. Spores de pébrine *Nosema bombycis* avec le tissu et d'autres artefacts (sous un grossissement faible × 10) montrant la coloration différentielle de la méthode de la coloration positive. Degrés de coloration de rose à violet foncé. Les objets violet foncé sont des spores de pébrine.

B. Pebrine spore *Nosema bombycis* showing differentiation of spore from that of background and other artifacts (100 × magnification).

B. Spores de pébrine *Nosema bombycis* montrant que les spores se différencient du fond et des autres artefacts (grossissement × 100).

RESULTS AND DISCUSSION

The objective of this study was to develop a simple, quick method of staining the pebrine spore in the field condition where a large number of mother moth were examined. The conventional staining procedures using the Giemsa and other microbiological stains were time consuming, laborious and required technical skills. When the spore along with the tissue debris were stained using the crystal violet, as described it took 30 minutes as compared to 60 min in case of ziemsa. When the heat fixed smears were pretreated with 20 percent potassium permanganate solution, this duration of staining was reduced to one and a half minutes without altering the size and shape of the pebrine spores (Plate 1a). In addition to reduction in staining time, the method also differentiated the pebrine spores from that of tissue debris, fat globules and such other non pebrine artifacts (Plate 2a). The pebrine spore looked deep purple in colour and the rest of the material of the homogenate looked in different shades of pink/purple. If the slides were dipped in propane-ol for destaining, all the materials except pebrine spores looked destained (Plate 1b and Plate 2b). This was useful to detect pebrine spores quickly even by unskilled non technical moth testers in the grainage centre. Geetha Bai *et al.*, (1994) reported negative staining method using India ink which was a background stain. Any such background stains like nigorosil or India ink helped for quick visibility of spores but they did not differentiate the spores from spore resembling artifact like fat globules, tissue debris etc. Even the spores fixed in the latitudinal position (transversal section) looked similar to fat globules (Plate 1a).

Any error caused during the moth examination especially when the spore load was less lead to wrong diagnosis of the disease and allowed the transmission of the spores to the next generation wherein it caused crop failures. During such conditions it was difficult to prepare pebrine free layings in the field condition. Hence precise detection of spores is a prerequisite which improves the visibility of the spore by differential staining. In addition to these difficulties, enormous sample size of the moth was to be tested for the presence or absence of the pebrine spore. Hence the positive staining method developed helped for a quick visibility of the spores and in differentiating the spore from the spore resembling artifacts. The pebrine spores get inactivated during the process of staining and reduce the risk of contamination by the slides prepared with this method. It could be stored weeks together during heavy work load.

CONCLUSIONS

This staining method could be recommended to follow in the grainage centres especially for early and late emergence of moths. In addition, the method could be followed when confusion arises due to low spore load, spore resembling artifacts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express deep sense of gratitude to Dr S. B. Dandin, Ex-Director, KSSRDI, Dr R. Raghuraman, Divisional chief, KSSRDI, for their encouragemnts and facilities provided to carry out the work.

REFERENCES

- BANCRAFT B. J. D. (1975) *Histochemical technique*. Ed. Butterwoondon, Briton.
- BARMAN A. C. (1990) Out break of silkworm *Bombyx mori* L. disease under the influence of different commercial seasons of Bangladesh. *Bull. Seric. Res.*, 1: 41-46.
- CANTWELL G. E. (1974) *Insect diseases*, Vol. 1. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- GEETHA BAI M., C. S. PATIL & A. R. Kasturaba Bai (1994) A new method for easy detection of Pebrine spores. *Sericologia*, 25(3), 297-300.

- GROBOV O. V. & RODINOVA Z. E. (1985). Trudy visesoynznogo. Inst. Eksperimental veterinarii, 62, 112-116.
- HAZARD E. I. & WEISER J. (1968) J. Protozool. 15, 817-823.
- HAYASHIYA S. & AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody sensitized latex. J. Sericult. Sci. Jpn., 56(2), 169-170.
- ISHIHARA R. (1982) Report on the technical co-operation to the World Bank Aided Sericulture Projects in Karnataka, India, pp. 100-102.
- KAWARABATA & HAYASHIYA (1987) J. Invert. Pathol. 50(2), 118-123.
- KOHLER G. & MILSTEIN C. (1975) Nature, 256, 495-497.
- LEFROY H. M. (1916) Report on an enquiry into the silk industry in India. Govt. of India Publication, Calcutta.
- LI D. (1985) Canye kexue, 11(1), 99.
- PEARS A. G. (1972) Histochemistry: Theoretical and applied vol. I and II, ed. Churchill, Livingstone.
- SAMSON M. V., BAIG M., SHARMA S. D., BALAVENKATASUBBAIAH M., SASIDHARAN T. O. & JOLLY M. S. (1990) Survey on the relative incidence of silkworm diseases in Karnataka, India, Indian J. Seric., 29(2): 248-254.
- SUBBA RAO G., CHANDRA A. K. & BHATTACHARYA J. (1991) Incidence of crop loss from adopted rearing level on West Bengal due to silkworm diseases, Indian J. Seric. Vol. 30(2): 167.
- PASTEUR L. (1870) Etudes sur la maladie des vers à soie, cité in Pebrine disease of silkworms, a technical report. (Ed., Tatsuke K. 1971). Overseas Technical Cooperation Agency, Tokyo, Japan.
- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H. & FUJIWARA T. (1981) Serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm, *Bombyx mori* L., by an indirect fluorescent antibody technique. J. Sericult. Sci. Japan, 50, 180-184.
- SENGUPTA K., M. BAIG, M. V. SAMSON & B. NATARAJ (1993) Immuno-diagnosis of the pebrine disease in silkworm. Sericologia, 33(1) 147-149.
- TATSUKE K. (1971) Ed. Pebrine disease in silkworms, a technical report; Overseas Technical co-operation Agency, Tokyo, Japan.
- WATANABE H. (1987) J. Sericul. Sci. Jpn. 56(5), 431-435.

METHODE DE COLORATION POSITIVE POUR LA DETECTION DES SPORES DE NOSEMA BOMBYCIS CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

N. R. PRASAD, S. T. GOVINDHARAJU & K. S. KESHAWA REDDY

KSSRDI, Thalaghattapura, Kanakapura Road, Bangalore – 560 062, Inde.

*Il faut une méthode efficace, rapide et simple de différenciation des spores de pébrine des spores non pébrine et des artefacts pendant l'examen du papillon mère quand on examine un grand nombre de papillons du ver à soie dans les centres de grainage. Sur le terrain, l'examen des spores de pébrine dans un homogénat de papillon mère sans centrifugation, filtrage et coloration pose le problème de la détection précise des spores de pébrine à cause de la présence d'artefacts et de spores non pébrine. Nous avons mis au point et décrivons une méthode simple de coloration positive, qui différencie les spores de pébrine *Nosema bombycis* des spores non pébrine chez le ver à soie *Bombyx mori* L. La méthode augmente la visibilité des spores pébrine par rapport aux artefacts non pébrine qui ressemblent à des spores grâce à la coloration différentielle. Une coloration au violet de méthylène à un pour-cent après un pré-traitement avec une solution de permanganate de potassium (KMnO₄) à 10 % colore les spores en moins de deux minutes. L'article décrit la méthodologie de coloration, les résultats et ses avantages.*

INTRODUCTION

Nosema bombycis Nageli (Microsporidiés : Nosematidae) infeste le ver à soie *Bombyx mori* L. et provoque la maladie connue sous le nom de pébrine. Une mortalité élevée entraîne des pertes de récolte en cocons dans les pays pratiquant la sériciculture (Barman, 1990 ; Lefroy, 1916 ; Samson et coll., 1990 ; Subba Rao et coll., 1991 ; Tatsuke, 1971). La maladie se propage verticalement de génération en génération par transmission transovarienne chez les œufs et horizontalement dans la population par l'ingestion orale de feuilles contaminées (Pasteur, 1870). Les spores de pébrine libérées dans l'environnement par contamination survivent pendant six à huit mois et gardent une certaine viabilité (Patil et Muniraju, 1991 non publié). La seule méthode adoptée pour lutter contre la maladie est l'examen strict des papillons, la destruction des papillons et de la récolte infestés et une désinfection soigneuse (Ishihara, 1982). La visibilité des spores dans l'homogénat de papillon est donc un stade crucial pour contrôler la contamination primaire et pour fournir des pontes saines aux fermiers.

Sur le terrain, les éleveurs examinent un grand nombre de papillons mères dans un temps donné et la visibilité des spores dans l'homogénat de papillon est affectée par l'interférence de débris de cellules et de tissus, de globules graisseux et d'écailles (Geetha Bai et coll., 1994). Ces difficultés sont plus importantes quand il y a peu de spores chez le papillon. Hazard et Weiser (1968) ont signalé des difficultés dans l'identification précise des microsporidiés à cause du dimorphisme qu'ils présentent. On a pu diagnostiquer *Nosema bombycis* et des espèces étroitement apparentées en utilisant un anticorps sur latex (Grobov et Rodinova, 1985 ; Hayashiya et Ayuzawa, 1987 ; Watanabe, 1987) et une technique d'anticorps fluorescents (Sato et coll., 1981). De plus, on a aussi eu recours à la technique d'anticorps monoclonaux (Kohler et Milstein, 1975) et à l'immunodiagnostic (Senguptha et coll., 1993). Mais ces méthodes ne sont pas pratiquées sur le terrain parce qu'elles sont complexes,

prennent du temps et coûtent cher. De plus, ces méthodes impliquent des compétences techniques particulières qui ne peuvent pas être suivies par un testeur de papillons dans un centre de grainage. Nous avons donc mis au point une méthode de coloration positive pour une visibilité rapide et claire de spores parmi les artefacts qui ressemblent à des spores comme les globules graisseux, les débris et nous présentons ses avantages.

MATERIELS ET METHODES

Des colorants biologiques différents comme le bleu de méthylène, le vert de malachite, le Giemsa, le soudan, le violet de méthylène ont été utilisés pour colorer les spores de pébrine en fonction de la durée et de la spécificité de la coloration. Des suspensions de spores purifiées et impures sont utilisées pour étudier la spécificité de la coloration. Des papillons pébrinisés sont utilisés pour obtenir des spores avec des débris de cellules et de tissus nécessaires à la coloration différentielle.

Infection expérimentale du ver à soie :

Les larves du ver à soie *Bombyx mori* L. sont infestées avec les spores de *Noxema bombycis* le premier jour du cinquième âge en leur donnant des feuilles de mûrier enduites de spores (10^4 spores /ml) et les vers sont élevés jusqu'à ce qu'ils aient filé leur cocon ou meurent à cause de l'infection. Les papillons femelles ayant émergé de leurs cocons (qui sont pébrinisés) sont utilisés pour la préparation de l'homogénat requis pour l'étude.

Préparation de l'homogénat :

L'abdomen du papillon infecté est écrasé avec un pilon et un mortier. Une à deux gouttes de solution d'hydroxyde de potassium à 2 % et une à deux gouttes de carbonate de potassium à 10 % sont ajoutées à l'homogénat, que l'on mélange avec soin et que l'on écrase à nouveau. L'hydroxyde de potassium amollit le tissu en rompant les membranes des cellules et le carbonate de potassium permet de dissoudre et de minimiser les globules graisseux qui interfèrent par rapport à la visibilité des spores (Geetha Bai et coll., 1994).

Méthode de coloration :

Les colorants sélectionnés sont préparés et utilisés d'après les recommandations de Bancraft (1975) : Cantwell (1974) et Pears (1972). Les spores de pébrine sont colorées sous forme purifiée ainsi que les débris de tissu, les globules graisseux et d'autres artefacts de ce type présents dans l'homogénat de papillon mère.

Méthode de coloration positive :

a) Une petite goutte de l'homogénat du papillon est placée à l'extrémité d'une lame et étalée vers l'autre extrémité à l'aide d'une autre micro lame propre.

b) Puis la lame est passée sous la flamme d'une lampe à alcool 2 à 3 fois après avoir séché l'échantillon à l'air.

c) La lame est ensuite pré-traitée en la trempant dans une solution de permanganate de potassium à 20 % pendant 15 secondes, puis lavée sous l'eau du robinet en gardant le côté enduit vers le bas.

d) Deux à trois gouttes de colorant de violet de méthylène à 2 % sont déposées sur la préparation pendant une à une minute et demi, puis le colorant en excès est enlevé et la lame est lavée soit en la trempant dans de l'eau soit en la plaçant sous l'eau du robinet. Le colorant en trop est retiré en le trempant pendant 1 à 2 secondes dans du propanol.

e) La lame est ensuite montée en utilisant immédiatement une lame couvre objet et observée sous le microscope si c'est une lame temporaire. Pour les lames permanentes le DPX est utilisé comme fixateur. Si la lame a besoin d'être observée après plusieurs semaines, les prélèvements sont préparés et fixés à la chaleur avec une flamme et les lames sont stockées jusqu'à l'observation. Pendant qu'on observe les lames stockées, les procédures de coloration de a) à e) sont suivies.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objet de cette étude est de mettre au point une méthode simple et rapide de coloration des spores de pébrine pouvant être utilisée sur le terrain où un grand nombre de papillons femelles sont examinés. Les méthodes de coloration conventionnelles utilisant du Giemsa et d'autres colorants microbiologiques prennent du temps, sont laborieuses et nécessitent des compétences techniques. Quand les spores et les débris de tissus sont colorés en utilisant du violet de méthylène, cela prend 30 minutes avec notre méthode au lieu de 60 minutes avec du Giemsa. Quand les prélèvements fixés à la chaleur sont prétraités avec une solution de permanganate de potassium à 20 %, cette durée de coloration est réduite à une minute et demi sans que cela n'altère la taille et la forme des spores de pébrine (Planche 1a). La méthode permet non seulement de diminuer le temps de coloration, mais différencie aussi les spores de pébrine des débris de tissus, des globules graisseux et d'autres artefacts non pébrine de ce type (Planche 2a). Les spores de pébrine sont violet foncé et le reste du matériel de l'homogénat a des teintes différentes allant de rose à violet. Si les lames sont plongées dans du propanol pour la décoloration, tous les matériels sont décolorés sauf les spores de pébrine (Planche 1b et Planche 2b). Cela est utile pour détecter les spores de pébrine rapidement même par des testeurs de papillons non techniciens et non qualifiés dans le centre de grainage. Geetha Bai et coll., (1994) ont fait part d'une méthode de coloration négative en utilisant de l'encre de Chine comme coloration de fond. De telles colorations de fond comme le nigrosil ou l'encre de Chine permettent une visibilité rapide des spores mais elles ne différencient pas les spores des artefacts ressemblant à des spores comme les globules graisseux, les débris de tissus etc... Les spores fixées dans la position latitudinaire (coupe transversale) ressemblent à des globules graisseux (Planche 1a).

Une erreur pendant l'examen des papillons surtout quand il y a peu de spores entraîne un faux diagnostic de la maladie, la transmission des spores à la génération suivante et de mauvaises récoltes. Dans de telles conditions, il est difficile de préparer des pontes saines sans pébrine sur le terrain. La détection précise des spores est donc une condition nécessaire et la coloration différentielle améliore la visibilité des spores. En plus de ces difficultés, il faut tester un très gros échantillon de papillons pour détecter l'absence ou la présence de spores de pébrine. La méthode de coloration positive mise au point permet donc une visibilité rapide des spores et la différenciation des spores des artefacts ressemblant à des spores. Les spores de pébrine sont inactivées pendant le processus de coloration, ce qui diminue le risque de contamination avec les lames préparées selon cette méthode, elles peuvent être stockées pendant des semaines quand il y a beaucoup de travail.

EFFICACY OF BED DISINFECTANTS AND BOTANICALS AGAINST GRASSERIE DISEASE OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN.

Department of Sericulture, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

Two laboratory experiments were conducted one in summer 1999 and the other in winter 1999 to test the efficacy of *Curcuma longa* L. (Turmeric) powder + Chalk powder (1:5), dust formulations of *Psoralea coryleifolia* L. and *Tribulus terrestris* L. and bleaching powder along with Vijetha against grasserie disease of *Bombyx mori* L. The results showed that application of *C. longa* powder + Chalk powder (1: 5) at a concentration of 1kg/100 disease free layings (DFLs) thrice, once during third, fourth and fifth instars immediately after moulting resulted in a reduction of grasserie by 63.16 and 62.45 per cents when third instar larvae of *B. mori* were fed with mulberry leaves treated with *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) at the dose of 10^7 polyhedral occlusion bodies/ml (POBS/ml). It was on par with Vijetha at 3.0 kg/100 DFLs and *Tribulus terrestris* at 10 g/kg of leaves in reducing the grasserie besides enhancing the larval and cocoon characters.

Keywords *Bombyx mori*, grasserie, botanicals, *C. longa* powder + Chalk powder, economic characters.

INTRODUCTION

The outbreak of diseases and crop failures in silkworm rearing are common under tropical conditions. Among the diseases, grasserie is a serious one caused by nuclear polyhedrosis virus (NPV) which accounts for more than 15 per-cent loss in cocoon yield (Samson, 1992, Sivaprakasam and Rabindra, 1995) in tropical conditions. Disinfectants, antibiotics and botanical extracts were used for managing this disease. In the present study, *Curcuma longa* powder + Chalk powder (1:5) at a concentration of 1kg/100 disease free layings in tropical conditions was tried as a bed disinfectant against grasserie disease along with Vijetha (3.0 kg/100DFLs), bleaching powder (5g/kg of mulberry leaves) and botanicals i.e., *Psoralea coryleifolia* L. and *Tribulus terrestris* L. at a concentration of 10 g/kg of mulberry leaves.

MATERIALS AND METHODS

Two laboratory experiments were conducted one each in summer '99 and winter '99 to study the effect of various bed disinfectants and botanicals against grasserie disease of silkworm cross breed, PM × NB4D2 with five treatments (Tab.1) replicated five times with 100 third instar larvae per replication along with control.

The polyhedral occlusion bodies were extracted from the infected larvae and purified by gradient centrifugation method (Sugumori *et al.* 1990). The number of polyhedra in the obtained virus suspension was counted using a haemocytometer in a phase contrast microscope. Mulberry leaves

were dipped in the virus suspension containing 1×10^7 POBs/ml and fed to the third instar larvae during the second feeding after moulting.

The observations were made on larval weight, larval mortality, cocoon characters, silk filament length and silk filament weight. For the larval weight, 50 matured larvae were taken for every treatment. Similarly, for recording cocoon weight, shell weight, silk filament length and silk filament weight, 50 cocoons were considered for each treatment.

Two hundred and fifty ml of the aqueous extract of the leaves of *P. coryleifolia* and *T. terrestris* were obtained by macerating 50 g of the leaf sample with distilled water. The leaf extracts obtained were mixed with 250 g of sieved soya flour and freeze dried at -40°C using an Edwards Super Moduloy lyophilizer. The dried material was then passed through a centrifugal mill and ground to a very fine powder. *C. longa* powder + chalk powder (1:5 ratio) was obtained by mixing one part of *C. longa* powder and five parts of chalk powder. Vijetha is a disinfectant commonly available for use in the management of silkworm diseases. The *T. terrestris*, *P. coryleifolia* and the bleaching powder were dusted over the mulberry leaves using a muslin cloth and these treated leaves were fed to the larvae immediately after moulting during the first feeding of leaves. Vijetha and *C. longa* powder + chalk powder were dusted over the larvae by using a muslin cloth half an hour before feeding the leaves. All the treatments were given thrice, once during third, fourth, and fifth instars.

RESULTS AND DISCUSSION

SUMMER '99

The results of the laboratory experiment showed that dusting of *C. longa* powder + chalk powder and Vijetha resulted in 63.16 percent reduction in grasserie infection. The larval mortality due to grasserie in *C. longa* powder + Chalk powder (29.75 %) was on par with *T. terrestris* (30.75 %) and *P. coryleifolia* (31.50%) (Tab. I). The treatment of *C. longa* powder + chalk powder was also effective in improving the larval and cocoon characters. (Tab. II).

The highest larval weight of 3.96 g was obtained in *P. coryleifolia* and it was on par with Vijetha which recorded 3.94 g followed by *C. longa* powder + chalk powder and *T. terrestris*. Vijetha and *P. coryleifolia* recorded the highest cocoon weight of 1.48 g which was on par with all the treatments except control. The shell weight was highest in Vijetha (0.23 g) followed by *C. longa* powder + chalk powder, bleaching powder and *P. coryleifolia* which recorded 0.22 g. The treatment, bleaching powder recorded the highest shell ratio of 16.16 per cent followed by *C. longa* + chalk powder (15.77), Vijetha (15.27) and *P. coryleifolia* (14.74). Vijetha, *T. terrestris* and *P. coryleifolia* were equal in effects with regard to silk filament weight and all the treatments were on par with regard to silk filament length. All the treatments recorded significantly lesser grasserie incidence besides improving the larval and cocoon characters compared to control.

WINTER '99

Application of *C. longa* powder + Chalk powder resulted in the highest per-cent reduction of 62.45 compared to all other treatments. Vijetha, *P. coryleifolia* and *T. terrestris* recorded per-cent reduction of 55.70, 51.48 and 53.59 respectively and were found to be equally effective followed by bleaching powder (41.35%). Regarding economic characters, *C. longa* powder + Chalk powder was found to be on par with Vijetha, *T. terrestris* and *P. coryleifolia* with respect to shell ratio and silk filament length while it is equal in its effectiveness with bleaching powder regarding cocoon weight and shell weight (Tab. II).

Pooled analysis of data revealed 62.86 per cent grasserie reduction in *C. longa* Powder + Chalk powder. The mortality was also the lowest (26.00%) in *C. longa* powder + Chalk powder which was on par with Vijetha (28.50%) and *T. terrestris* (29.13%) (Tab. I).

Table 1. Effect of botanicals and bed disinfectants on larval weight and larval mortality due to grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau 1. Effet de produits botaniques et de désinfectants de litière sur le poids larvaire et la mortalité larvaire provoquée par la grasserie chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

Treatments	Dose	Larval weight (g)			Computed mortality due to grasserie (%)			% reduction from control		
Traitements		Poids larvaire (g)			Mortalité calculée due à la grasserie (%)			% de baisse par rapport au témoin		
		S	W	P	S	W	P	S	W	P
Vijetha	3 kg / 100 Dfls 3 kg / 100 pontes saines	3.94 ^a	3.27 ^b	3.61 ^{ab}	29.23 ^d	26.25 ^b	28.50 ^{ab}	63.16	55.70	60.00
Curcuma longa powder + chalk powder (1 : 5) Poudre de Curcuma longa + poudre de chaux (1 : 5)	1 kg / 100 DFls 1 kg / 100 pontes saines	3.86 ^b	3.25 ^b	3.55 ^{bc}	29.75 ^a	22.25 ^a	26.00 ^d	63.16	62.45	62.86
Bleaching powder Chlorure de chaux	5 g / kg of mulberry leaves 5 g / kg de feuilles de mûrier	3.70 ^c	3.21 ^c	3.45 ^d	39.00 ^b	34.75 ^c	36.88 ^c	57.70	41.35	47.31
Dust formulation of <i>Tribulus terrestris</i> Préparation de <i>Tribulus terrestris</i> en poudre	10 g / kg of mulberry leaves 10 g / kg de feuilles de mûrier	3.84 ^b	3.21 ^c	3.53 ^c	30.75 ^a	27.50 ^b	29.12 ^{ab}	61.92	53.59	58.39
Dust formulation of <i>Psoralea coryleifolia</i> Préparation de <i>Psoralea coryleifolia</i> en poudre	10 g / kg of mulberry leaves 10 g / kg de feuilles de mûrier	3.96 ^a	3.36 ^a	3.66 ^a	31.50 ^a	28.75 ^b	30.12 ^b	60.99	51.48	56.96
Control / Témoin	-	3.55 ^d	2.92 ^d	3.24 ^c	80.75 ^c	29.25 ^d	70.00 ^d	-	-	-

S – Summer / Été, W – Winter / Hiver, P – Pooled mean / Moyenne regroupée. Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan Multiple Range Test (DMRT) / Les moyennes suivies par une lettre en commun ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le Test Multiple de Duncan (DMRT).

Table II. Effect of botanicals and bed disinfectants on cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* L.Tableau II. Effet de produits botaniques et de désinfectants de litière sur les caractères du cocon du ver à soie *Bombyx mori* L.

Treatments	Dose	Cocoon weight (g)			Shell weight (g)			Shell ratio (%)			Silk filament Length (m)			Silk filament weight (mg)		
Traitements		Poids du cocon (g)			Poids de la coque (g)			Richesse soyeuse (%)			Longueur du filament de soie (m)			Poids du filament de soie (mg)		
		S	W	P	S	W	P	S	W	P	S	W	P	S	W	P
Vijetha	3 kg / 100 Dfls 3 kg / 100 pontes saines	1.48 ^a	1.63 ^a	1.55 ^a	0.23 ^a	0.24 ^{ab}	0.23 ^a	15.27 ^{ab}	15.00 ^a	15.14 ^{ab}	729 ^a	821 ^a	775 ^{ab}	173 ^a	176 ^a	174 ^a
Curcuma longa powder + chalk powder (1 : 5) Poudre de Curcuma longa + poudre de chaux (1 : 5)	1 kg / 100 Dfls 1 kg / 100 pontes saines	1.40 ^d	1.56 ^b	1.48 ^a	0.22 ^{ab}	0.24 ^b	0.23 ^a	15.77 ^{ab}	15.19 ^a	15.48 ^a	745 ^a	826 ^a	785 ^a	170 ^{bc}	170 ^b	170 ^a
Bleaching powder Chlorure de chaux	5 g / kg of mulberry leaves 5 g / kg de feuilles de mûrier	1.36 ^a	1.54 ^b	1.45 ^{ab}	0.22 ^{ab}	0.24 ^b	0.23 ^a	16.16 ^a	15.36 ^a	15.76 ^a	738 ^a	811 ^b	774 ^b	168 ^c	163 ^c	166 ^b
Dust formulation of <i>Tribulus terrestris</i> Préparation de <i>Tribulus</i> <i>terrestris</i> en poudre	10 g / kg of mulberry leaves 10 g / kg de feuilles de mûrier	1.46 ^a	1.61 ^a	1.54 ^b	0.21 ^b	0.25 ^{ab}	0.23 ^a	14.35 ^b	15.21 ^a	14.78 ^c	717 ^a	824 ^a	770 ^b	172 ^{ab}	177 ^a	175 ^a
Dust formulation of <i>Psoralea corylifolia</i> Préparation de <i>Psoralea</i> <i>corylifolia</i> en poudre	10 g / kg of mulberry leaves 10 g / kg de feuilles de mûrier	1.48 ^a	1.62 ^a	1.55 ^a	0.22 ^{ab}	0.25 ^a	0.23 ^a	17.74 ^{ab}	15.34 ^a	15.04 ^b	730 ^a	821 ^a	775 ^{ab}	174 ^a	180 ^a	177 ^a
Control / Témoin		1.17 ^b	1.41 ^c	1.29 ^c	0.14 ^c	0.20 ^c	0.17 ^b	12.46 ^c	13.80 ^b	13.13 ^d	650 ^b	731 ^c	690 ^c	149 ^d	135 ^d	142 ^c

S – Summer / Été, W – Winter / Hiver, P – Pooled mean / Moyenne regroupée.

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan Multiple Range Test (DMRT) / Les moyennes suivies par une lettre en commun ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le Test Multiple de Duncan (DMRT).

The obtained results are in accordance with the findings of Mallika, (1977) who reported 79.5 percent grasserie reduction due to administration of *P. coryleifolia*. Samuel Manoharraj, (1994) reported a reduction in grasserie incidence to the tune of 72.46 per cent by treating mulberry leaves with 800 ppm leaf extract of *P. coryleifolia*. Sivaprakasam, (1994) reported that the aqueous leaf extract of *P. coryleifolia* at 800 ppm was better than gentamycin (50 ppm) or calcium hydroxide (100 ppm) in reducing the larval mortality due to grasserie.

The highest cocoon weight of 1.55 g was obtained in Vijetha and *T. terrestris* which was on par with all the treatments except bleaching powder which recorded 1.45 g. All the treatments recorded a shell weight of 0.23 g compared to 0.17 g in the control. The shell ratio was highest in bleaching powder (15.76%) and it was on par with *C. longa* powder + Chalk powder (15.48%) and Vijetha (15.14%) followed by *P. coryleifolia* (15.04%). *T. terrestris* recorded a shell ratio of 14.78 percent.

The highest silk filament length of 785 m was obtained in *C. longa* powder + Chalk powder and it was on par with Vijetha and *P. coryleifolia* which recorded 775 m followed by bleaching powder and *T. terrestris* which were on par.

The silk filament weight was the highest (177 mg) in *P. coryleifolia* which was on par with all treatments except bleaching powder which recorded 166 mg and control (142 mg).

The present findings on the efficacy of *P. coryleifolia* and *T. terrestris* in enhancing the economic characters are in confirmation with the findings of Gowda, (1991) who reported that the extracts of *P. coryleifolia* and *T. terrestris* enhanced the economic characters of *B. mori*. The growth promotory effect of the botanicals was also reported by Murugan *et al.* (1998) who observed that the treatment of *B. mori* with botanicals, i.e., *P. coryleifolia* and *T. terrestris* increased the larval weight, silk gland weight, cocoon weight and silk filament length.

Sivaprakasam and Rabindra (1996) reported that aqueous leaf extract of *P. coryleifolia* at a concentration of 800 ppm once during third, fourth and fifth instars of silkworm, *B. mori* L. reduces the grasserie disease besides enhancing the larval and cocoon parameters.

C. longa powder + Chalk powder was equivalent to Vijetha in improving the economic characters and was even more effective compared to *T. terrestris* regarding shell ratio and silk filament length. (Tab. II).

The effectiveness of Vijetha (3 kgs/100DFLs) in reducing the grasserie by 62 per cent and increased cocoon yield of 47.16 kgs/100DFLs compared to 36.40 kgs in control was also reported by Datta *et al.* (1998).

The effectiveness of bleaching powder at 3% concentration containing 0.9 per-cent available chlorine against nuclear polyhedrosis virus resulting in only 14 per cent grasserie mortality compared to 84 per cent in control was also reported. (Balavenkatasubbaiah, 1994).

ACKNOWLEDGEMENT

The financial assistance provided by the Department of Sericulture, Tamilnadu government to Tamilnadu Agricultural University in carrying out this research work is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BALAVENKATASUBBAIAH M, DATTA R.K., BAIG M., NATARAJU, B., IYENGER M.N.S. (1994). Efficacy of bleaching powder as a disinfectant against the pathogens of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 33(1) : 23-26.
- DATTA R. K., BAIG M., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., SELVAKUMAR, T. (1998). Vijetha : An Effective Disinfectant. Indian Silk., 1 : 12-13.
- GOWDA R. (1991). Studies on methods to increase silk yield of *Bombyx mori* Linnaeus (Bombycidae : Lepidoptera). Ph.D. Thesis, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore, India. 242 pp.

- MALLIKA N. (1997). Biodiversity of nuclear polyhedrosis virus of *Bombyx mori* L. and management of grasserie disease . M.Sc.,(Ag).Thesis, Tamilnadu Agricultural University , Coimbatore. India. 76 pp.
- MURUGAN K., JEYABALAN D., SENTHILKUMAR N., SENTHILNATHAN, S ., SIVAPRAKASAM N. (1998). Growth promoting effects of plant products on silkworm- A biotechnological approach. Journal of Scientific and Industrial Research, 57 (11) : 740-745.
- SAMUEL MANOHARRAJ K. (1994). Effect of certain botanicals on the nuclear polyhedrosis virus disease of *Bombyx mori* Linnaeus. M.Sc.,(Sericulture). Thesis, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore. India .62 pp.
- SAMSON M. V. (1992). Silkworm crop protection : Season IV Abstract . National Conference on Mulberry Sericulture Research, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, December 10-11,13 pp.
- SIVAPRAKASAM N. (1994). Seasonal incidence of nuclear polyhedrosis virus disease of silkworm, *Bombyx mori* L. and its management. Ph.D. Thesis . Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore, India. 112 pp
- SIVAPRAKASAM N.,RABINDRA R. J. (1995). Incidence of grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. in selected districts of Tamilnadu, Indian J. of Seric., 34(2) : 100-104
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R. J. (1996). Integrated disease management methods for grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. of Seric., 35(2) : 122-127.
- SUGUMORI H., NAGAMINE T., KOBAYASHI M. (1990). Analysis of structural polypeptides of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) nuclear polyhedrosis virus. Appl. Entomol. Zool., 25(1): 67-77.

EFFICACITE DE DESINFECTANTS DE LITIERE ET DE PRODUITS BOTANIQUE CONTRE LA MALADIE DE LA GRASSERIE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN

Department of Sericulture, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, Inde.

Deux expériences en laboratoire ont été réalisées l'une pendant l'été 1999, l'autre pendant l'hiver 1999 pour tester l'efficacité de la poudre de *Curcuma longa* L. (safran) + de la poudre de chaux (1 : 5, de préparations de *Psoralea coryleifolia* L. et de *Tribulus terrestris* L. en poudre, du chlorure de chaux et de *Vijetha* contre la maladie de la grasserie de *Bombyx mori* L. Les résultats montrent que la triple application de poudre de *C. longa* + poudre de chaux (1 : 5) à une concentration de 1kg / 100 pontes saines (DFI), une fois pendant le troisième, le quatrième et le cinquième âge immédiatement après la mue diminue la grasserie de 63,16 et de 62,45 % quand on nourrit des larves de *B. mori* du 3^{ème} âge avec des feuilles de mûrier traitées avec le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) de *B. mori* à une dose de 10⁷ corps d'occlusion polyhédriques / ml (POBS / ml). Le résultat est le même avec *Vijetha* à raison de 3 kg pour 100 pontes saines et avec *Tribulus terrestris* à raison de 10 g/ kg de feuilles et non seulement ils diminuent la grasserie mais ils améliorent aussi les caractères de la larve et du cocon.

INTRODUCTION

L'éruption de maladies et les échecs de récolte sont courants dans l'élevage du ver à soie sous les tropiques. Parmi ces maladies, la grasserie est une maladie grave provoquée par le virus de la polyédrose nucléaire (NPV) qui est responsable de plus de 15 % des pertes de rendement en cocons (Samson, 1992 ; Sivaprakasam et Rabindra, 1995) sous les tropiques. Des désinfectants, des antibiotiques et des extraits botaniques ont été utilisés pour lutter contre cette maladie. Dans notre étude, nous avons testé la poudre de *Curcuma longa* + de la poudre de chaux (1 : 5) à une concentration de 1kg / 100 pontes saines dans les conditions tropicales comme désinfectant de litière contre la maladie de la grasserie ainsi que le *Vijetha* (3kg / 100 pontes saines), le chlorure de chaux (5g / kg de feuilles de mûrier) et les produits botaniques, *Psoralea coryleifolia* L. et *Tribulus terrestris* L. à une concentration de 10 g / kg de feuilles de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Deux expériences ont été réalisées en laboratoire pendant l'été 1999 et l'hiver 1999 pour étudier l'effet de plusieurs désinfectants de litière et de produits botaniques contre la maladie de la grasserie chez la lignée de ver à soie hybride, PM × NB₄D₂ avec cinq traitements (Tab. I) répétés cinq fois, avec 100 larves du troisième âge par répétition et avec un témoin.

Les corps d'occlusion polyhédriques sont extraits des larves infestées et purifiés par une méthode de centrifugation en gradient (Sugumori et coll., 1990). Le nombre de polyèdres dans la suspension de virus obtenue est compté en utilisant un hémocytomètre sous un microscope à contraste de phase.

Les feuilles de mûrier sont trempées dans la suspension de virus contenant 1×10^7 POBs/ml et données aux larves du 3^{ème} âge pendant le deuxième nourrissage après la mue.

Des observations sont faites sur le poids larvaire, la mortalité larvaire, les caractères des cocons, la longueur du filament de soie et le poids du filament de soie. Pour le poids larvaire, 50 larves matures sont prises pour chaque traitement. De même, pour enregistrer le poids du cocon, le poids de la coque, la longueur du filament de soie et le poids du filament de soie, 50 cocons sont pris en compte pour chaque traitement.

Deux cent cinquante ml d'extrait aqueux de feuilles de *P. coryleifolia* et de *T. terrestris* sont obtenus en faisant macérer 50 g d'échantillons de feuilles avec de l'eau distillée. Les extraits de feuilles obtenus sont mélangés avec 250 g de farine de soja tamisée et lyophilisés à -40°C en utilisant un lyophilisateur Edwards Super Modulyo. Le matériel séché est ensuite passé dans un broyeur à centrifugation et moulu en une poudre très fine. La poudre de *C. longa* + poudre de chaux (ratio 1 :5) est obtenue en mélangeant une part de poudre de *C. longa* et cinq parts de poudre de chaux. Vijetha est un désinfectant couramment utilisé pour lutter contre les maladies du ver à soie. *T. terrestris*, *P. coryleifolia* et le chlorure de chaux sont saupoudrés sur les feuilles de mûrier en utilisant une toile de mousseline et ces feuilles traitées sont données en nourriture aux larves immédiatement après la mue pendant le premier repas des larves. Vijetha et la poudre de *C. longa* + le chlorure de chaux sont saupoudrés sur les larves en utilisant une toile de mousseline une demi heure avant le repas des larves. Tous les traitements sont administrés trois fois, une fois au premier, au quatrième et au cinquième âge.

RESULTATS ET DISCUSSION

ETE 1999 :

Les résultats de l'expérience en laboratoire montrent que le saupoudrage de poudre de *C. longa* + de chlorure de chaux et de Vijetha entraîne une baisse de l'infestation due à la grasserie de 63,16 %. La mortalité larvaire due à la grasserie avec de la poudre de *C. longa* + du chlorure de chaux (29,75 %) est équivalente à celle avec *T. terrestris* (30,75 %) et avec *P. coryleifolia* (31,50%) (Tab. I). Le traitement avec la poudre de *C. longa* + le chlorure de chaux est également efficace pour améliorer les caractères de la larve et du cocon (Tableau II).

Le poids larvaire le plus élevé de 3,96 g est obtenu avec *P. coryleifolia* et il est égal à celui obtenu avec Vijetha (3,94 g), suivi par la poudre de *C. longa* + poudre de chaux et par *T. terrestris*. Vijetha et *P. coryleifolia* donnent le poids du cocon le plus élevé de 1,48 g, qui est le même avec tous les traitements sauf avec le témoin. Le poids de la coque est le plus élevé avec Vijetha (0,23 g), ensuite avec la poudre de *C. longa* + poudre de chaux, puis avec le chlorure de chaux et avec *P. coryleifolia* qui enregistre un poids de 0,22g. Le traitement avec le chlorure de chaux donne la richesse soyeuse la plus élevée de 16,16 pour cent, suivi par *C. longa* + poudre de chaux (15,77), Vijetha (15,27) et *P. coryleifolia* (14,74). Vijetha, *T. terrestris* et *P. coryleifolia* ont le même effet par rapport au poids du filament de soie et tous les traitements sont égaux pour la longueur du filament de soie. Tous les traitements réduisent la grasserie et de plus améliorent les caractères de la larve et du cocon par rapport au témoin.

HIVER 99 :

L'application de poudre de *C. longa* + poudre de chaux donne la diminution la plus élevée en pourcentage (62,45 %) comparée à tous les autres traitements. Vijetha, *P. coryleifolia* et *T. terrestris* enregistrent une réduction en pourcentage de 55,70 ; 51,48 et 53,59 % respectivement et s'avèrent aussi efficaces, suivis par le chlorure de chaux (41,35 %). En ce qui concerne les caractères économiques, la poudre de *C. longa* + la poudre de chaux s'avère être égale à Vijetha, *T. terrestris* et *P. coryleifolia* pour la richesse soyeuse et pour la longueur du filament de soie tandis qu'elle est aussi efficace que le chlorure de chaux pour le poids du cocon et le poids de la coque (Tab. II).

L'analyse regroupée des données révèle une baisse de 62,86 % de la grasserie avec la poudre de *C. longa* + la poudre de chaux. La mortalité est aussi la plus faible (26 %) avec la poudre de *C. longa* + la poudre de chaux et est égale à celle avec Vijetha (28,50 %) et avec *T. terrestris* (29,13 %) (Tab. 1).

Les résultats obtenus sont en accord avec les observations de Mallika, (1977) qui a signalé une baisse de la grasserie de 79,5 % grâce à l'administration de *P. coryleifolia*. Samuel Manoharraj, (1994) a signalé une baisse de l'incidence de la grasserie de 72,46 % en traitant les feuilles de mûrier avec 800 ppm d'extrait de feuille de *P. coryleifolia*. Sivaprakasam (1994) a rapporté que l'extrait aqueux de *P. coryleifolia* à 800 ppm est meilleur que la gentamycine (50 ppm) ou que l'hydroxyde de calcium (100 ppm) pour réduire la mortalité larvaire due à la grasserie.

Le poids du cocon le plus élevé de 1,55 g est obtenu avec Vijetha et *T. terrestris* qui sont équivalents à tous les traitements sauf à la poudre de chaux, qui enregistre 1,45 g. Tous les traitements donnent un poids de coque de 0,23 g contre 0,17 g pour le témoin. La richesse soyeuse est la plus élevée avec le chlorure de chaux (15,76 %) et est équivalente à celle obtenue avec la poudre de *C. longa* + poudre de chaux (15,48 %) et avec Vijetha (15,14 %), suivi par *P. coryleifolia* (15,04 %). Avec *T. terrestris*, on enregistre une richesse soyeuse de 14,78 %.

La longueur du filament de soie la plus élevée (785 m) est obtenue avec la poudre de *C. longa* + poudre de chaux et elle est égale à celle obtenue avec Vijetha et *P. coryleifolia* (775 m), suivis par le chlorure de chaux et *T. terrestris* qui sont égaux.

Le poids du filament de soie est le plus élevé (177 mg) avec *P. coryleifolia*, et est égal à tous les traitements sauf au chlorure de chaux (166 mg) et au témoin (142 mg).

Ces observations sur l'efficacité de *P. coryleifolia* et de *T. terrestris* pour améliorer les caractères économiques confirment les observations de Gowda (1991) qui a rapporté que les extraits de *P. coryleifolia* et de *T. terrestris* améliorent les caractères économiques de *B. mori*. L'effet promoteur de croissance des produits botaniques a aussi été signalé par Murugan et coll., (1998) qui ont observé que le traitement de *B. mori* avec des produits botaniques, c'est à dire avec *P. coryleifolia* et *T. terrestris* augmente le poids larvaire, le poids de la glande séricigène, le poids du cocon et la longueur du filament de soie.

Sivaprakasam et Rabindra (1996) ont rapporté que l'extrait aqueux de la feuille de *P. coryleifolia* à une concentration de 800 ppm administré une fois au troisième, quatrième et cinquième âge chez le ver à soie *B. mori* L. diminue la maladie de la grasserie et améliore en plus les paramètres de la larve et du cocon.

La poudre de *C. longa* + poudre de chaux est équivalente à Vijetha pour améliorer les caractères économiques et est encore plus efficace que *T. terrestris* pour la richesse soyeuse et la longueur du filament de soie (Tableau II).

L'efficacité de Vijetha (3 kg/100 pontes saines) pour diminuer la grasserie de 62 pourcent et augmenter le rendement en cocons à 47,16 kg / 100 pontes saines comparé à 36,40 kg pour le témoin a aussi été signalé par Datta et coll., (1998).

On a aussi rapporté l'efficacité de la poudre de chaux à une concentration de 3 % contenant 0,9 % de chlore contre le virus de la polyédrose nucléaire qui entraîne une mortalité due à la grasserie de seulement 14 % comparé à 84 % pour le témoin (Balavenkatasubbaiah, 1994).

GENETIC VARIABILITY AND SELECTION INDICES FOR ECONOMIC QUANTITATIVE TRAITS OF MULTIVOLTINE MULBERRY SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) GENOTYPES

P. KUMARESAN, R. K. SINHA, N. K. SAHNI & S. SEKAR

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur – 635 109, Tamilnadu, India.

Genetic variability and selection indices for seven economically important quantitative traits of fifty-six multivoltine mulberry silkworm races were estimated. ANOVA showed a highly significant variability for all the six commercial characters under study. High value of GCV% and PCV% along with heritability and genetic advancement for filament length, single-shell weight, and single-cocoon weight showed that the above characters would be highly effective for improvement. The correlation between single-cocoon weight and single-shell weight as well as single-shell weight and shell ratio were found highly significant. The filament length has shown a highly significant and positive correlation with four economic characters. The selection index programme based on the discriminant function analysis resulted into three clusters of ten genotypes with lower index values for utilisation in hybridisation and conventional breeding approaches.

Keywords: Genetic variability, quantitative traits, selection index, multivoltine mulberry silkworm.

INTRODUCTION

In India, a good number of traditional silkworm (*Bombyx mori* L.) races are multivoltine in nature (Datta, 1984). The stock and race differences in various biological characters are considered to be the result of adaptation during long generation (Murakami, 1994). The existence of high genetic variability in economic characters is obviously a resource for breeding (Frankel and Brown, 1983; Frey *et al.*, 1983). Tazima (1958) recommended that the improvement of multivoltine races is only possible through the hybridisation with the exotic races. In India, the tropical sericulture is mainly dependent on multivoltine breeds that are usually low in productivity, hence more stress is given to improve the productivity and quality of these breeds. For such kinds of improvement, the conventional methods of breeding need a perfect selection procedure combined with the selection of desired traits for identifying the initial parental line. The theory of selection indices is helpful for combining various attributes in such a fashion that selection on the basis of the resulting index give the best possible economic gain at the genetic level (Smith, 1936; Hazel and Lush, 1942). Studies on genetic variability namely PCV, GCV, heritability and genetic gain along with the selection indices for selecting the best combiners among the bivoltine breeds has been studied (Kumar *et al.*, 1995) but such kinds of studies are lacking in traditional multivoltine races of mulberry silkworm. Hence the present investigation has been undertaken to study the genetic variability combined with the selection indices of important economic characters of the multivoltine silkworm genotypes for further improvement of yield potential and silk quality.

MATERIALS AND METHODS

Fifty-six multivoltine mulberry silkworm races collected from different regions were used. These races were maintained in the Germplasm Bank of the Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur, Tamilnadu. The experiment was conducted for two seasons (March-April 1999 and October-November 1999) in completely randomised block design with two replications of 350 larvae each and observations were recorded on quantitative traits of commercial value, such as, single cocoon weight (g), single-shell weight (g), shell ratio (%), Yield / 10,000 larvae by weight (kg), pupation rate (%), filament length (m) and denier. The standard rearing techniques as recommended by Krishnaswami (1978) were followed. The yield/10,000 larvae by weight (kg) was calculated by using the following formula:

$$\text{Yield/10,000 larvae by weight (kg)} = \frac{\text{Actual yield by weight (g)}}{\text{No. of larvae retained after III moult}} \times 10$$

The pupation rate (%) was calculated by using the following formula:

$$\text{Pupation rate (\%)} = \frac{\text{Number of live pupae obtained}}{\text{no. of larvae retained after the moult}} \times 100$$

On the seventh day after spinning, the cocoons were harvested from each replication and divided into two parts. From one part, 50 cocoons were randomly selected for the analysis of filament length, denier; and from the other part 100 cocoons were randomly used for sex separation. The cocoon assessment was done with 25 male and 25 female cocoons to determine the average single-cocoon weight, single-shell weight and shell ratio. The data were subjected to analysis of variance; estimation of genotypic and phenotypic coefficient of variation (GCV%, PCV%), heritability (h^2 in broad sense); and genetic advancement was analysed as per Singh and Chaudhary (1985) using the computer packages developed by INDOSTAT Service Pvt. Ltd, Hyderabad, India. The correlation coefficient (Pearson's correlation coefficient) between the traits and selection indices of genotypes were computed in IBM compatible PC/AT computer using the computer packages (Barreto *et al.*, 1991; Barreto and Raun, 1991) developed by the International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT).

The selection index programme was used to value of indices Z by the following formula:

$$\text{Index} = [(Y_j - M_j)^2 * I_j] + [(Y_i - M_i)^2 * I_i + \dots + [(Y_n - M_n)^2 * I_n] / 2$$

Where $Y_j \dots n$ - variable in Z units, $M_j \dots n$ - selection objective, and $I_j \dots n$ - selection intensity for traits $j, i, \dots n$.

$$Z = \frac{Y_j - \bar{Y}}{S}$$

Where Y_j - values for the entry of j , $\bar{Y}$ - mean of all entries, and S - standard deviation from the group mean.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The mean performances of fifty six multivoltine silkworm genotypes for all the seven characters are presented in Table I. The analysis of variance (Table II) showed highly significant variability for all the six commercial characters except pupation rate % under study. The mean, SE, range, phenotypic coefficient of variation (PCV %), genotypic coefficient of variation (GCV %) for all seven attributes together with their heritability (h^2 in broad sense) and genetic advancement at 5% are given in Table III.

Table I. Mean performance of fifty six multivoltine silkworm genotypes.**Tableau I. Performance moyenne de cinquante six génotypes de vers à soie polyvoltins.**

Sl. No.	Genotypes	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Shell ratio (%)	Yield/10 000 larva by wt (kg)	Pupation rate (%)	Filament length (m)	Denier
<i>No. de série</i>		<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Rendement /10 000 larves au poids (kg)</i>	<i>Taux de nymphose (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre</i>
1	C.nichi	0.986	0.112	11.359	8.472	87.353	390.263	1.850
2	Rong Daizo	1.324	0.174	13.142	12.758	78.519	582.357	2.319
3	Guangnong Plain	1.021	0.151	14.789	9.007	83.632	499.725	2.265
4	Raj	1.135	0.165	14.537	9.786	83.243	568.125	1.903
5	GNM	1.000	0.161	16.100	8.924	70.495	695.576	2.232
6	Nistid(y)	1.198	0.149	12.437	9.236	75.528	558.451	2.008
7	Nistid(w)	0.946	0.127	13.425	10.693	88.141	478.638	2.054
8	NK4	1.314	0.188	14.307	9.608	88.145	493.988	2.379
9	Cambodg	1.396	0.214	15.329	10.701	76.068	530.269	1.791
10	Daizo	0.892	0.120	13.453	6.004	62.417	352.847	2.151
11	Pure Mysore	1.141	0.170	14.899	8.425	61.935	360.619	2.168
12	Sarupat	1.086	0.162	14.917	8.529	77.810	662.915	1.766
13	Moria	1.170	0.181	15.470	9.707	74.586	566.269	2.258
14	Tamil Nadu White	1.207	0.191	15.824	10.372	83.720	521.382	2.359
15	Hosa Mysore	1.318	0.219	16.616	11.079	84.518	688.951	2.201
16	Mysore Princess	1.296	0.205	15.818	11.650	80.531	696.263	2.188
17	Kolar Gold	1.379	0.214	15.518	10.251	65.423	704.251	2.045
18	Kollegal Jawan	1.344	0.214	15.923	11.551	80.998	715.050	2.100
19	MY-1	1.360	0.192	14.118	9.229	73.711	625.726	2.360
20	P2DI	1.316	0.192	14.589	11.708	80.701	613.519	2.284
21	OS-616	1.253	0.163	13.009	9.972	84.884	530.551	2.083
22	G	1.196	0.206	17.224	8.843	78.792	594.338	2.231

Table I. (Continued).

Tableau I. (Suite).

Sl. No.	Genotypes	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Shell ratio (%)	Yield/10 000 larva by wt (kg)	Pupation rate (%)	Filament length (m)	Denier
<i>No. de série</i>		<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Rendement /10 000 larves au poids (kg)</i>	<i>Taux de nymphose (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre</i>
23	Nistari	1.163	0.173	14.875	11.000	80.603	445.332	2.207
24	Nistari (M)	1.014	0.146	14.398	8.979	76.948	392.588	2.376
25	Nistari (P)	1.176	0.148	12.585	9.715	80.591	422.832	2.209
26	ZPN(SL)	1.027	0.148	14.411	8.465	75.439	362.813	2.922
27	CB5	1.223	0.182	14.881	8.186	70.060	600.582	2.025
28	KW2	1.077	0.153	14.206	7.958	79.690	548.269	2.239
29	M2	0.998	0.151	15.130	9.515	76.213	570.769	1.889
30	A23	1.164	0.189	16.237	9.222	83.634	496.013	2.445
31	A25	1.369	0.227	16.581	10.951	81.830	660.207	2.033
32	Oval	1.26	0.185	14.671	10.172	77.666	524.588	1.986
33	O	1.288	0.210	16.304	8.936	85.925	673.988	2.304
34	M83(C)	1.133	0.186	16.416	9.200	82.640	539.944	1.976
35	B	1.186	0.191	16.104	9.679	86.380	592.200	1.980
36	A14DY	1.249	0.177	14.171	10.029	76.936	659.138	2.368
37	A4E	1.384	0.243	17.558	10.095	74.743	547.369	2.833
38	PA12	1.248	0.204	16.346	10.214	74.006	692.663	2.001
39	AP12	1.400	0.245	17.500	10.843	69.845	583.819	2.665
40	A13	1.545	0.217	14.045	10.619	74.880	584.551	2.465
41	PMX	1.466	0.229	15.621	12.393	87.644	541.182	2.542
42	PMS2	1.142	0.162	14.186	10.408	79.869	518.907	2.462
43	MU-1	1.364	0.199	14.589	11.322	86.466	585.338	2.387
44	MU-11	1.343	0.215	16.009	9.871	70.477	648.338	2.167

Table I. (Continued).

Tableau I. (Suite).

Sl. No.	Genotypes	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Shell ratio (%)	Yield/10 000 larva by wt (kg)	Pupation rate (%)	Filament length (m)	Denier
<i>No. de série</i>		<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Rendement /10 000 larves au poids (kg)</i>	<i>Taux de nymphe (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre</i>
45	WAI-1	1.429	0.191	13.366	10.293	80.587	516.207	2.651
46	WAI-4	1.190	0.171	14.369	5.629	46.634	453.263	2.313
47	MY23	1.331	0.187	14.049	9.679	74.413	474.132	2.406
48	MW13	1.340	0.196	14.627	10.565	63.967	689.344	2.286
49	MHMP (W)	1.174	0.171	14.565	9.200	71.257	534.544	2.194
50	MHMP(Y)	1.470	0.223	15.170	11.865	83.520	659.363	2.353
51	P4D3	1.325	0.218	16.453	10.824	74.407	586.632	2.202
52	LMP	1.171	0.160	13.663	7.479	69.703	550.182	2.113
53	DMR	1.215	0.179	14.732	8.844	80.878	458.494	2.275
54	LMO	1.192	0.184	15.436	9.594	68.535	536.288	2.286
55	MY1(SL)	1.236	0.198	16.019	8.636	69.570	535.444	2.156
56	PM(SL)	1.381	0.190	13.758	8.172	58.548	589.838	2.535

Filament length showed higher PCV (16.727%) and GCV (15.572%) and maximum heritability (86.67%), followed by denier, single-shell weight and single-cocoon weight. Further these attributes were coupled with higher genetic advancement. This suggests that selection based on above characters will be highly effective for improvement (Narasimharaju *et al.*, 1990), which will also help to give the maximum selection index (Rangaiiah *et al.*, 1995 and Bhargava *et al.*, 1993). The characters like yield/10,000 larvae by weight, pupation rate and shell ratio have recorded less GCV value and heritability under study indicating that the environmental effect was more, in other words the phenotypic effect had got a major role in the expression of those particular traits, as the value of heritability varies depending on the magnitude of all the components of variance, hence the pupation rate showed a non-significant value in the analysis of variance.

Table II. ANOVA for seven commercial traits of multivoltine silkworm genotypes.*Tableau II. Analyse de variance pour sept traits commerciaux chez les génotypes de vers à soie polyvoltins.*

Variables	Treatment	Error
	Traitement	Ecart type
Single cocoon weight (g) / Poids d'un cocon (g)		
MSS	0.041133	0.016226
F-value / valeur F	2.535**	
Single shell weight (g) / Poids d'une coque (g)		
MSS	0.001725	0.000564
F-value / valeur F	3.060**	
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)		
MSS	3.312205	1.412777
F-value / Valeur F	2.344*	
Yield / 10,000 larvae by weight (kg)		
Rendement en poids / 10 000 larves (kg)		
MSS	3.773019	2.385520
F-value	1.582*	
Pupation rate (%) / Taux de nymphose (%)		
MSS	134.029781	103.898393
F-value / valeur F	1.290 NS	
Filament length (m) / Longueur du filament (m)		
MSS	17375.659935	2316.040003
F-value / valeur F	7.502**	
Denier / Titre		
MSS	0.110583	0.024599
F-value / valeur F	4.495**	

DF : Treatment = 55 / DI : Traitement = 55; Error = 55 / Ecart = 55

** Significant at 1% / ** Significatif au seuil de 1 %. * Significant at 5% / * Significatif au seuil de 5 %.

NS = Non significant / Non significatif.

The genetic correlation studies (Table IV) revealed a highly significant positive correlation between single cocoon weight and single shell weight ($r = 0.852$) as well as single shell weight and shell ratio ($r = 0.712$). This finding corroborates the observation made by Jayaswal *et al.*, 1990. The filament length has a highly significant positive correlation with all the four characters except pupation rate and denier. The denier was positively correlated with the single cocoon weight ($r = 0.310$) and the single shell weight ($r = 0.277$), but negatively correlated with the filament length ($r = -0.176$) which suggests that the increase in the filament length may decrease the denier (Lin c-q *et al.*, 1995).

Table III. Genetic variability and heritability of economically important quantitative traits in multivoltine silkworm genotypes.

Tableau III. Variabilité génétique et hérédité de traits quantitatifs économiquement importants chez des génotypes de vers à soie polyvoltins.

Variables	Mean $\pm$ SE	Range	PCV %	GCV %	Heritability % (h^2) in broad sense	Genetic advancement at 5%
	Moyenne $\pm$ Ecart type	Fourchette			% d'hérédité (h^2) au sens large	Avance génétique à 5 %
Single cocoon wt. (g) <i>Poids d'un cocon (g)</i>	1.231 $\pm$ 0.019	(0.892-1.545)	11.659	9.082	60.68	14.574
Single shell wt. (g) <i>Poids d'une coque (g)</i>	0.184 $\pm$ 0.004	(0.112-0.245)	15.961	13.094	67.30	22.128
Shell ratio (%) <i>Richesse soyeuse (%)</i>	15.087 $\pm$ 0.172	(11.503-17.714)	8.529	6.459	57.35	10.077
Yield / 10,000 larvae by wt (kg) <i>Rendement en poids / 10,000 larves (kg)</i>	9.733 $\pm$ 0.184	(5.629-12.758)	14.112	8.558	36.77	10.689
Pupation rate (%) <i>Taux de nymphose (%)</i>	76.708 $\pm$ 1.094	(46.634- 88.145)	10.672	5.060	22.48	4.942
Filament length (m) <i>Longueur du filament (m)</i>	557.236 $\pm$ 12.455	(352.847-715.050)	16.727	15.572	86.67	29.865
Denier / Titre	2.236 $\pm$ 0.031	(1.766-2.922)	10.517	9.272	77.76	16.847

For assigning the selection intensities, it is essential to consider the relative heritability of variables and correlation between them (Tayade, 1987). Since the filament length showed higher heritability and positive correlation with single cocoon weight, single shell weight and shell ratio and also has a major contribution in yield attributes, it is necessary to put greater selection pressure for this trait. Single-cocoon weight and single shell weight also showed higher heritability and higher positive correlation between each other and therefore these attributes should be given a higher weightage in selection program. Since shell ratio and yield/10,000 larvae by weight showed low heritability but had positive correlations with single-cocoon weight, single shell weight and filament length, therefore lower weightage should be given to these traits. The pupation rate was positively correlated only with yield/10,000 larvae by weight and showed low heritability though its relative importance cannot be ignored in view of the economic value in seed preparation and cocoon productivity, so low weightage should be given. The denier showed high heritability and high genetic advancement under study and also the values found to be negatively correlated with filament length

as desired, hence the higher target was not given and kept at the level of population mean value (Table V). Since our aim is to enhance the quality as well as quantity in silk production, it is desirable to obtain breeding values for various economic parameters and manipulate them simultaneously through discriminant function analysis by applying the standard selection parameters (Kumar *et al.*, 1995).

Table IV. Simple correlation coefficient matrix (r) of variables in multivoltine silkworm genotypes.

Tableau IV. Matrice de coefficient de corrélation simple (r) des variables chez des génotypes de vers à soie polyvoltins.

Variables	Single Cocoon) wt. (g)	Single shell wt. (g)	Shell ratio (%)	Yield/ 10 000 larvae by wt. (kg)	Pupation rate (%)	Filament length (m)	Denier
	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Rendement / 10 000 larves en poids (kg)</i>	<i>Taux de nymphe (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre</i>
Single cocoon wt. (g) <i>Poids d'un cocon (g)</i>	-						
Single shell weight (g) <i>Poids d'une coque (g)</i>	0.852 **	-					
Shell ratio (%) <i>Richesse soyeuse (%)</i>	0.246 NS	0.712**	-				
Yield /10,000 larvae by wt (kg) <i>Rendement / 10 000 larves en poids (kg)</i>	0.569**	0.527**	0.222NS	-			
Pupation rate (%) <i>Taux de nymphe (%)</i>	0.006 NS	0.011 NS	0.0002 NS	0.525**	-		
Filament length (m) <i>Longueur du filament (m)</i>	0.488**	0.584**	0.448**	0.435**	0.056NS	-	
Denier / Titre	0.310*	0.277*	0.080 NS	0.103 NS	-0.086NS	-0.176 NS	-

** Significant at 1 % / ** *Significatif à 1 %*. * Significant at 5% / * *Significatif au seuil de 5 %*.
NS = Non significant / *Non significatif*.

Table V. Description of standard selection parameters applied for variables in selection index program of multivoltine silkworm genotypes.

Tableau V. Description des paramètres de sélection standards appliqués aux variables dans un programme d'indice de sélection de génotypes de vers à soie polyvoltins.

Variables	Target <i>Objectif</i>	Intensity <i>Intensité</i>	Desired intensity <i>Intensité désirée</i>
Single cocoon wt. (g) / Poids d'un cocon (g)	2.50	10.00	1.590
Single shell wt. (g) / Poids d'une coque (g)	2.50	10.00	0.258
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	3.00	5.00	18.948
Yield / 10,000 larvae by wt. (kg) / Rendement / 10,000 larves en poids (kg)	3.00	5.00	13.854
Pupation rate (%) / Taux de nymphose (%)	3.00	5.00	101.267
Filament length (m) / Longueur de filament (m)	2.50	10.00	790.258
Denier / Titre	0.00	10.00	2.237

Table VI. Selection indices of selected silkworm races in different clusters and mean performance of seven quantitative traits.

Tableau VI. Indices de sélection de races de vers à soie sélectionnées dans différents groupes et performance moyenne pour sept traits quantitatifs.

Cluster	Index	Genotypes	Single cocoon wt. (g)	Single shell wt (g)	Shell ratio (%)	Yield/ 10 000 larvae by weight (kg)	Pupation rate (%)	Filament length (m)	Denier
Groupe	Indice		Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Rendement / 10 000 larves en poids (kg)	Taux de nymphose (%)	Longueur du filament (m)	Titre
I	11	MHMP (Y)	1.470	0.223	15.170	11.865	83.520	659.363	2.353
	11	Hosa Mysore	1.318	0.219	16.616	11.079	84.518	688.951	2.201
	11	A25	1.369	0.227	16.581	10.951	81.830	660.207	2.033
	11	Kollegal jawan	1.344	0.214	15.923	11.551	80.998	715.050	2.100
II	13	PMX	1.466	0.229	15.621	12.393	87.644	541.182	2.542
	13	Mysore Princess	1.296	0.205	15.818	11.650	80.531	696.263	2.188
III	14	"O"	1.288	0.210	16.304	8.936	85.925	673.988	2.304
	14	P4D3	1.325	0.218	16.453	10.824	74.407	586.632	2.202
	14	AP12	1.400	0.245	17.500	10.843	69.845	583.819	2.665
	14	MU-1	1.364	0.199	14.589	11.322	86.466	585.338	2.387

Table VII. Summary of means for fraction selected out of ten entries.

Tableau VII. Résumé de moyennes pour une fraction sélectionnée sur 10 entrées.

	Averages			
	Population	Selection fraction	Differences (Frac. - Popl.)	Standardized difference
	<i>Moyennes</i>			
	<i>Population</i>	<i>Fraction de sélection</i>	<i>Différences (Frac. - Popl.)</i>	<i>Différence standardisée</i>
Single cocoon wt. (g) / Poids d'un cocon (g)	1.231	1.364	0.133	0.93
Single shell wt (g) / Poids d'une coque (g)	0.184	0.219	0.035	1.18
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	15.087	16.185	1.098	0.85
Yield / 10000 larvae by wt (kg) <i>Rendement / 10 000 larves en poids (kg)</i>	9.733	11.141	1.408	1.03
Pupation rate (%) / Taux de nymphose (%)	76.708	81.568	4.860	0.59
Filament length (m) / Longueur du filament (m)	557.236	639.079	81.843	0.88
Denier / Titre	2.236	2.297	0.061	0.26

The selection index programme for all the selected attributes resulted into 3 clusters of 10 genotypes having good cocoon quality and productivity (Table VI & VII). Cluster I had four genotypes namely, MHMP (Y), Hosa Mysore, A25 and Kollegal jawan with lowest similar index value of 11, cluster II consisted of only two genotypes (PMX and Mysore princess) with similar index value of 13 and cluster III had four genotypes ('O', P4D3, AP12 and MU-1) with similar index value of 14. The genotypes of cluster I and III may be used as good combiners in the hybridisation. Further, the genotypes A25 and "O" race were evolved from the parentage where Nistari was used as one of the parents, it is desirable to obtain good breeding values from these parental lines. The other genotypes i.e. MHMP (Y), Hosa Mysore, P4D3 and AP12 are the evolved races, where Pure Mysore was used as female component. It is also obvious from their rearing performances that those genotypes were well acclimatised and stable to the tropical zone of sericulture and their combination may improve the heterosis values in the conventional breeding program.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr S. B. Dandin, Director, SMGS for encouragement and critical review of the manuscript.

REFERENCES

- BARRETO H. J., BOLANOS J. A., CORDAVA H. S. (1991) Selection index program. In: Software Operation Guide. International Maize and wheat Improvement Centre (CIMMYT) Central America, 1-24.
- BARRETO H. J., RAUN W. R. (1991) MST data assistant. In: Users Guide to Software Operation. International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), Central America, 1-42.
- BHARGAVA S. L., THIAGARAJAN V., RAMESH BABU M., NAGARAJ B. (1993) Heritability of quantitative characters in silkworm *B. mori*. Indian J. Agric. Sci., 63(6), 358-362.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races (*Bombyx mori* L.) in India. Sericologia, 24(3), 393-415.
- FRANKEL O.H., BROWN A. H. D. (1983) A critical appraisal. Proc. XV Intl. Cong. Genet. Applied Genetics., IV, 3-13.
- FREY K. J., COX T. S., RODGERS D. M., COX P. B. (1983) Increasing cereal yield with genes from wild and weedy species. Proc. XV Intl. Cong. Genet. Applied Genetics, IV, 51-68.
- HAZEL L. N., LUSH T. L. (1942) The efficiency of three methods of selection. J. Hered 33, 393-399.
- JAYASWAL K. P., SINGH T., SEN S. K. (1990) Correlation between economic parameters and their application in silkworm breeding. Indian Silk, 29(2), 25-27.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bulletin No. 2 Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore.
- KUMAR P., BHUTIA R., AHSAN M. M. (1995) Estimates of genetic variability for commercial quantitative traits and selection indices in bivoltine races of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) Indian J. Genet. 55 (2), 109-116.
- LIN C-Q, CHEN K-P, WUD-X, WANG P., YAO Q. (1995) The investigation and correlation analysis on cocoon filament size of silkworm variety resources. Canye Kexue, 21(3), 158-162 (c).
- MURAKAMI A. (1994) Growth phenomena in *B. mori* with a special reference to genetic factors responsible for growth acceleration and moultnism. Indian J. Seri. 33(1), 12-14.
- NARASIMHARAJU R., GOVINDAN R., ASHOKA J., RAYAR S. G. (1990) Genetic variability for quantitative traits in silkworm *B. mori*. Entomon., 15(3 & 4), 197-201.
- RANGAIAH S., GOVINDAN R., DEVAIAH M. C., NARAYANASWAMY T. K. (1995) Genetic studies for some quantitative traits on multivoltine races of silkworm Mysore J. Agric. Sci., 29(3), 248-251.
- SINGH R. K., CHAUDHARY B. D. (1985) Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalyani publishers, Ludhiana, 39-53.
- SMITH H. I. (1936) A discriminant function for plant selection. Ann. Eugen., 7, 240-250.
- TAYADE D. S. (1987) Heterosis effect on economic traits of new hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. under Marathwada condition. Sericologia 27, 301-307.
- TAZIMA Y. (1958) Report on sericulture industry in India, Central Silk Board, Bombay-2.

VARIABILITE GENETIQUE ET INDICES DE SELECTION POUR LES CARACTERES QUANTITATIFS ECONOMIQUES DE GENOTYPES POLYVOLTINS DU VER A SOIE DU MURIER (*BOMBYX MORI* L.)

P. KUMARESAN, R. K. SINHA, N. K. SAHNI & S. SEKAR

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur – 635 109, Tamilnadu, Inde.

La variabilité génétique et les indices de sélection pour sept traits quantitatifs économiquement importants de cinquante six races polyvoltines du ver à soie du mûrier ont été estimés. L'analyse de variance montre une variabilité hautement significative pour les six caractères commerciaux étudiés. La valeur élevée de % de GCV (Coefficient de Variation Génotypique) et de % de PCV (Coefficient de Variation Phénotypique) ainsi que de l'héritabilité et du gain génétique pour la longueur du filament, le poids d'une coque et le poids d'un cocon montrent que les caractères ci-dessus pourraient être améliorés efficacement. Les corrélations entre le poids d'un cocon et le poids d'une coque et entre le poids d'une coque et la richesse soyeuse s'avèrent significatives. La longueur du filament montre une corrélation très significative et positive avec quatre caractères économiques. Le programme d'indice de sélection s'appuyant sur l'analyse de fonction discriminante donne trois groupes de dix génotypes avec des valeurs d'indice plus faibles, pouvant être utilisés dans l'hybridation et dans les approches de lignage conventionnelles.

INTRODUCTION

En Inde, un bon nombre de races de vers à soie traditionnelles (*Bombyx mori* L.) sont de nature polyvoltine (Datta, 1984). Les différences entre les souches et les races par rapport à plusieurs caractères biologiques sont considérées comme le résultat de l'adaptation depuis de nombreuses générations (Murakami, 1994). L'existence d'une variabilité génétique élevée pour les caractères économiques est évidemment une ressource pour le lignage (Frankel et Brown, 1983 ; Frey et coll., 1983). Pour Tazima (1958) l'amélioration des races polyvoltines n'est possible que par l'hybridation avec les races exotiques. En Inde, la sériciculture tropicale dépend surtout des lignées polyvoltines qui ont souvent une productivité faible, on accorde donc plus d'importance à l'amélioration de la productivité et de la qualité chez ces lignées. Pour de tels types d'amélioration, les méthodes conventionnelles de lignage ont besoin d'une méthode de sélection parfaite associée à la sélection des traits désirés pour identifier la lignée parentale initiale. La théorie des indices de sélection est utile pour combiner plusieurs attributs de telle manière que la sélection sur la base de l'indice de résultat donne le meilleur gain économique possible au niveau génétique (Smith, 1936 ; Hazel et Lush, 1942). Des études ont été faites sur la variabilité en l'occurrence sur le PCV, le GCV, l'héritabilité et le gain génétique ainsi que sur les indices de sélection pour sélectionner les meilleurs combinateurs parmi les lignées bivoltines (Kumar et coll., 1995) mais de tels types d'études manquent sur les races polyvoltines traditionnelles du ver à soie du mûrier. Cette étude a donc été entreprise pour étudier l'association de la variabilité génétique aux indices de sélection pour les caractères économiques importants chez les génotypes de vers à soie polyvoltins afin d'améliorer encore le rendement et la qualité de la soie.

MATERIELS ET METHODES

Cinquante six races de ver à soie polyvoltin recueillies dans différentes régions ont été utilisées. Ces races sont conservées à la Station des Germoplasmes de Mûriers et à la Banque Génétique du Ver à Soie, de Hosur, au Tamilnadu. L'expérience a été réalisée pendant deux saisons (mars-avril 1999 et octobre-novembre 1999) en échantillonnage complètement aléatoire avec deux répétitions de 350 larves chacune et les observations sur les traits quantitatifs de valeur commerciale, tels que le poids d'un cocon (g), le poids d'une coque (g), la richesse soyeuse (%), le rendement / 10 000 larves en poids (kg), le taux de nymphose (%), la longueur du filament (m) et le titre ont été enregistrées. Les techniques d'élevage standards recommandées par Krishnaswami (1978) ont été suivies. Le rendement / 10 000 larves en poids (kg) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Rendement / 10 000 larves en poids (kg)} = \frac{\text{Rendement réel en poids (g)}}{\text{Nombre de larves retenues après la 3ème mue}} \times 10$$

Le taux de nymphose (%) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de nymphose (\%)} = \frac{\text{Nombre de larves vivantes obtenues}}{\text{Nombre de larves retenues après la mue}} \times 100$$

Le septième jour après le filage, les cocons de chaque répétition sont recueillis et divisés en deux parties. D'un côté, 50 cocons sont sélectionnés au hasard pour l'analyse de la longueur et du titre du filament ; et d'un autre côté, 100 cocons sont utilisés au hasard pour la séparation des sexes. L'évaluation est faite avec 25 cocons mâles et 25 cocons femelles pour déterminer le poids moyen d'un cocon, d'une coque et la richesse soyeuse. Les données sont soumises à l'analyse de variance, à l'estimation du coefficient de variation génotypique et phénotypique (% GCV et % PCV), de l'héritabilité (h^2 au sens large) ; et l'avance génétique est analysée d'après Singh et Chaudhary (1985) en utilisant les programmes informatiques mis au point par INDOSTAT Service Pvt. Ltd., Hyderabad, Inde. Le coefficient de corrélation (coefficient de corrélation de Pearson) entre les caractères et les indices de sélection des génotypes sont calculés avec un ordinateur PC/AT IBM compatible en utilisant les programmes informatiques (Barreto et coll., 1991 ; Barreto et Raun, 1991) mis au point par le Centre International d'Amélioration du Blé et du Maïs (CIMMYT).

Le programme d'indice de sélection est utilisé pour évaluer les indices Z en suivant la formule :

$$\text{Indice} = [(Y_j - M_j)^2 * I_j] + [(Y_i - M_i)^2 * I_i + \dots + [(Y_n - M_n)^2 * I_n] / 2$$

où $Y_j \dots n$ - variable dans les unités Z, $M_j \dots n$ - objectif de sélection et $I_j \dots n$ - intensité de sélection pour les traits j, i, ...n

$$Z = \frac{Y_j - \bar{Y}}{S}$$

où Y_j - valeurs pour l'élément j, $\bar{Y}$ - moyenne de tous les éléments et S - écart type de la moyenne du groupe.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les performances moyennes des cinquante six génotypes polyvoltins de ver à soie pour les sept caractères sont présentées dans le Tableau I. L'analyse de variance (Tableau II) montre une variabilité

très significative pour les six caractères commerciaux sauf pour le taux de nymphose. La moyenne, l'écart type, la fourchette, le coefficient de variation phénotypique (% de PCV), le coefficient de variation génotypique (% GCV) pour les sept caractères et leur héritabilité (h^2 au sens large) et l'avance génétique à 5 % sont présentés dans le Tableau III.

La longueur du filament montre un PCV (16,727 %) et un GCV (15,572 %) plus élevés et une héritabilité maximum (86,67 %), suivie par le titre, le poids de la coque et le poids du cocon. De plus, ces caractères sont associés à une avance génétique supérieure. Cela suggère qu'une sélection s'appuyant sur les caractères ci-dessus serait très efficace pour l'amélioration (Narasimharaju et coll., 1990), ce qui permettrait de donner l'indice de sélection maximum (Rangaiah et coll., 1995 et Bhargava et coll., 1993). Les caractères comme le rendement en poids / 10 000 larves, le taux de nymphose et la richesse soyeuse enregistrent une valeur GCV et une héritabilité inférieures, ce qui indique que l'effet environnemental est plus important, en d'autres mots que l'effet phénotypique a un rôle majeur dans l'expression de ces traits particuliers, puisque la valeur de l'héritabilité varie en fonction de l'importance de tous les composants de variance : le taux de nymphose montre donc une valeur non significative pour l'analyse de variance.

Les études de corrélation génétique (Tableau IV) révèlent une corrélation positive très significative entre le poids d'un cocon et le poids d'une coque ($r = 0,852$) ainsi qu'entre le poids d'une coque et la richesse soyeuse ($r = 0,712$). Cette observation corrobore l'observation faite par Jayaswal et coll., 1990. La longueur du filament donne une corrélation positive très significative avec les quatre caractères sauf avec le taux de nymphose et le titre. Le titre est positivement corrélé avec le poids du cocon ($r = 0,310$) et le poids de la coque ($r = 0,277$) mais négativement corrélé avec la longueur du filament ($r = -0,176$), ce qui suggère que l'augmentation de la longueur du filament pourrait faire baisser le titre (Lin c-q et coll., 1995).

Pour fixer les intensités de sélection, il est essentiel de considérer l'héritabilité relative des variables et la corrélation entre elles (Tayade, 1987). Puisque la longueur du filament montre une héritabilité plus élevée et une corrélation positive avec le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse et a aussi une contribution majeure dans les caractères de rendement, il est nécessaire qu'on accorde plus d'importance à la sélection de ce trait. Le poids d'un cocon et le poids d'une coque montrent aussi une héritabilité plus élevée et une corrélation positive plus élevée entre eux et il faut donc accorder plus d'importance à ces caractères dans un programme de sélection. Comme la richesse soyeuse et le rendement en poids pour 10 000 larves montrent une faible héritabilité mais ont des corrélations positives avec le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la longueur du filament, il faut accorder moins d'importance à ces traits. Le taux de nymphose n'est corrélé positivement qu'avec le rendement / 10 000 larves et montre une faible héritabilité : il faut donc lui accorder peu d'importance, bien que son importance ne peut être ignorée pour la préparation des graines par rapport à la productivité des cocons. Dans l'étude, le titre montre une héritabilité et une avance génétique élevées et les valeurs s'avèrent négativement corrélées avec la longueur du filament : ainsi on ne cherche pas à atteindre l'objectif le plus élevé et on le garde au niveau de la valeur moyenne de la population (Tableau V). Comme notre but est d'améliorer la qualité tout comme la quantité de soie produite, il est désirable d'obtenir des valeurs de lignage pour plusieurs paramètres économiques et de les manipuler simultanément, par l'analyse de la fonction discriminante en appliquant les paramètres de sélection standards (Kumar et coll., 1995).

Le programme d'indice de sélection pour tous les caractères sélectionnés donne 3 groupes de 10 génotypes ayant un cocon de bonne qualité et une bonne productivité (Tableau VI & VII). Le groupe I a quatre génotypes, en l'occurrence, MHMP (Y), Hosa Mysore, A25 et Kollegal jawan avec la valeur d'indice similaire la plus faible de 11, le groupe II n'est constitué que de deux génotypes (PMX et Mysore Princess) avec une valeur d'indice similaire de 13 et le groupe III a quatre génotypes ("O", P4D3, AP12 et MU-1) avec une valeur d'indice similaire de 14. Les génotypes du groupe I et III pourraient être utilisés comme de bons combinants dans l'hybridation. De plus, les génotypes A25 et "O" ont des Nistari comme l'un des parents ; il est donc souhaitable d'obtenir de bonnes valeurs de

lignage à partir de ces lignées parentales. Les autres génotypes, c'est à dire MHMP (Y), Hosa Mysore, P4D3 et AP12 sont des races mises au point avec Pure Mysore comme composant femelle. Il est également évident d'après leurs performances d'élevage que ces génotypes sont bien acclimatés et stables dans la zone séricicole tropicale et que leur combinaison peut améliorer les valeurs d'hétérosis dans un programme de lignage conventionnel.

EFFECT OF NaCl SALINITY ON INTERNAL DISTRIBUTION OF Na^+ , K^+ , Cl^- AND Ca^{2+} IN MULBERRY GENOTYPES

S. SHAIK MOHAMED ANAS* & M. VIVEKANANDAN

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University,
Tiruchirappalli – 620 024, Tamil Nadu, India.

Two mulberry genotypes (Tr4 and Tr10) (*Morus alba* L.) were grown in hydroponic solutions containing different concentrations of NaCl (0, 10, 20 and 30 mM) whose EC values ranged from 0.52 to 4.60 mS/cm with a pH value of 7.0 for critical analysis of early growth and ionic compounds during NaCl salinity. Significant rooting and sprouting performance (100%) was observed in both Tr4 and Tr10 genotypes up to 30 mM NaCl. Ionic compounds were analysed in both the leaves and roots. The concentration of potassium was always higher than that of sodium at any given concentration of NaCl in the leaves of both genotypes particularly in Tr10. Leaf calcium concentration was marginally reduced in both the genotypes. Chloride did not show any significant variation in its level in the leaves of both genotypes. Potassium/sodium (K/Na) ratio decreased at increasing concentrations of NaCl due to continued increase of sodium.

Sodium concentration was found to increase in roots of both genotypes whereas potassium and calcium were drastically reduced at increasing concentrations of NaCl. Na and Cl ions contribute synergistically to salt toxicity but the two genotypes particularly Tr10 in general accumulate more sodium than chloride.

Keywords: Sodium chloride, hydroponics, mulberry, saline tolerance.

INTRODUCTION

Salinity has a major physiological influence in higher plants, whether they are halophytes and non-halophytes. In the latter, the growth rate is generally reduced by salinity even at low salt concentration. The reduction in growth is a consequence of several physiological responses including modifications of ionic balance, water status, mineral nutrition, stomatal behaviour, photosynthetic efficiency, carbon allocation and utilisation (Greenway and Munns, 1980; Munns and Termaat, 1986; Malibari *et al.*, 1993). The ionic effects on plants may be either directly due to excessive accumulation of ions in the tissue causing metabolic disturbances or nutritional imbalance. Inorganic ions also help in conferring salt tolerance through osmoregulation. Plants can tolerate salinity either by exclusion or compartmentation of ions to maintain adequate turgor pressure for growth. The most important inorganic solutes serving as osmotica are K^+ , Cl^- and NO_3^- . One of the mechanisms of salt tolerance in plants is the differential accumulation of ions within different parts of the plant (Greenway and Munns, 1980). This phenomenon, called ion partitioning has been observed in rice seeds (Peiris *et al.*, 1988) and barley shoots (Wolf *et al.*, 1991). The ability to partition excess ions away from physiologically active parts of a plant acts as a survival technique for plants grown in saline habitats (Peiris *et al.*, 1994).

* Corresponding author.

Mulberry is an important and popular cash crop in Tamil Nadu, India and also a vital component of sericulture (rearing of silkworms), which has become a well-established agro-based low investment in cottage industry with high returns. Therefore, sericulture is regarded as one of the important tools that the country has at its command to combat poverty, both in the rural and urban sectors. Mulberry leaves offer a quicker cash crop, yielding income once in 75 to 90 days. It is widely advocated for extensive cultivation in Tamil Nadu to boost silk production. The salinity problems are generally most pronounced in mulberry gardens in tropical and sub-tropical regions because there is insufficient rainfall to flush out accumulated salt from the root zone. In general, mulberry does not grow well under rainfed conditions (Susheelamma, 1990; Dorcus and Vivekanandan, 1991) or salinity (Bose, 1991; Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan, 1994). Therefore, the present study was undertaken with two promising mulberry genotypes (Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan, 1994; Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan, 1999). Tr4 and Tr10 were grown hydroponically at different concentrations of NaCl (0, 10, 20 and 30 mM) to investigate early growth analysis and the absorption and translocation of Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{2+} , in order to assess their inherent potential for growth in saline soil.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted during 1995-96 in the laboratory of Biotechnology, School of Life Sciences (Sericulture), Bharathidasan University, Tiruchirapalli, Tamil Nadu, India. Cuttings of two mulberry genotypes (Tr4 and Tr10) collected from the mulberry garden of the Bharathidasan University of 15cm length with 4 to 5 live buds (Krishnaswamy, 1978) were planted in plastic culture trays (45×30×9 cm). Twenty-five cuttings are inserted in a plastic culture tray covered with perforated thermacole sheet for each concentration of NaCl treatment. The basal cut end of the cuttings was dipped into the experimental solution. Three separate culture trays having 25 cuttings were used for each concentration of NaCl treatment for replication. The standard culture solution was prepared following the method of Hewitt (1966). NaCl was added immediately to give final concentrations of 10, 20 and 30mM and solution pH was adjusted to 7.0 with 0.1N NaOH. Electrical conductivity of the solutions was 2.70, 3.90 and 4.60 mS/cm respectively. The base nutrient solution served as the control (0.52 mS/cm). The culture solution was changed at 3-day intervals. The cuttings were raised in laboratory under natural white light intensity up to $600 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a temperature at $30 \pm 1^\circ \text{C}$ and a relative humidity of about $60 \pm 5\%$. Thirty-five days old saplings were used for analysis of early growth parameters such as shoot and root length, number of leaves and roots, leaf area and fresh and dry shoot and root biomass followed by the standard methods. Na, K and Ca were analysed in both leaves and roots of saplings by flame photometry. Freshly harvested leaves and roots of 35-day-old saplings were washed with distilled water and the leaf/root tissue was oven dried and ground to a fine powder form. 500 mg of powdered plant material digested with triple acid mixture ($\text{HNO}_3\text{:HClO}_4\text{:HCl}$) was used for elemental analysis by digital flame photometry. Chloride was estimated by the method of Krishnamurthy and Bhagwat (1990). The data collected during the period of this study were subjected to statistical analysis (Standard Deviation, Standard Error) by adopting standard procedures described by Zar (1974).

RESULTS AND DISCUSSION

Since the root is the immediate organ directly exposed to salinity, the rooting percentage of Tr4 and Tr10 mulberry genotypes was investigated first. Development of new shoots was then recorded. Both rooting and sprouting were not affected by salinity up to 30 mM NaCl.

Table I. Effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on early growth parameters of Tr4 mulberry genotype. The saplings were grown in different strength of NaCl in hydroponics at a pH of 7.0 at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. Growth parameters of 35 days old saplings were analysed. The data are the mean of three different experiments with $\pm$ SD. Data in parenthesis indicate % control values.

Tableau I. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les paramètres de croissance précoce du génotype de mûrier Tr4. Les plants sont cultivés dans différentes concentrations de NaCl dans des cultures hydroponiques au pH de 7, à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les paramètres de croissance de plantules de 35 jours sont analysés. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec les écarts types. Les données entre parenthèses indiquent le pourcentage par rapport au témoin.

Growth parameters	NaCl concentrations (mM)					
Paramètres de croissance	Concentrations en NaCl (mM)					
	0	10	20	30	SDm	SEm
Rooting % / % de racinement	100	100	100	100		
Sprouting % / % de débourrement	100	100	100	100		
Average number of roots / sapling Nombre moyen de racines / plant	17.2 $\pm$ 2.1	19.0 $\pm$ 1.9 (112.00)	16.0 $\pm$ 1.2 (94.12)	14.0 $\pm$ 1.1 (82.35)	1.48	0.42
Average number of leaves/sapling Nombre moyen de feuilles / plant	16.0 $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 1.0 (75.00)	10.1 $\pm$ 1.0 (63.12)	10.0 $\pm$ 1.0 (62.50)	1.02	0.30
Average leaf area / sapling (cm^2) Surface foliaire moyenne / plant (cm^2)	21.2 $\pm$ 1.7	18.5 $\pm$ 1.0 (87.26)	14.5 $\pm$ 1.1 (68.47)	7.5 $\pm$ 0.5 (35.38)	0.96	0.30
Shoot length (cm) Longueur d'une pousse (cm)	19.0 $\pm$ 2.0	15.9 $\pm$ 1.9 (84.00)	13.8 $\pm$ 1.3 (72.63)	10.4 $\pm$ 1.0 (54.74)	1.40	0.41
Root length (cm) Longueur de la racine (cm)	19.6 $\pm$ 2.4	17.9 $\pm$ 2.0 (91.00)	16.4 $\pm$ 2.1 (83.67)	15.3 $\pm$ 1.2 (78.06)	1.80	0.31
Root / shoot ratio / Ratio racine / pousse	1.03	1.12	1.19	1.47		
Average fresh biomass of shoot (mg) Biomasse fraîche moyenne d'une pousse (mg)	4550 $\pm$ 20.2	3500 $\pm$ 20.8 (76.92)	2875 $\pm$ 20.4 (63.19)	2600 $\pm$ 16.1 (57.14)	18.70	5.9
Average fresh biomass of root (mg) Biomasse fraîche moyenne de la racine (mg)	1970 $\pm$ 4.1	1850 $\pm$ 2.0 (93.91)	1800 $\pm$ 2.0 (91.37)	1770 $\pm$ 3.2 (89.85)	2.60	0.73
Average dry biomass of shoot (mg) Biomasse sèche moyenne d'une pousse (mg)	800 $\pm$ 7.0	640 $\pm$ 8.9 (80.00)	490 $\pm$ 7.8 (61.25)	490 $\pm$ 7.0 (61.25)	7.30	2.00
Average dry biomass of root (mg) Biomasse sèche moyenne de la racine (mg)	100 $\pm$ 4.3	90 $\pm$ 4.1 (90.00)	90 $\pm$ 3.6 (90.00)	70 $\pm$ 3.1 (70.00)	3.42	0.94
Root/shoot ratio / Ratio racine / pousse	0.11	0.16	0.18	0.14		

Table II. Effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on early growth parameters of Tr10 mulberry genotype. The saplings were grown in different strength of NaCl in hydroponics at a pH of 7.0 at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. Growth parameters of 35 days old saplings were analysed. The data are the mean of three different experiments with $\pm$ SD. Data in parenthesis indicate % control values.

Tableau II. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les paramètres de croissance précoce du génotype de mûrier Tr10. Les plants sont cultivés dans différentes concentrations de NaCl dans des cultures hydroponiques au pH de 7, à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les paramètres de croissance de plants de 35 jours sont analysés. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec les écarts types. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport au témoin.

Growth parameters	NaCl concentrations (mM)					
Paramètres de croissance	Concentrations en NaCl (mM)					
	0	10	20	30	SDm	SEm
Rooting % / % de racinement	100	100	100	100		
Sprouting % / % de débourrement	100	100	100	100		
Average number of roots / sapling <i>Nombre moyen de racines / plant</i>	16.0 $\pm$ 2.0	17.0 $\pm$ 1.7 (106.25)	12.0 $\pm$ 1.0 (75.00)	10.0 $\pm$ 1.0 (62.50)	1.36	0.30
Average number of leaves/sapling <i>Nombre moyen de feuilles / plant</i>	12.0 $\pm$ 1.0	12.0 $\pm$ 0.9 (100.00)	10.1 $\pm$ 0.9 (84.17)	9.0 $\pm$ 0.5 (75.00)	0.76	0.12
Average leaf area / sapling (cm ²) <i>Surface foliaire moyenne / plant (cm²)</i>	20.2 $\pm$ 2.5	17.6 $\pm$ 2.0 (87.13)	12.6 $\pm$ 1.3 (62.38)	12.0 $\pm$ 1.1 (59.40)	1.48	0.39
Shoot length (cm) <i>Longueur d'une pousse (cm)</i>	16.3 $\pm$ 2.0	15.1 $\pm$ 1.7 (92.64)	13.1 $\pm$ 1.5 (80.37)	10.9 $\pm$ 0.9 (66.87)	1.24	0.31
Root length (cm) <i>Longueur de la racine (cm)</i>	16.4 $\pm$ 2.0	18.5 $\pm$ 2.1 (112.80)	14.5 $\pm$ 1.4 (88.41)	13.5 $\pm$ 1.1 (82.32)	1.52	0.38
Root / shoot ratio / Ratio racine / pousse	1.01	1.22	1.24	1.24		
Average fresh biomass of shoot (mg) <i>Biomasse fraîche moyenne d'une pousse (mg)</i>	3800 $\pm$ 20.5	2835 $\pm$ 21.0 (74.60)	2150 $\pm$ 20.7 (56.58)	1700 $\pm$ 16.8 (42.74)	17.90	4.97
Average fresh biomass of root (mg) <i>Biomasse fraîche moyenne de la racine (mg)</i>	1300 $\pm$ 4.0	1185 $\pm$ 4.1 (91.15)	1100 $\pm$ 3.2 (84.61)	1000 $\pm$ 3.5 (76.92)	3.60	0.98
Average dry biomass of shoot (mg) <i>Biomasse sèche moyenne d'une pousse (mg)</i>	520 $\pm$ 7.6	500 $\pm$ 8.9 (96.15)	470 $\pm$ 9.7 (90.38)	300 $\pm$ 7.1 (57.69)	7.86	1.62
Average dry biomass of root (mg) <i>Biomasse sèche moyenne de la racine (mg)</i>	90 $\pm$ 4.00	90 $\pm$ 3.2 (90.00)	90 $\pm$ 4.1 (90.00)	70 $\pm$ 3.5 (70.00)	3.24	0.98
Root/shoot ratio / Ratio racine / pousse	0.17	0.18	0.19	0.23		

Table III. Effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on sodium, potassium, calcium and chloride contents in the leaves of two mulberry genotypes. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 35 day old saplings were used for analysis. The data are the mean of three different experiments with $\pm$ SD. Data in parenthesis indicate % control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw.

Tableau III. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les teneurs en sodium, potassium, calcium et chlorure des feuilles de deux génotypes de mûrier. Les plants sont cultivés dans une culture hydroponique à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Des plants de 35 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données sont les moyennes de trois expériences différentes avec les écarts types. Les données entre parenthèses indiquent les valeurs en % du témoin. Les données sont exprimées en mg g^{-1} poids sec.

Elements	NaCl Concentrations (mM) / Concentrations en NaCl (mM)							
	0		10		20		30	
	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10
Na	0.52 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.88 ± 0.04 (169.23)	0.80 ± 0.01 (142.86)	0.90 ± 0.05 (173.08)	1.00 ± 0.02 (158.57)	0.94 ± 0.05 (180.77)	1.32 ± 0.02 (235.71)
K	3.14 ± 0.17	2.72 ± 0.15	3.28 ± 0.16 (104.46)	2.82 ± 0.14 (103.68)	3.30 ± 0.17 (105.09)	2.98 ± 0.10 (109.56)	3.42 ± 0.20 (108.92)	3.36 ± 0.19 (123.53)
Cl	1.28 ± 0.11	1.22 ± 0.11	1.20 ± 0.11 (93.75)	1.20 ± 0.11 (98.36)	1.14 ± 0.10 (89.06)	1.14 ± 0.10 (93.44)	1.12 ± 0.10 (87.50)	1.12 ± 0.10 (91.80)
Ca	0.62 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.42 ± 0.01 (67.44)	0.48 ± 0.01 (88.89)	0.39 ± 0.01 (62.90)	0.47 ± 0.01 (87.03)	0.38 ± 0.01 (61.29)	0.46 ± 0.01 (85.18)
K/Na	6.04 ± 0.34	4.86 ± 0.20	3.72 ± 0.21 (61.59)	3.52 ± 0.19 (72.43)	3.67 ± 0.20 (60.76)	2.98 ± 0.11 (61.32)	3.64 ± 0.21 (60.26)	2.54 ± 0.1 (52.26)
SDm	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.08	0.07
SEm	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02

In quantitative parameters such as average number of roots, leaves, branches, leaf area and shoot and root length, gradual reduction was observed at increasing concentrations of salinity in both genotypes (Tables I & II) whereas in other genotypes (Mysore Local, Kosen, MR2, M5, CR259) severe reduction was observed in the previous study made by Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan (1994). In other comparative parameters, like root/shoot ratio and fresh and dry biomass of shoot and root, a gradual decrease was observed at increasing concentrations of the salt treatment. The present observations are supported by salinity-induced growth reductions observed in *Vicia faba* (shoot growth reduction) (Sharma, 1995), *Lycopersicon esculentum* (root growth reduction) (Snapp and Shennan, 1992), *Cucumis melo* (leaf area reduction) (Franco *et al.*, 1993) and *Eruca sativa* (biomass reduction) (Ashraf, 1994). This reduction in growth could be attributed to (a) an osmotic stress due to a lowering of the external water potential or (b) effects of specific ions on metabolic processes ranging from the absorption of nutrients to enzyme activation or inhibition (Greenway and Munns, 1980; Epstein, 1983).

Table IV. Effect of NaCl salinity (0 to 30mM) on sodium, potassium, calcium and chloride contents in the roots of two mulberry genotypes. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 35 day old saplings were used for analysis. The data are the mean of three different experiments with $\pm$ SD. Data in parenthesis indicates % control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw.

Tableau IV. Effet de la salinité NaCl (0 à 30mM) sur les teneurs en sodium, potassium, calcium et chlorure dans les racines de deux génotypes de mûrier. Les plants sont cultivés dans un milieu hydroponique à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plants de 35 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec l'écart type. Les données entre parenthèses indiquent les valeurs en % du témoin. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} poids sec.

Elements	NaCl Concentrations (mM) / Concentrations NaCl (mM)							
	0		10		20		30	
	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10	Tr4	Tr10
Na	0.74 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.12 (172.97)	1.06 $\pm$ 0.03 (135.90)	1.92 $\pm$ 0.11 (259.46)	1.57 $\pm$ 0.04 (201.28)	2.16 $\pm$ 0.15 (291.89)	1.68 $\pm$ 0.04 (215.38)
K	2.08 $\pm$ 0.12	2.30 $\pm$ 0.12	1.16 $\pm$ 0.10 (55.77)	0.80 $\pm$ 0.02 (34.78)	1.04 $\pm$ 0.05 (50.00)	0.71 $\pm$ 0.02 (30.87)	1.02 $\pm$ 0.05 (49.04)	0.68 $\pm$ 0.01 (29.56)
Cl	0.41 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01 (114.63)	0.41 $\pm$ 0.01 (95.35)	0.48 $\pm$ 0.01 (117.07)	0.39 $\pm$ 0.01 (90.70)	0.49 $\pm$ 0.01 (119.51)	0.37 $\pm$ 0.01 (86.04)
Ca	0.38 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01 (84.21)	0.28 $\pm$ 0.01 (87.50)	0.21 $\pm$ 0.01 (55.26)	0.26 $\pm$ 0.01 (81.25)	0.18 $\pm$ 0.01 (47.37)	0.24 $\pm$ 0.01 (75.00)
K/Na	2.81 $\pm$ 0.13	2.95 $\pm$ 0.17	0.90 $\pm$ 0.05 (61.59)	0.75 $\pm$ 0.03 (72.43)	0.54 $\pm$ 0.03 (60.76)	0.45 $\pm$ 0.01 (61.32)	0.47 $\pm$ 0.02 (60.26)	0.40 $\pm$ 0.01 (52.26)
SDm	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.04	0.06	0.07
SEm	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02

The ability of the genotypes to absorb elements like Na and Cl was studied in relation to Ca and K and the results are presented in Tables III & IV. Na absorption was higher in both the genotypes at increasing concentrations of NaCl (Table III). In Tr10, K absorption was found to increase marginally at increasing concentrations of salinity. The concentration of K was always higher than that of Na at any given concentration of NaCl. Patil *et al.*, (1989) observed that the safflower, genotype 19-185 contained less Na and more K in leaves indicating greater tolerance to salinity. Ca concentration was marginally reduced in both the genotypes as the concentration of NaCl increased in the medium. Increasing salinity levels were associated with reductions in the Ca content of shoots of field-grown barley (Lynch and Lauchli, 1985). They concluded that NaCl inhibits Ca transport from root to shoot and also that the reduction in the total Ca contents of the root tissue reflects a displacement of Ca by Na from apoplastic cation exchange sites. Quite unexpectedly, Cl did not show any significant variation in its level in both genotypes. Bigot and Binet (1987) observed that cations were not affected by salinity in *Phaseolus vulgaris*. The leaf K/Na ratio decreased at increasing concentrations of NaCl due to continued increase of Na in Tr10 compared to Tr4 (Table III). The K/Na ratio indicated

preferential accumulation of K over Na in spite of Na being higher in concentration in the external medium. Low K/Na ratio and high levels of chlorophyll pigments in rice provide useful indicators for identifying saline tolerant lines (Baset and Jahanara Arju, 1989) during any routine screening procedure supports also the present findings of low K/Na ratio in leaves of both genotypes specifically in Tr10.

As found in leaf, Na was also found to be accumulating in roots, at all levels of NaCl concentration. On the other hand, K absorption was drastically reduced (Table IV). Cl concentration was found to be rather unaffected, whereas that of calcium was found to be reduced. In view of increasing concentration of sodium and decreasing concentration of potassium, the K/Na ratio was drastically reduced in the root. However, in the leaf, as already mentioned, K level remained unaffected or was marginally increased (Table IV). In fact, in the leaves, potassium concentration was found to be much higher. Similarly in roots Na concentration was higher, it possibly suggesting that K absorption and its further translocation into the leaves by the roots remained unaffected by salinity. Thus Na accumulation in the leaves did not impinge on potassium absorption and accumulation. In the roots, Na concentration was much higher than K. The latter observation is supported by the findings of Siddique *et al.* (1983), who observed that accumulation of sodium with increasing salinity results in a decrease of potassium in pea roots. This is also supported by the findings of Kalir and Poljakoff-Mayber (1981) who observed more sodium and less potassium in the roots of *Halimone portulacoides* at increasing NaCl concentrations which may portend the saline tolerance nature of these two mulberry genotypes. Further the observation of higher levels of potassium in leaves than in roots is supported by the observation of Weinburg *et al.*, (1984) in that *Sorghum bicolor* had accumulated sodium as a predominant cation in roots, whereas potassium was always higher than sodium levels in leaves under saline conditions. Sodium and chloride ions contribute synergistically to salt toxicity but the two genotypes examined in general accumulate more sodium than chloride. The present observation may also be taken as an indication of differential accumulation of ions in different parts of the plant, namely root and shoot, as considered as one of the adaptations for salt tolerance in plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance provided by the Central Silk Board, Government of India, Bangalore in carrying out the work is gratefully acknowledged

REFERENCES

- ASHRAF M. (1994) Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. *Biologia Plantarum*, 36(2), 255-259.
- BASET Q. A., JAHANARA ARJU (1989) Variations in concentrations of potassium, sodium and chlorophyll pigments in leaf segments of two rice varieties differing in sensitive to salinity. *Indian J. Plant Physiol.*, 32(2), 99-104.
- BIGOT J., BINET P. (1987) Study on the cation exchange capacity and selectivity of isolated root cell walls of *Cochlearia arglica* and *Phaseolus vulgaris* grown on media of different salinities. *Crop Physiol.*, 14, 120.
- BOSE P. C. (1991) The saline soils of tropical mulberry garden. *Indian Silk*, 30(7), 43-45.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. (1991) Screening of mulberry varieties for rainfed conditions. *Sericologia*, 31(1), 233-241.
- EPSTEIN E. (1983) Crops tolerant of salinity and other mineral stresses. P. 61-82. In *Better crops for food*. Ciba Symposium No. 97, Pitman Books, London.
- FRANCO J. A., ESTEBER C., RIDRIGUEZ C. (1993) Effects of salinity on various growth stages of muskmelon cv. Revigal. *J. Hort Sci.*, 68(6), 899-904.

- GREENWAY H., MUNNS R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 149-190.
- HEWITT E. J. (1966) The composition of the nutrient solution p.1990. In *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal Bucks, England.
- KALIR A., POLJAKOFF-MAYBER A. (1981) Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) Allen exposed to high sodium chloride concentrations. *Ann Bot.*, 47, 75-85.
- KRISHNAMURTHY R., BHAGWAT K. A. (1990) A rapid and simplified method for determination of chloride in plant material. *Exp Bio.*, 28, 198-200.
- KRISHNASWAMY S. (1978) Mulberry cultivation in South India. CSR & TI Bulletin No. 1, Mysore, India.
- LYNCH J., LAUCHLI A. (1985) Salt stress disturbs the calcium nutrition in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.*, 99, 345-354.
- MALIBARI A.A., ZIDAN M.A., HEIKAL M.M., EL-SHAMARY S. (1993) Effect of salinity on some crop plants. I. Germination and growth. *Pakistan J. Botany.*, 25(2), 156-160.
- MUNNS R., TERMAAT A. (1986) Whole plant responses to salinity. *Aust J. Plant Physiol.*, 13, 143-160.
- PATIL P. K., GURURAJA RAO M. R., RAMAKRISHNA PARAMA U. R., VISWANATH D. P. (1989) Relative tolerance of safflower genotypes based on yield, sodium, potassium and calcium contents. *Indian J. Plant Physiol.*, 32(1), 90-94.
- PEIRIS B. D., SIEGEL S. M., SENADHIRA D. (1988) Chemical characteristics of grains of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in saline media of varying ionic composition. *J. Exp. Bot.*, 39, 623-631.
- PEIRIS B. D., WANIGASURIYA S. C., FERNANDO M. H. S. (1994) The role of leaf in partitioning of sodium and chloride ions in NaCl treated rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Indian J. Plant Physiol.*, 37(1), 35-36.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., VIVEKANANDAN M. (1991) Are triploid mulberry varieties saline tolerant? National Conference on Mulberry Sericulture Research, CSR & TI, Mysore, December 10-11.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., VIVEKANANDAN M. (1994) Evaluation of saline tolerance in mulberry varieties by exploiting rooting potential. *Sericologia*, 34(2), 311-321.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., VIVEKANANDAN M. (1994b) Salinity responses of the triploid mulberry varieties. *Indian Journal of Sericulture*, 33(1), 92-94.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., VIVEKANANDAN M. (1999) Accumulation of certain organic metabolites in different mulberry genotypes during NaCl salinity. *Sericologia*, 39(3), 444-449.
- SHARMA S. K. (1995) Effects of salinity on growth performance and internal distribution of Na^+ , K^+ and Cl^- in *Vicia faba* L. *Indian J. Plant Physiol.*, 38(1), 69-72.
- SIDDIQUE S., KUMAR D., SINGH M. P., KUMAR S. (1983) Salinization and desalinisation impacts on certain mineral contents in plant organs of "Bonneville" pea. *Transactions of Indian Society of Desert Technology and University Centre of Desert Studies*, 8, 118-122.
- SNAPP S. S., SHENNAN C., (1992) Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill., *New Phytol.*, 121, 71-79.
- SUSHEELAMMA B. N., JOLLY M. S., GIRIDHAR K., SENGUPTA K. (1990) Evaluation of germplasm genotypes for drought resistance in mulberry. *Sericologia*, 30(3), 327-341.
- WEIMBURG R., LERNER H. R., POLJAKOFF-MAYBER A. (1984) Changes in growth and water soluble solute concentration in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. *Physiol Plant*, 62, 472-480.
- WOLF O., MUNNS R. A., TONET M. L., JESCHKE W. D. (1991) The role of the stem in the partitioning of sodium and potassium in salt treated barley. *J. Exp. Bot.*, 42, 697-704.
- ZAR G. A. (1974) *Biostatistical Analysis*, Printice Hall Ltd, India.

EFFET DE LA SALINITE EN NaCl SUR LA DISTRIBUTION INTERNE DE Na⁺, K⁺, Cl⁻ ET DE Ca²⁺ CHEZ DES GENOTYPES DE MURIER

S. SHAIK MOHAMED ANAS* & M. VIVEKANANDAN

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University,
Tiruchirappalli – 620 024, Tamil Nadu, Inde.

*Deux génotypes de mûrier (Tr4 et Tr10) (**Morus alba** L.) ont été cultivés dans des solutions hydroponiques contenant différentes concentrations de NaCl (0, 10, 20 et 30 mM), avec des valeurs de CE comprises entre 0,52 et 4,60 mS/cm et un pH de 7, afin d'analyser de manière critique la croissance précoce et les composés ioniques lors d'une salinité NaCl. On observe un racinement et un débourrement significatifs (100 %) à la fois chez les génotypes Tr4 et Tr10 jusqu'à 30 mM de NaCl. Les composés ioniques sont analysés à la fois dans les feuilles et les racines. La concentration en potassium est toujours plus élevée que celle en sodium à n'importe quelle concentration en NaCl dans les feuilles chez les deux génotypes particulièrement chez Tr10. La concentration en calcium de la feuille baisse de manière marginale chez les deux génotypes. Le niveau de chlorure dans les feuilles ne montre pas de variation significative chez les deux génotypes. Le ratio potassium / sodium (K/Na) baisse à des concentrations plus élevées de NaCl à cause de l'augmentation continue en sodium.*

On observe que la concentration en sodium augmente dans les racines chez les deux génotypes tandis que le potassium et le calcium baissent énormément quand les concentrations de NaCl augmentent. Les ions Na et Cl contribuent de manière synergique à la toxicité saline mais les deux génotypes, en particulier Tr10, accumulent en général plus de sodium que de chlore.

INTRODUCTION

La salinité a une influence physiologique majeure sur les plantes supérieures, qu'elles soient halophytes ou non-halophytes. Chez ces dernières, le taux de croissance baisse avec la salinité même quand la concentration en sel est faible. La baisse de la croissance est la conséquence de plusieurs réponses physiologiques y compris des modifications de l'équilibre ionique, de l'eau, de la nutrition minérale, du comportement stomatique, de l'efficacité photosynthétique et de l'allocation et de l'utilisation de carbone (Greenway et Munns, 1980 ; Munns et Termaat, 1986 ; Malibari et coll., 1993). Les effets ioniques sur les plantes peuvent être directement dus à une accumulation excessive d'ions dans un tissu, qui entraîne des troubles du métabolisme ou un déséquilibre nutritionnel. Les ions inorganiques aident aussi à conférer une tolérance au sel par l'osmorégulation. Les plantes peuvent tolérer la salinité soit par l'exclusion ou la compartimentation des ions afin de maintenir une pression de turgescence pour la croissance. Les solutés inorganiques les plus importants servant d'osmotique sont le K⁺, le Cl⁻ et le NO₃⁻. L'un des mécanismes de tolérance au sel chez les plantes est l'accumulation différentielle des ions à l'intérieur des différentes parties de la plante (Greenway et Munns, 1980). Ce phénomène, appelé le partage des ions a été observé dans les graines de riz (Peiris et coll., 1988) et les tiges d'orge (Wolf et coll., 1991). La capacité à distribuer les ions en trop loin

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

des parties physiologiquement actives de la plante agit comme une technique de survie chez les plantes cultivées dans des habitats salins (Peris et coll., 1994).

Le mûrier est une culture commerciale importante et populaire dans le Tamil Nadu en Inde et aussi un composant vital de la sériciculture (l'élevage des vers à soie), qui est devenue une industrie agricole familiale bien installée nécessitant peu d'investissements avec des profits élevés. La sériciculture est donc considérée comme l'un des outils importants dans le pays pour combattre la pauvreté à la fois dans les zones rurales et urbaines. Le mûrier est une culture commerciale plus rapide, donnant un revenu tous les 75 à 90 jours. Elle est largement recommandée comme culture extensive dans le Tamil Nadu pour augmenter la production de soie. Les problèmes de salinité sont en général plus prononcés dans les mûraies des régions tropicales et subtropicales parce qu'il n'y a pas assez de précipitations pour se débarrasser du sel accumulé dans la zone racinaire. En général, le mûrier ne pousse pas bien dans les zones non irriguées (Susheelamma, 1990 ; Dorcus et Vivekanandan, 1991) ou salines (Bose, 1991 ; Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan, 1994). Cette étude a donc été entreprise avec deux génotypes de mûrier prometteurs (Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan, 1994 ; Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan, 1999). Tr4 et Tr10 ont été cultivés de manière hydroponique à des concentrations différentes de NaCl (0, 10, 20 et 30 mM) pour étudier la croissance précoce et l'absorption et le déplacement de Na^+ , K^+ , Cl^- et Ca^{2+} de manière à évaluer leur potentiel inhérent de croissance dans un sol salin.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences ont été réalisées en 1995-96 dans le laboratoire de Biotechnologie de l'Ecole des Sciences de la Vie (Sériciculture), Université de Bharathidasan, Tiruchirapalli, Tamil Nadu, Inde. Des boutures de deux génotypes de mûrier (Tr4 et Tr10) recueillies dans la mûraie de l'Université de Bharathidasan de 15 cm de longueur avec 4 à 5 bourgeons (Krishnaswamy, 1978) sont plantées dans des plateaux de culture en plastique (45 × 30 × 9 cm). Vingt-cinq boutures sont placées dans un plateau de culture en plastique recouvert avec une feuille de thermacole perforé pour chaque concentration en NaCl. Le bout basal incisé des boutures est trempé dans une solution expérimentale. Trois plateaux séparés de culture contenant 25 boutures sont utilisés pour chaque concentration en NaCl pour les répétitions. La solution standard de culture est préparée suivant la méthode de Hewitt (1966). Le NaCl est ajouté immédiatement pour donner les concentrations finales de 10, 20 et 30 mM et le pH de la solution est ajusté à 7 avec du NaOH à 0,1N. La conductivité électrique des solutions est de 2,70 ; 3,90 et 4,60 mS/cm respectivement. La solution nutritive de base sert de témoin (0,52 mS/cm). La solution de culture est changée tous les 3 jours. Les boutures sont cultivées en laboratoire sous une lumière blanche naturelle d'une intensité allant jusqu'à 600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à une température de $30 \pm 1^\circ \text{C}$ et une humidité relative d'environ $60 \pm 5\%$. Des plants âgés de 35 jours sont utilisés pour l'analyse des paramètres de croissance précoce tels que la longueur de la pousse et de la racine, le nombre de feuilles et de racines, la surface foliaire et la biomasse fraîche et sèche de la pousse et de la racine en suivant les méthodes standards. Le Na, K et Ca sont analysés à la fois dans les feuilles et dans les racines des plants par photométrie de flamme. Des feuilles et des racines fraîchement recueillies sur des plants de 35 jours sont lavées avec de l'eau distillée et le tissu feuille/racine est séché au four et moulu sous la forme d'une poudre fine. 500 mg de plante en poudre fine digérés avec un mélange d'acide triple (HNO_3 : HClO_4 : HCl) sont utilisés pour l'analyse élémentaire par photométrie de flamme. Le chlorure est estimé d'après la méthode de Krishnamurthy et Bhagwat (1990). Les données recueillies pendant la durée de cette étude sont soumises à une analyse statistique (Ecart type, Intervalle de Confiance) en adoptant les procédures standards décrites par Zar (1974).

RESULTATS ET DISCUSSION

Comme la racine est l'organe directement exposé à la salinité, le pourcentage de racinement des génotypes de mûrier Tr4 et Tr10 est étudié en premier. Le développement des nouvelles pousses est ensuite enregistré. Le racinement et le débourrement, l'un comme l'autre, ne sont pas affectés par la salinité jusqu'à un niveau de 30 mM de NaCl.

Pour les paramètres quantitatifs tels que le nombre moyen de racines, de feuilles, de branches, la surface foliaire et la longueur de la racine et de la pousse, on observe une baisse progressive chez les deux génotypes lorsque les concentrations en sel augmentent (Tableaux I & II) tandis que chez d'autres génotypes (Mysore Local, Kosen, MR2, M5, CR259) on a observé une baisse importante dans une étude précédente réalisée par Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan (1994). Pour d'autres paramètres, comme le ratio racine / pousse et la biomasse fraîche et sèche de la pousse et de la racine, on observe une baisse progressive lorsque les concentrations en sel augmentent. Les baisses de croissance dues à la salinité observées chez *Vicia faba* (réduction de la croissance de la pousse) (Sharma, 1995), *Lycopersicon esculentum* (réduction de la croissance de la racine) (Snapp et Shennan, 1992), *Cucumis melo* (réduction de la surface foliaire) (Franco et coll., 1993) et *Eruca sativa* (réduction de la biomasse) (Ashraf, 1994) confirment nos observations. Cette baisse de la croissance pourrait être attribuée (a) à un stress osmotique dû à une baisse du potentiel en eau externe ou (b) aux effets des ions spécifiques sur les processus du métabolisme allant de l'absorption des nutriments à l'activation ou à l'inhibition des enzymes (Greenway et Munns, 1980 ; Epstein, 1983).

La capacité des génotypes à absorber des éléments comme le Na et le Cl a été étudiée en relation avec Ca et K et les résultats sont présentés dans les Tableaux III & IV. L'absorption de Na est plus élevée chez les deux génotypes à des concentrations plus élevées en NaCl (Tableau III). Chez Tr10, on observe que l'absorption de K augmente de manière marginale lorsque les concentrations en sel sont plus élevées. La concentration en K est toujours plus élevée que celle en Na à n'importe quelle concentration de NaCl. Patil et coll., (1989) ont observé que le carthame, génotype 19-185, contient moins de Na et plus de K dans les feuilles, ce qui indique une plus grande tolérance à la salinité. La concentration en Ca baisse de manière marginale chez les deux génotypes quand la concentration en NaCl augmente dans le milieu. Des niveaux accrus en sel sont associés à des réductions de la teneur en Ca chez des pousses d'orge cultivées en champ (Lynch et Lauchli, 1985). Ils ont conclu que le NaCl inhibe le transport de Ca de la racine à la pousse et aussi que la réduction de la teneur totale en Ca dans le tissu de la racine reflète un déplacement du Ca par le Na dans les sites d'échange de cations apoplastiques. De manière inattendue, le niveau de Cl ne varie pas de manière significative chez les deux génotypes. Bigot et Binet (1987) ont observé que les cations ne sont pas affectés par la salinité chez *Phaseolus vulgaris*. Le ratio K/Na baisse quand les concentrations en NaCl sont plus élevées à cause de l'augmentation continue de Na chez Tr10 comparé à Tr4 (Tableau III). Le ratio K/Na indique une accumulation préférentielle de K par rapport à Na bien que le Na soit présent à une concentration plus élevée dans le milieu externe. Un ratio K/Na faible et des niveaux de pigments en chlorophylle élevés s'avèrent des indicateurs utiles pour identifier les lignées tolérantes à la salinité chez le riz (Baset et Jahanara Arju, 1989), pendant n'importe quelle procédure de criblage, ce qui confirme aussi nos observations sur un ratio K/Na faible dans les feuilles chez les deux génotypes en particulier chez Tr10.

Comme on l'a enregistré pour la feuille, on observe aussi que le Na s'accumule dans les racines, à tous les niveaux de concentration en NaCl. D'autre part, l'absorption de K baisse énormément (Tableau IV). La concentration en Cl n'est pas affectée, tandis que celle en calcium diminue. Compte tenu de l'augmentation de la concentration en sodium et de la baisse de la concentration en potassium, le ratio K/Na baisse énormément dans la racine. Cependant, dans la feuille, comme on l'a déjà mentionné, le niveau en K n'est pas affecté ou augmente de manière marginale (Tableau IV). En fait, dans les feuilles, on observe que la concentration en potassium est bien plus élevée. De même que dans les racines la concentration en Na est plus élevée, ce qui suggère sûrement que l'absorption de

K et son déplacement ultérieur dans les feuilles par les racines n'est pas affecté par la salinité. Ainsi l'accumulation de Na dans les feuilles n'affecte pas l'absorption et l'accumulation de potassium. Dans les racines, la concentration en Na est beaucoup plus élevée que celle en K. Cette dernière observation est confirmée par les études de Siddique *et al.* (1983), qui ont observé que l'accumulation de sodium avec une salinité accrue entraîne une baisse en potassium dans les racines du pois. Ceci est confirmé par les études de Kalir et Poljakoff-Mayber (1981) qui ont observé plus de sodium et moins de potassium dans les racines de *Halimone portulacoides* quand les concentrations en NaCl augmentent, ce qui laisse entendre que ces deux génotypes de mûrier ont une tolérance saline. De plus, l'observation de niveaux plus élevés de potassium dans les feuilles que dans les racines est confirmée par l'étude de Weimburg et coll., (1984) dans laquelle *Sorghum bicolor* a accumulé du sodium comme cation prédominant dans les racines, alors que le potassium est toujours plus élevé que les niveaux de sodium dans les feuilles dans les conditions salines. Les ions de sodium et de chlorure contribuent de manière synergique à la toxicité du sel mais les deux génotypes examinés accumulent en général plus de sodium que de chlorure. Cette observation peut aussi être une indication de l'accumulation différentielle des ions dans différentes parties de la plante, en l'occurrence la racine et la pousse, ce qui est considéré comme l'une des adaptations par rapport à la tolérance au sel chez les plantes.

SEASONAL BIOASSAY RESPONSE OF SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) TO THE MULBERRY (*MORUS* SPP.) LEAF PRESERVATION METHODS

E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN

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

*Post harvest maintenance of the quality and feed value of leaves minimising the loss of moisture and chemical degradation necessitates their careful preservation. Storage of leaves (*Morus indica* L.) on floor, in baskets, in leaf chambers, in earthen pots, under wet gunny clothes and in earthen pots buried in wet sand was evaluated during summer, rainy and winter seasons. Data on temperature and humidity inside the storage place and leaf moisture loss and biochemical components of leaf were recorded. Silkworm bioassay was conducted using the leaf under treatments up to 3rd age followed by feeding the freshly collected leaf for the rest of the larval period. Preservation up to twelve hours in earthen pot buried in wet sand performed better compared to other treatments, both in respect of leaf quality and rearing parameters, during all the three seasons.*

Keywords: Bioassay, *Bombyx mori* L., leaf storage, *Morus*, nutrition, silkworm, young age.

INTRODUCTION

Seasonal variations and biochemical degradations during post harvest preservation of mulberry (*Morus* sp.) leaf influence the feed value contributing to the cocoon crop performances of the silkworm (*Bombyx mori* L.) (Purohit and Pavankumar, 1996). Leaf preservation for up to 12 hrs (and occasionally for about 20 hrs) is many times inevitable (Narashimha Murthy *et al.*, 1987) during which period the leaves lose moisture and undergo biochemical changes (Govindan *et al.*, 1988) which are also influenced by seasonally variable environmental factors (Krishnaswami *et al.*, 1971). For overcoming these variabilities, leaf preservation adopting different methods has been recommended under different situations and in different regions (Himantharaj *et al.*, 1995). However, information on critical evaluation of leaf preservation methods in vogue, particularly under the tropics, in respect of seasonal variations and environmental influence is extremely scanty. Studies were carried out on these aspects for optimising the requirements of young age silkworm (Muniraju, 1994). Methods of preservation covering different seasons are included in this report.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the campus of this Institute using an irrigated garden of M5 mulberry variety maintained under regular package of practices (Choudhary and Giridhar, 1987) with 5 harvest/annum and a pruning for every harvest. Tender leaf at 1-4 terminal positions on healthy shoot as recommended for young age (up to the 3rd moult) was harvested (Benjamin and Nagaraj, 1987) during early morning hours (8-9 a.m). The leaf was transported to the laboratory in plastic trays covered with wet cloth and was subjected to preservation under the following treatments:

- T1 – Leaf chamber (wooden*) covered with dry gunny cloth,
 - T2 – Leaf chamber (wooden)* covered with wet gunny cloth,
 - T3 – Leaf basket (bamboo) covered with dry gunny cloth,
 - T4 – Leaf basket (bamboo) covered with wet gunny cloth,
 - T5 – Heaped on mat and covered with dry gunny cloth,
 - T6 – Heaped on mat and covered with wet gunny cloth (farmers method)
 - T7 – Earthen pot with lid,
 - T8 – Earthen pot covered with wet gunny cloth,
 - T9 – Earthen pot with lid buried in wet sand up to the neck,
 - T10 – Plastic bag (black) and
 - T11 – Transparent plastic bag
- * (152.4 cm × 76.2 cm × with wooden stripes of 3.2 cm × 1.3 cm and 3.2 cm gap all round)

In case of wet treatments (T2, T4, T6, T8 and T9), periodical moistening was given to maintain the moisture at the desired level. Temperature and humidity were recorded once in 3 hours for 24 hours as a parallel set of treatments maintained in the same vicinity without the leaf. Leaf moisture loss, soluble protein (Lowry *et al.*, 1951) and soluble sugars (Dubois *et al.*, 1956) were estimated at the end of preservation for 12 hours.

Bioassay trials were simultaneously conducted 3 times in each season with three replicate batches of 25 diseased free laying (dfls) larvae each of NB4D2 silkworm bivoltine race using an isolation chamber (Sekharappa *et al.*, 1995). The leaf after the preservation for 12 hours under respective treatments was used for feeding the larvae up to 3rd age. Rearing was continued with 400 larvae per replication after 3rd moult up to cocooning using freshly harvested leaves from the same garden. Other rearing practices were similar to those of general recommendations. Data in respect of larval duration, weight, effective rate of rearing (ERR) and cocoon assessments were recorded. Data on leaf quality and bioassay parameters from the three trials along with temperature and humidity in leaf preservation environment were pooled season wise and compared for the treatment differences. Multiple comparisons (Duncan, 1955) and correlations among selected parameters were also computed (Sundaraj *et al.*, 1972).

RESULTS

Temperature variations recorded in respect of leaf preservation methods (Table I) revealed that during summer the lowest temperature (25°C) was recorded in T9 with fluctuations of 1.4°C followed by T4, T2, T8 and T6 (25.8 to 26°C). Similar trend of temperature maintenance was recorded for rainy and winter seasons also. Maximum humidity (96 to 99%) with least fluctuations (3%) were recorded (Table II) in T9 followed by T8, T4, T6 and T2 (92 to 94.8, 86.5 to 90.21, 86.5 to 93.5, 82.8 to 96% respectively). Similar trend with maximum humidity (92.8 to 96.0, 89.5 to 90.8% for rainy and winter seasons respectively) was recorded in T9 and other wet treatments for rainy and winter seasons.

Higher values of leaf moisture retention in summer (97.83) in T9 were followed by T6 (97.05%) and T8 (96.20%) which differed significantly from all other treatments, the lowest values being in T1 and T3 (83.21 and 85.08% respectively). (Higher values recorded in T10 and T11 were however, owing to moisture accumulation on leaf surface during the three seasons). A similar trend was recorded for rainy and winter seasons (Table III). Higher values of protein contents were recorded in T9 in the three seasons, which differed significantly from all other treatments during the three seasons except with T4 in summer and rainy seasons. T1, T10 and T11 recorded the lowest values in summer and rainy seasons and T1 and T5 in winter. Similarly sugar contents were higher in T9 (13.67, 13.76 and 14.28%) in the three seasons, compared to T5 and T1 during summer and rainy seasons and T1 and T3 in winter (Table III).

Table I. Leaf preservation temperature (° C) variations over seasons (Mean of 3 trials with 3 replicates each).

Tableau I. Variations de température (° C) de conservation de la feuille au cours des saisons. (Moyennes de 3 essais de 3 répétitions chacun).

Treatments <i>Traitements</i>	Summer / <i>Eté</i>				Rainy / <i>Saison des pluies</i>				Winter / <i>Hiver</i>			
	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>
T1	27.6 ^{cd}	30.0 ^{cd}	2.4	28.6	24.0 ^{efg}	25.0 ^c	1.0	24.3	23.5b ^{cd}	25.0 ^c	1.5	24.3
T2	26.0 ^b	28.6 ^b	2.6	27.3	23.5 ^{cde}	24.3 ^d	0.8	23.84	23.0 ^a	24.0 ^a	1.0	23.4
T3	27.3 ^c	30.0 ^{cd}	2.7	28.5	23.1 ^{cd}	24 ^{bc}	0.9	23.82	24.0 ^d	24.9 ^c	0.9	24.4
T4	25.8 ^b	26.3 ^a	0.5	25.2	22.4 ^a	23.9 ^{abc}	1.5	23.38	23.0 ^a	24.0 ^a	1.0	23.4
T5	28.3 ^c	31.3 ^{ef}	2.5	30.2	24.6 ^g	25.0 ^c	0.4	24.93	24.0 ^d	26.3 ^d	2.3	25.5
T6	26.0 ^b	28.8 ^b	2.8	27.8	24.1 ^{fg}	25.0 ^c	0.9	24.43	23.0 ^a	24.4 ^b	1.4	23.5
T7	28.3 ^c	29.1 ^{bc}	0.8	28.7	23.0 ^{bc}	24.0 ^{bc}	1.0	23.48	23.3 ^{abc}	24.0 ^a	0.7	23.8
T8	26.0 ^b	26.5 ^a	0.5	26.2	22.5 ^{ab}	23.6 ^a	1.1	23.2	23.0 ^a	24.0 ^a	1.0	23.7
T9	25.0 ^a	26.4 ^a	1.4	25.9	22.5 ^{ab}	23.8 ^{ab}	1.3	23.22	23.0 ^{ab}	24.0 ^a	0.5	23.9
T10	28.0 ^{de}	30.5 ^{de}	2.5	29.8	24.0 ^{efg}	24.8 ^c	0.8	24.81	23.8 ^{de}	24.0 ^a	0.2	23.9
T11	28.0 ^{de}	31.5 ^g	3.5	30.2	23.8 ^{def}	24.9 ^c	1.1	24.22	23.5 ^{bcd}	24.0 ^a	0.5	23.8
F test	**	**			**	**			**	**		
CD @ 5%	0.655	0.764			0.518	0.368			0.44	0.393		
CD @ 1%	0.891	1.04			0.705	0.501			0.598	0.535		

Note: ** Significant at 1% / ** *Significatif à 1%*. Means with common superscript do not differ significantly (5%) / *Les moyennes avec un exposant commun ne diffèrent pas de manière significative (5 %).*

Table II. Leaf preservation: humidity (%) variations over seasons. (Mean of 3 trials with 3 replicates each).

Tableau II. Conservation de la feuille : variations de l'humidité (%) au cours des saisons. (Moyenne de 3 essais de 3 répétitions chacun).

Treatments <i>Traitements</i>	Summer / <i>Eté</i>				Rainy / <i>Saison des pluies</i>				Winter / <i>Hiver</i>			
	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>	Min.	Max.	Diff.	Mean <i>Moyenne</i>
T1	56.8 ^{ai}	65.3 ^a	8.5	61.3	80.0 ^{bc}	91.0 ^{bcd}	11.0	86.1	75.0 ^b	88.3 ^c	13.3	80.2
T2	82.8 ^d	96.0 ^c	13.2	89.5	87.0 ^{def}	94.3 ^{de}	7.3	91.2	79.5 ^{bcd}	91.0 ^c	11.5	86.6
T3	62.0 ^b	72.0 ^b	10.0	66.3	77.5 ^{ab}	91.0 ^{bcd}	13.5	84.7	77.8 ^b	83.0 ^b	5.2	80.8
T4	86.5 ^{de}	93.5 ^{de}	7.0	89.5	87.0 ^{def}	96.0 ^e	9.0	92.5	85.8 ^{de}	92.0 ^c	6.3	89.6
T5	59.3 ^b	68.5 ^{ab}	9.3	63.6	75.0 ^a	85.0 ^a	10.0	82.3	65.3 ^a	77.8 ^a	12.5	70.9
T6	86.5 ^{de}	90.2 ^d	3.7	87.9	83.0 ^{cd}	88.8 ^b	5.8	85.1	80.56 ^{bcd}	90.2 ^c	9.6	85.4
T7	71.3 ^c	77.5 ^c	6.2	74.6	83.0 ^{cd}	92.8 ^{cdc}	9.8	89.9	77.8 ^b	88.3 ^c	10.5	84.5
T8	92.0 ^{ef}	94.8 ^{df}	2.8	92.8	88.3 ^{ef}	96.0 ^c	7.7	93.7	85.3 ^{cde}	91.0 ^c	5.7	89.2
T9	96.0 ^f	99.0 ^f	3.0	97.9	92.8 ^g	96.0 ^c	3.2	94.9	89.5 ^c	90.8 ^c	1.3	90.5
T10	62.0 ^b	72.0 ^b	10.0	68.8	80.9 ^{bc}	90.0 ^{bc}	9.1	85.3	79.1 ^{bc}	89.9 ^c	10.8	85.2
T11	64.0 ^b	76.0 ^{bc}	12.0	69.1	84.2 ^{cde}	90.0 ^{bc}	5.8	87.5	80.0 ^{bcd}	90.0 ^c	10.0	86.9
F test	**	**			**	**			**	**		
CD @ 5%	6.068	5.262			4.482	3.704			6.218	4.56		
CD @ 1%	8.258	7.161			5.561	5.041			8.464	6.2		

Note: ** Significant at 1% / ** *Significatif à 1 %.*

Means with common superscript do not differ significantly (5 %) / *Les moyennes avec un exposant en commun ne diffèrent pas de manière significative (5 %).*

Table III. Leaf preservation: Bio-chemical levels over seasons (Mean of 3 trials with 3 replicates each).**Tableau III. Conservation de la feuille : niveaux biochimiques au cours des saisons (Moyenne de 3 essais de 3 répétitions chacun)**

Treatments	Summer			Rainy			Winter		
	Moisture retention %	Soluble protein %	Soluble sugars %	Moisture retention %	Soluble protein %	Soluble sugars %	Moisture retention %	Soluble protein %	Soluble sugars %
Traitements	Ete			Saison des pluies			Hiver		
	Rétention d'humidité %	Protéines solubles %	Sucres solubles %	Rétention d'humidité %	Protéines solubles %	Sucres solubles %	Rétention d'humidité %	Protéines solubles %	Sucres solubles %
T1	83.21 ^a	20.06 ^b	9.65 ^b	86.85 ^a	21.95 ^{ab}	9.12 ^a	83.29 ^a	15.58 ^a	9.88 ^a
T2	89.29 ^{ab}	21.31 ^c	11.50 ^{def}	96.83	23.77 ^{cd}	14.24 ⁱ	95.70 ^{ef}	17.12 ^{cd}	10.63 ^{bc}
T3	85.08 ^a	20.49 ^b	10.64 ^{bcd}	88.99 ^b	22.76 ^{bc}	11.14 ^{cd}	88.77 ^c	17.30 ^{cd}	10.25 ^{ab}
T4	89.63 ^c	22.19 ^d	12.22 ^f	95.48 ^d	24.60 ^{dc}	12.70 ^{fg}	95.12 ^c	17.59 ^d	12.63 ^c
T5	87.95 ^b	18.95 ^a	7.90 ^a	86.25 ^a	22.75 ^{bc}	10.22 ^b	87.69 ^b	16.24 ^b	11.80 ^d
T6	97.05 ^d	20.56 ^b	11.13 ^{cde}	96.53 ^c	23.49 ^c	10.49 ^{bc}	96.64 ^{fg}	17.01 ^{cd}	14.40 ^f
T7	90.10 ^c	20.52 ^b	10.23 ^{bc}	94.56 ^c	22.78 ^{bc}	12.24 ^{cf}	93.46 ^d	18.20 ^c	11.25 ^{cd}
T8	96.20 ^d	21.42 ^c	12.05 ^{cf}	95.06 ^{cd}	23.68 ^{cd}	13.23 ^{gh}	95.98 ^{ef}	19.02 ^g	12.56 ^c
T9	97.83 ^d	22.94 ^d	13.67 ^g	97.47 ^c	25.13 ^c	13.76 ^{hi}	97.59 ^{gh}	21.69 ^g	14.28 ^f
T10	98.31 ^d	19.63 ^a	11.79 ^{cf}	98.51 ^f	21.41 ^a	12.13 ^{cf}	98.35 ^h	19.34 ^f	10.92 ^{bc}
T11	97.32 ^d	19.27 ^a	11.62 ^{def}	97.17 ^c	21.59 ^a	11.60 ^{dc}	97.37 ^{gh}	18.92 ^f	11.20 ^{cd}
F test	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CD @ 5%	2.131	0.746	1.006	0.822	1.118	0.884	1.055	0.566	0.695
CD @ 1%	2.847	0.997	1.344	1.098	1.494	1.181	1.409	0.756	0.928

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

Means with common superscript does not differ significantly (5%) / Les moyennes avec un exposant en commun ne diffèrent pas de manière significative (5 %).

Temperature recorded negative correlations for humidity (− 0.856 to − 0.926), leaf moisture (− 0.541 to − 0.830), protein (− 0.001 to − 0.731) and soluble sugars (− 0.167 to − 0.875) while humidity recorded positive correlations for all the parameters (0.188 to 0.894) and for all the seasons (Table IV).

Table IV. Correlative coefficients of preservation environment vs leaf quality. (Based on pooled data of 3 trials of 11 treatments with 3 replications each).

Tableau IV. Coefficients de corrélation entre l'environnement de conservation et la qualité de la feuille (d'après les données regroupées de trois essais des 11 traitements de 3 répétitions chacun).

Seasons	Parameters	Humidity	Moisture	Soluble proteins	Soluble sugars
Saisons	Paramètres	Humidité	Hygrométrie	Protéines solubles	Sucres solubles
Summer / Eté	Temperature	-0.896*	-0.541*	0.001	-0.875*
	Humidity / Humidité	-	0.852*	0.188	0.894*
	Moisture / Hygrométrie	-	-	0.391*	0.705*
	Soluble protein Protéines solubles	-	-	-	0.987*
Rainy / Saison des pluies	Temperature	-0.856*	-0.830*	-0.731*	-0.764*
	Humidity / Humidité	-	0.890*	0.846*	0.844*
	Moisture / Hygrométrie	-	-	0.753*	0.947*
	Soluble protein Protéines solubles	-	-	-	0.808*
Winter / Hiver	Temperature	-0.929*	-0.689*	-0.424*	-0.167
	Humidity / Humidité	-	0.795*	0.721*	0.500*
	Moisture / Hygrométrie	-	-	0.719*	0.704*
	Soluble proteins Protéines solubles	-	-	-	0.831*

Note: * Values significant / * valeurs significatives.

The ERR was higher in T9 during summer and winter (followed in descending order by T8, T2, T6, T4, T10 and T7 during summer and by T8, T11, T5, T4 and T10 during winter). In rainy season, however, T6 recorded higher values of ERR which did not differ significantly from T9 and all other treatments. Single cocoon weight was highest in T9 in all the three seasons (1.86, 2.03 and 1.51 g) which did not differ significantly from T6 and T4 in summer and T10 and T2 in winter seasons (Table V).

Table V. Bioassay rearing performance of *Bombyx mori* L. to the preserved leaf over seasons. (Mean of 3 trials with 3 replicates each).

Tableau V. Evaluation biologique par l'élevage de *Bombyx mori* L. avec des feuilles conservées au cours des saisons (Moyenne de trois essais de trois répétitions chacun).

Treatment	Summer / Été				Rainy / Saison des pluies				Winter / Hiver			
	Larval weight (g/larvae)	Larval duration (hrs)	ERR (/10 000 larvae)	Single cocoon wt (g)	Larval weight (g/larvae)	Larval duration (hrs)	ERR (/10 000 larvae)	Single cocoon wt. (g)	Larval weight (g/larvae)	Larval duration (hrs)	ERR (/10 000 larvae)	Single cocoon weight (g)
Traitement	Poids larvaire (g/larve)	Durée larvaire (hres)	ERR (/10 000 larves)	Poids d'un cocon (g)	Poids larvaire (g/larve)	Durée larvaire (hres)	ERR (/10 000 larves)	Poids d'un cocon (g)	Poids larvaire (g/larve)	Durée larvaire (hres)	ERR (/10 000 larves)	Poids d'un cocon (g)
T1	4.03 ^{abc}	598 ^c	9350 ^{ab}	1.77 ^b	4.26 ^a	625 ^f	9550	1.82 ^b	3.19 ^{bcd}	628	8500 ^a	1.39 ^{abc}
T2	4.27 ^c	582 ^a	9488 ^{bc}	1.84 ^d	4.38 ^c	618 ^e	9288	1.96 ^{cf}	3.30 ^{fg}	612	8488 ^a	1.48 ^{cd}
T3	4.07 ^{abc}	600 ^{cd}	9250 ^a	1.75 ^{ab}	4.32 ^b	625 ^f	9550	1.81 ^b	3.25 ^{cf}	628	8863 ^{ab}	1.32 ^a
T4	4.35 ^c	586 ^{ab}	9450 ^{abc}	1.83 ^{cd}	4.38 ^c	616 ^d	9488	1.92 ^c	3.31 ^g	612	9000 ^{abc}	1.37 ^{ab}
T5	3.95 ^a	602 ^{cd}	9250 ^a	1.71 ^{ab}	4.38 ^c	628 ^g	9463	1.84 ^b	3.11 ^a	628	9050 ^{abc}	1.32 ^{ab}
T6	4.32 ^c	586 ^{ab}	9475 ^{bc}	1.83 ^{cd}	4.50 ^c	614 ^c	9750	1.98 ^f	3.28 ^{efg}	612	9388 ^c	1.4 ^{abc}
T7	3.98 ^{ab}	603 ^{cde}	9450 ^{abc}	1.70 ^a	4.49 ^c	628 ^g	9500	1.87 ^c	3.17 ^{bc}	628	8800 ^a	1.38 ^{abc}
T8	4.23 ^{de}	604 ^{de}	9538 ^{bc}	1.82 ^c	4.63 ^f	614 ^c	9513	1.95 ^c	3.24 ^{de}	612	9200 ^{bc}	1.39 ^{abc}
T9	4.65 ^f	591 ^b	9588 ^c	1.86 ^d	4.81 ^g	596 ^a	9538	2.03 ^g	3.26 ^{efg}	612	9388 ^c	1.51 ^d
T10	4.12 ^{cd}	608 ^c	9413 ^{abc}	1.72 ^{ab}	4.49 ^c	612 ^b	9613	1.89 ^d	3.15 ^{ab}	628	8950 ^{abc}	1.47 ^{bcd}
T11	4.08 ^{bc}	603 ^c	9363 ^{ab}	1.71 ^{ab}	4.44 ^d	618 ^c	9438	1.72 ^a	3.23 ^{cde}	628	9188 ^{bc}	1.40 ^{abc}
Ftest	**	**	**	**	**	**		**	**		*	**
CD @ 5%	0.122	5.434	214	0.066	0.049	0.533	-	0.0491	0.054	-	521.45	0.103
CD @ 1%	0.163	7.260	286	0.088	0.066	0.712	-	0.0657	0.072	-	696.73	0.138

Note:

* Significant at 5% / * Significatif au seuil de 5 %. ERR / Effective Rearing Rate / Taux effectif d'élevage.

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

Means with common superscript do not differ significantly (5%) / Les moyennes avec un exposant en commun ne diffèrent pas de manière significative (5 %).

DISCUSSION

Longer periods of leaf preservation lead to the degradation of proteins to amino acids and starch to sugars making the catabolic products available for metabolism (Narasimha Murthy *et al.*, 1987). This was well pronounced in dry treatments, which recorded lower values of leaf protein and sugar contents. However, in wet treatments, the degraded protein and sugar products are likely to be conserved for longer periods owing to lower rates of utilisation, (Himantharaj *et al.*, 1995), which was well expressed in T9. Growth and development of insects is also correlated with water and nitrogen content of leaves (Tingey and Singh 1980, Scriber 1982). Soo-Ho Lim *et al.*, (1990) demonstrated that 88.2% of larval mortality is attributable to poor quality of leaf supplied throughout the rearing period out of which 71.4% was attributed to inferior quality of leaf given during 1st instar alone. Chaluvachari and Bongale (1994; 1996) recorded positive correlations of leaf moisture retention with larval weight and moulting ratio for the young age worms, while Bongale and Chaluvachari (1993) recorded the influence of leaf protein and sugar contents on cocoon shell ratio. It could be observed that leaf preserved in a pot buried in wet sand recorded best performances among all the treatments in respect of the parameters studied for all the three seasons. Data on the leaf biochemical parameters and correlation coefficients also supported these observations (Table IV).

Leaf moisture, proteins and sugar contents were high during rainy season followed by summer and winter; which corroborate with the bioassay performance in respect of larval weight, ERR and cocoon weight of the respective seasons. Seasonal variability of leaf and rearing parameters recorded in the present study were also in agreement with those recorded by Bongale and Chaluvachari (1993). Among different methods evaluated in this study, T9 recorded higher humidity (34,31, 9.76 and 19.67% higher than in T5 during summer, rainy and winter seasons respectively) for all the seasons. Maintenance of the suggested conditions of < 20° C and > 90% R.H. (Ullal and Narasimhanna, 1978), however, is many times not possible under the tropics, which experience frequent variations in the climate influencing the leaf quality, and in turn the rearing performance. Among the methods incorporated in the study, the wet treatments (namely T2, T4, T6, T8 and T9) recorded lower temperatures attributable to evaporative cooling (Mack O' Nanth, 1984). However, the extent of cooling and its variability among the treatments depended on exposed surface to volume ratio and material used apart from ambient temperature, humidity and wetting frequency. Surface to volume ratio (68:32) and water holding capacity (13-14%) being maximum in T9 was an added advantage to increase the efficiency of cooling. During summer because of high ambient temperature (31.3° C) and low humidity (59%) the rate of evaporation increased facilitating maximum cooling of 6.2° C (Table I and II).

It could be concluded that preservation of tender leaf for the young age larvae, in earthen pots buried in moist sand recorded higher values of larval body weights and performed better over other treatments both in respect of leaf quality and bioassay performance. Leaf storage under wet gunny cloth cover was, in general, better compared to open preservation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for facilities and the Division Chief (Moriculture) for script correction and valuable suggestions.

REFERENCES

- BONGALE U. D., CHALUVACHARI (1993) Evaluation of four varieties by leaf biochemical analysis and bioassay with *Bombyx mori* L., J. Indian Bot. Soc., 72: 59-62.

- BENCHAMIN K. V., NAGARAJ C. S. (1987) Silkworm rearing techniques. In: Jolly M. S. (ed.) *Appropriate Sericulture Techniques* (pp. 176). Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore – 8, pp. 63-106.
- CHALUVACHARI, BONGALE U. D. (1994) Leaf quality evaluation of selected mulberry genotypes by bio-chemical and bioassay studies. *Proceedings of the Conference held at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore-62, from November 5th to 7th 1992, on Cytology & Genetics*. 4: 121-124.
- CHALUVACHARI, BONGALE U. D. (1996) Bioassay moulting response of silkworm *Bombyx mori* L. in relation to leaf nutritive constituents in mulberry (*Morus* spp.) genotypes. *Indian J. Seric.*, 35(2): 160-162.
- CHOUDHARY P. C., GIRIDHAR K. (1987) Mulberry cultivation. In Jolly M. S. (ed.) *Appropriate Sericulture Techniques* (pp. 176). Central Sericulture Research Training Institute. Mysore – 8. Pp. 17-34.
- DUBOIAS M., GILLER K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH F. (1956) A calorimetric method for estimation of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350.
- DUNCAN D. B. (1955) Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics*. 11: 1-42.
- GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T. K., MAGADUM S. B. (1988) Relative moisture loss from leaves of some mulberry varieties during storage. *Curr. Res. Agric. Sci.*, 17(11): 151-153.
- HIMANTHARAJ M. T., TOMY PHILLIP, MINEENAL A., RAJAN R. K. (1995) Proper preservation a must for leaf quality. *Indian Silk*, 33(12): 9-11.
- KRISHNASWAMI S., KUMARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASHIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen. *Indian J. Seric.* 10(1): 79-86.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDIL R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-267.
- MACK O'NARTH (1984) *Animal science text book series commercial chicken production manual* 3rd edition AVI Pub. Com California, p. 56-61.
- MUNIRAJU E. (1994) Studies on standardisation of rearing methods of young age silkworm *Bombyx mori* L. Phd. Thesis Bangalore University, pp. 84-135.
- NARASIMHA MURTHY C. V., DONATES E., PILLAI S. V. (1987) Chemical composition of mulberry during preservation and leaf storage. *Sericologia*, 27(4): 623-27.
- PUROHIT K. M., PAVANKUMAR T. (1996) Influence of various agronomical practices in India on the leaf quality in mulberry, a review. *Sericologia*, 36(1): 27-39.
- SCRIBER J. M. (1982) The behaviour and nutritional physiology of southern army worm larvae as a function of plant species consumed in earlier instars. *Ext. Exp. App.*, 31: 359-369.
- SEKHARAPPA B. M., MUNIRAJU E., GURURAJ C. S. (1995) Use of an isolation chamber for rearing young age (chawki) silkworms in the tropics. *Sericologia*, 35(3): 525-534.
- SOO-HO LIM, YOUNG-TACK KIM, SUNG-POONG LEE, IN-JUM RHEE, JUNG-SUNG LIM BYONG-HO LIM (1990) *Sericulture training manual*, FAO Agricultural Services Bulletin 80, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome p. 71.
- SUNDARAJ N., NAGARAJU S., VENKATARAMU M. N., JAGANATH M. K. (1972) Design and analysis of field experiments. Pub. University of Agricultural Sciences, Hebbal, Bangalore 560064, pp. 424.
- TINGEY W. M., SINGH S. R. (1980) Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. In *breeding plants resistant to insects*. Ed. by F. G. Marwell and P. R. Jennings, Wiley, New York, p. 87-114.
- ULLALS R., NARASIMHANNA M. N. (1978) *Hand Book of Practical Sericulture*. Pub. By Central Silk Board, Bangalore, p 1-151.

EVALUATION BIOLOGIQUE PAR LE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) DES METHODES DE CONSERVATION DE LA FEUILLE DE MURIER (*MORUS* SPP.) EN FONCTION DES SAISONS

E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore – 560 062, Inde.

*Pour maintenir la qualité et la valeur nutritive des feuilles après la cueillette, en minimisant la perte d'humidité et la dégradation chimique il faut qu'elles soient conservées avec soin. Nous avons évalué le stockage des feuilles (*Morus indica* L.) sur le sol, dans des paniers, dans des casiers, dans des pots en terre, sous de la toile de jute mouillée et dans des pots en terre enfouis dans du sable pendant l'été, la saison des pluies et en hiver. Les données sur la température et l'humidité de l'endroit de stockage, sur la perte d'humidité de la feuille et sur les composants biochimiques de la feuille ont été enregistrées. L'évaluation biologique a été réalisée en utilisant des feuilles conservées selon les différents traitements fournis aux vers à soie jusqu'au 3^{ème} âge, et en leur donnant des feuilles fraîchement cueillies pendant le reste de la période larvaire. La conservation pendant douze heures dans des pots en terre enfouis dans du sable mouillé donne les meilleurs résultats comparée aux autres traitements, à la fois pour la qualité de la feuille et pour les paramètres d'élevage, pendant les trois saisons.*

INTRODUCTION

Les variations saisonnières et les dégradations biochimiques pendant la conservation suivant la cueillette de la feuille de mûrier (*Morus* sp.) influencent la valeur nutritive, qui contribue aux résultats de récolte des cocons du ver à soie (*Bombyx mori* L.) (Purohit et Pavankumar, 1996). La conservation de la feuille pendant 12 heures (et parfois pendant environ 20 heures) est très souvent inévitable (Narashimha Murthy et coll., 1987). Pendant cette période les feuilles perdent leur humidité et présentent des changements biochimiques (Govindan et coll., 1988), qui sont influencés par des facteurs environnementaux qui varient en fonction des saisons (Krishnaswami et coll., 1971). Pour surmonter ces variations, il a été recommandé de conserver les feuilles en adoptant des méthodes différentes en fonction des situations et des régions (Himantharaj et coll., 1995). Cependant, on dispose de très peu d'information sur l'évaluation critique des méthodes de conservation de la feuille qui existent, particulièrement sous les tropiques, en rapport avec les variations saisonnières et sous l'influence de l'environnement. Des études ont été réalisées sur ces aspects pour optimiser les besoins du jeune ver à soie (Muniraju, 1994). Nous évaluons ici les méthodes de conservation pendant les différentes saisons.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée sur le terrain de l'Institut en utilisant une mûraie irriguée plantée avec la variété M5 entretenue selon les pratiques habituelles (Choudhary et Giridhar, 1987) avec 5 récoltes

/an et une taille à chaque récolte. Des feuilles tendres situées aux quatre dernières positions sur des pousses saines, d'après les recommandations pour les jeunes âges (jusqu'à la troisième mue) sont ramassées (Benchamin et Nagaraj, 1987) aux premières heures de la matinée (8 à 9 heures). Les feuilles sont transportées au laboratoire dans des plateaux en plastique recouverts avec un chiffon mouillé et sont conservées selon les traitements suivants :

T1 – Casier (en bois)* recouvert avec une toile de jute sèche,

T2 – Casier (en bois)* recouvert avec une toile de jute mouillée,

T3 – Panier (en bambou) recouvert avec une toile de jute sèche,

T4 – Panier (en bambou) recouvert avec une toile de jute mouillée,

T5 – En tas sur un tapis et recouvertes avec une toile de jute sèche,

T6 – En tas sur un tapis et recouvertes avec une toile de jute mouillée (méthode des fermiers),

T7 – Pot en terre avec un couvercle,

T8 – Pot en terre recouvert avec de la toile de jute mouillée,

T9 – Pot en terre avec un couvercle enfoui dans du sable mouillé jusqu'au col,

T10 – Sac en plastique (noir) et

T11 – Sac en plastique transparent

* (152,4 cm × 76,2cm × avec des rebords en bois de 3,2 cm × 1,3 cm et un espace de 3,2 cm tout autour)

Dans le cas des traitements humides (T2, T4, T6, T8 et T9), on procède à une humidification périodique pour conserver l'humidité au niveau désiré. La température et l'humidité sont enregistrées toutes les 3 heures pendant 24 heures, avec un lot parallèle de traitements conservé au même endroit sans les feuilles. La perte d'humidité de la feuille, les protéines solubles (Lowry et coll., 1951) et les sucres solubles (Dubois et coll., 1956) sont mesurés au bout de 12 heures de conservation.

Les évaluations biologiques sont réalisées simultanément 3 fois pendant chaque saison, avec trois répétitions comprenant 25 pontes saines (dfl) de la race de ver à soie bivoltine NB₄D₂ dans une pièce isolée (Sekharappa et coll., 1995). Après 12 h de conservation selon les traitements respectifs, les feuilles sont utilisées pour nourrir les larves jusqu'au 3^{ème} âge. On continue l'élevage après la 3^{ème} mue avec 400 larves par répétition jusqu'à la formation des cocons, en utilisant des feuilles fraîchement récoltées dans la même mûraie. Les autres pratiques d'élevage suivent les recommandations générales. Les données par rapport à la durée larvaire, au poids, au taux effectif d'élevage (ERR) et les évaluations des cocons sont enregistrées. Les données sur la qualité des feuilles et sur les paramètres de l'évaluation biologique avec les trois essais et sur la température et l'humidité dans l'environnement de conservation de la feuille sont regroupées en fonction de la saison et comparées en fonction des différents traitements. Nous avons aussi calculé les comparaisons multiples (Duncan, 1955) et les corrélations entre les paramètres sélectionnés (Sundaraj et coll., 1972).

RESULTATS

Les variations de température enregistrées avec les méthodes de conservation de la feuille (Tableau I) révèlent que pendant l'été la température la plus basse (25° C) est enregistrée avec T9 avec des fluctuations de 1,4° C, suivi par T4, T2, T8 et T6 (25,8 à 26° C). Une tendance similaire de maintien de la température est enregistrée pendant la saison des pluies et en hiver. Une humidité maximum (96 à 99 %) avec moins de fluctuations (3 %) est enregistrée (Tableau II) avec T9 suivi par T8, T4, T6 et T2 (92 à 94,8 ; 86,5 à 90,21 ; 86,5 à 93,5 ; 82,8 à 96 % respectivement). Une même tendance est enregistrée avec l'humidité maximum (92,8 à 96,0 ; 89,5 à 90,8 % respectivement) pour T9 et les autres traitements humides pendant les saisons des pluies et d'hiver.

Des valeurs plus élevées de rétention d'humidité sont enregistrées en été (97,83) pour T9, suivi par T6 (97,05 %) et T8 (96,20 %) qui diffèrent de manière significative des autres traitements, les valeurs les plus faibles étant enregistrées pour T1 et T3 (83,21 et 85,08 % respectivement). Les valeurs plus élevées enregistrées pour T10 et T11 sont cependant dues à l'accumulation d'humidité à la surface de la feuille pendant les trois saisons. Nous enregistrons une tendance similaire pendant la saison des pluies et en hiver (Tableau III). Des valeurs plus élevées de teneur en protéines sont enregistrées pour T9 pendant les trois saisons, qui diffère de manière significative des autres traitements pendant les trois saisons excepté de T4 pendant les saisons d'été et des pluies. T1, T10 et T11 donnent les valeurs les plus faibles pendant les saisons d'été et des pluies et T1 et T5 en hiver. De même, la teneur en sucre est plus élevée chez T9 (13,67 ; 13,76 et 14,28 %) pendant les trois saisons, comparé à T5 et T1 pendant les saisons d'été et des pluies et à T1 et T3 en hiver (Tableau III).

La température est corrélée négativement avec l'humidité ($-0,856$ à $-0,926$), avec l'humidité de la feuille ($-0,541$ à $-0,830$), avec les protéines ($-0,001$ à $-0,731$) et avec les sucres solubles ($-0,167$ à $-0,875$) tandis que l'humidité est corrélée positivement avec tous les paramètres ($0,188$ à $0,894$) et pendant toutes les saisons (Tableau IV).

Le taux effectif d'élevage (ERR) est plus élevé pour T9 en été et en hiver (suivi dans l'ordre décroissant par T8, T2, T6, T4, T10 et T7 pendant l'été et par T8, T11, T5, T4 et T10 pendant l'hiver). Pendant la saison des pluies, cependant, T6 donne des valeurs d'ERR plus élevées qui ne diffèrent pas de manière significative de T9 et des autres traitements. Le poids d'un cocon est plus élevé pour T9 pendant les trois saisons (1,86 ; 2,03 et 1,51 g) et ne diffère pas de manière significative de T6 et T4 en été et de T10 et de T2 pendant l'hiver (Tableau V).

DISCUSSION

La conservation de la feuille pendant de longues durées entraîne la dégradation des protéines en acides aminés et de l'amidon en sucres et rend les produits cataboliques disponibles pour le métabolisme (Narasimha Murthy et coll., 1987). Cela se voit clairement pour les traitements secs, qui donnent des valeurs plus faibles en protéines et en sucres dans la feuille. Cependant, avec les traitements humides, les protéines et les produits sucrés dégradés sont susceptibles d'être conservés pendant des périodes plus longues grâce à des taux d'utilisation plus faibles (Himantharaj et coll., 1995) comme on peut le voir clairement pour T9. La croissance et le développement des insectes sont aussi corrélés avec la teneur en eau et en azote des feuilles (Tingey et Singh 1980, Scriber 1982). Soo-Ho Lim et coll., (1990) ont prouvé que 88,2 % de la mortalité larvaire est due à la mauvaise qualité des feuilles données pendant toute la période d'élevage, dont 71,4% sont dus à la mauvaise qualité des feuilles données uniquement pendant le 1^{er} âge. Chaluvachari et Bongale (1994 ; 1996) ont enregistré des corrélations positives entre la rétention d'humidité de la feuille et le poids larvaire et le taux de mue pour les jeunes vers à soie, tandis que Bongale et Chaluvachari (1993) ont constaté l'influence des protéines de la feuille et de la teneur en sucres sur la richesse soyeuse. On peut observer que les feuilles conservées dans un pot enfoui dans du sable mouillé donnent les meilleurs résultats parmi tous les traitements et pour les paramètres étudiés pendant les trois saisons. Les données sur

les paramètres biochimiques de la feuille et sur les coefficients de corrélation confirment aussi ces observations (Tableau IV).

L'humidité de la feuille, les teneurs en protéines et en sucres sont élevées pendant la saison des pluies, suivies par celles de l'été, par celles de l'hiver ; ce qui confirme les performances des évaluations biologiques pour le poids larvaire, l'ERR et le poids du cocon pendant les saisons respectives. La variabilité saisonnière enregistrée pour la feuille et les paramètres d'élevage dans cette étude confirment aussi les observations de Bongale et Chaluvaachari (1993). Parmi les différentes méthodes évaluées dans cette étude, T9 donne l'humidité la plus élevée (soit 34,31 ± 9,76 et 19,67 % de plus que T5 pendant respectivement l'été, la saison des pluies et l'hiver) pendant toutes les saisons. Le maintien des conditions suggérées de température inférieure à 20° C et d'humidité relative supérieure à 90 %. (Ullal et Narasimhanna, 1978), cependant, est bien des fois impossible sous les tropiques, qui subissent de fréquentes variations de climat, qui influencent la qualité de la feuille, et à son tour la performance d'élevage. Parmi les méthodes utilisées dans cette étude, les traitements humides (en l'occurrence T2, T4, T6, T8 et T9) donnent les températures les plus basses, ce qui est attribué au refroidissement dû à l'évaporation (Mack O' Narth, 1984). Cependant, le degré de refroidissement et sa variabilité entre les traitements dépendent du ratio surface exposée / volume, du matériel utilisé, de la température ambiante, de l'humidité et de la fréquence d'humidification. Le ratio surface / volume (68 : 32) et la capacité de rétention de l'eau (13 à 14 %) étant maximums pour T9, ce sont des avantages supplémentaires pour augmenter l'efficacité de refroidissement. Pendant l'été, à cause de la température ambiante élevée (31,3° C) et de la faible humidité (59 %) le taux d'évaporation augmente et facilite le refroidissement maximum de 6,2° C (Tableaux I et II).

On peut conclure que la conservation des feuilles tendres pour les jeunes larves dans des pots en terre enfouis dans du sable mouillé permet d'obtenir les valeurs les plus élevées pour le poids du corps et donne les meilleurs résultats par rapport aux autres traitements à la fois pour la qualité de la feuille et l'évaluation biologique. Le stockage des feuilles sous une toile de jute mouillée est en général meilleur que la conservation à l'air libre.

DEVELOPMENT OF A TALC BASED BIOFUNGICIDE USING *TRICHODERMA HARZIANUM* AND ITS EFFECT ON MULBERRY ROOT ROT DISEASE

T. PHILIP*, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH

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

Root rot disease of mulberry caused by *Fusarium solani* and *F. oxysporum* is a major problem in many sericultural areas of India. The disease causes sudden leaf withering, defoliation and death of plants. Efforts have been made to control the disease biologically. The efficacy of a bioformulation of *Trichoderma harzianum* grown on potato-yeast-sugar media and delivered into soil through talc as the base material, against the disease, the survival of pathogens and the biocontrol agent in the soil and the shelf life of the bioformulation have been investigated. In the talc based bioformulation, there was 40 and 110×10^6 colony forming units/gram after 90 days of storage at room temperature and in a refrigerator (4° C) respectively. In the field the bioformulation helped to reduce the population of *F. solani* and *F. oxysporum* by about 85% and it has controlled the disease by about 75%. There was no significant reduction in the efficiency of the bioformulation to control the disease even after 90 days of storage at room temperature. The efficacy of the product can be attributed to the rhizosphere competence of *Trichoderma* which is known to produce active metabolites such as lytic enzymes, chitinase, glucanase, harziadinole and an antibiotic "trichodermin", which kill many soil pathogens.

Keywords: Mulberry, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, biocontrol, *Trichoderma harzianum*.

INTRODUCTION

Biological control of plant diseases has gained much importance in recent years due to the awareness about the deleterious effects of chemical pesticides on beneficial microbes, environment and humans (Baker and Cook, 1974; Papavizas, 1985; Lifshitz *et al.*, 1986). Several studies on soil and phylloplane micro-organisms point to their utility as biocontrol agents (Mukerji, 1983; Chet, 1987; Prasad and Rao, 1993). Among soil antagonists several species of *Trichoderma* were proved as good biocontrol agents against a wide range of diseases on many crops (Elad *et al.*, 1980; Bell *et al.*, 1982; Mukhopadhyay, 1987). This paper presents the results of a study conducted to manage root rot disease of mulberry caused by *Fusarium solani* and *F. oxysporum* using a talc based formulation of *Trichoderma harzianum* grown on a newly developed media.

* Central Sericultural Research & Training Institute, Research Extension Centre, Central Silk Board, Ministry of Textiles – Govt. Of India, Kidangoor P. O. Angamaly – 683 572, Ernakulam, Kerala, India.

MATERIALS AND METHODS

Development of media and mass production of *T. harzianum*:

T. harzianum isolate No. 1, which in our earlier study (Philip *et al.*, 1994-95) was found highly antagonistic to mulberry root rot pathogens *Fusarium solani* and *F. oxysporum* were grown on potato powder-yeast – sugar media. The liquid media was inoculated with two *Trichoderma* plugs of 4 mm diameter grown on potato dextrose agar and kept for incubation at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ for ten days. *T. harzianum* biomass grown in potato powder – yeast – sugar media was harvested on 10th day and blended in a mixer along with the filtrate.

The content was incorporated into talc powder (500 ml to 1 kg talc powder) and mixed thoroughly. The paste form of *T. harzianum* was kept for air drying, powdered and mixed with carboxy methyl cellulose (5 gm per kg). The initial colony forming units (cfu)/gm in the talc based formulation was assessed by the dilution plate method (Waksman, 1927). Subsequently samples were drawn and tested at 15 days intervals to determine the shelf life of the formulation.

Field testing of the biofungicide:

The biofungicide thus prepared was tested in a field infested with the root rot disease to find its effect to control the disease. To ensure the presence of sufficient pathogen inoculum in the soil, *F. solani* and *F. oxysporum* grown on corns and meal media were incorporated into the soil before taking up the experiment. One kg bioformulation of *T. harzianum* was mixed with 50 kgs of well decomposed, finely powdered farmyard manure and kept in the form of a heap. The heap was moistened with water and covered with perforated paper for one week under the shade of a tree for multiplication of the antagonist. 500 g of this mixture was applied in each planting pit and healthy S36 mulberry saplings were planted immediately. Following plantation, regular irrigation and cultural operations were attended as recommended by CSRTI, Mysore.

Plots inoculated with the pathogens were kept as control. Each treatment and control was replicated ten times. Root rot incidence was scored three months after planting. The plants were uprooted and the number of infected plants and the degree of root rot infection was recorded as per Sharma and Pathak (1994).

From the percent incidence in control plot (PC) and treatment (PT), the percent protection (PP) was calculated as follows

$$PP = \frac{PC - PT}{PC} \times 100$$

Soil sampling and isolation of pathogens and antagonist:

Soil samples were collected at 15 days intervals upto 75th day from 5 spots on each biofungicide applied and control plots. The samples were air-dried, compacted and thoroughly mixed. Colonies of the pathogens as well as *T. harzianum* were counted /g dry soil in Czapek's Dox Agar media following the dilution plate technique (Waksman, 1927) and percentage decrease in the colonies of pathogens was calculated and presented in Table I. Similarly, the survival of *T. harzianum* in the soil was also counted at every 15 days intervals (Table II). Shelf life of the biofungicide was determined by counting the cfu/g in the biofungicide kept at room temperature ($28 \pm 2^\circ \text{C}$) and in a refrigerator (4°C) at every 15 days intervals.

RESULTS

The effect of *T. harzianum* on survival of *F. solani* and *F. oxysporum* infested soil are presented in Table I. In control plots the number of cfu of *F. solani* and *F. oxysporum* per gram of soil was 267 and 249×10^6 respectively initially, decreasing to 186 and 176 respectively by the end of the 75th

day. Percentage decrease was 30.33 and 29.32 respectively. *T. harzianum* amendment led to a marked reduction in the pathogen's survivability. In plots amended with *T. harzianum*, the pathogen density decreased drastically and at the 75th day there was only 40 and 32×10^6 cfu/g soil showing a reduction of 84.5 and 86.44% respectively of *F. solani* and *F. oxysporum*.

Talc based biofungicide of *T. harzianum* initially showed 310×10^6 cfu/g, gradually decreasing to 40 on 90th day when kept at room temperature (reduction 87%), while in those kept at low temperature (4° C) the cfu was 110 on 90th day (reduction 64.5%). The cfu was maintained at the same level for about 15-20 days after which there was a gradual reduction in both conditions.

When talc based biofungicide was mixed with farmyard manure and applied in the field, there was a sudden increase in the cfu recovered from the soil by the 15th day, thereby gradually decreasing and on the 75th day 105×10^6 cfu/g dry soil was recovered where *F. solani* was inoculated, while in *F. oxysporum* inoculated soil, it was 101×10^6 (Table II).

Table I. Survival of *F. solani* and *F. oxysporum* in inoculated soil amended with *T. harzianum*.

Tableau I. Survie de *F. solani* et *F. oxysporum* dans un sol inoculé amendé avec *T. harzianum*.

Treatment	cfu/g soil (× 10 ⁶)						% reduction after 75 days
	Days after treatment						
	Start	15	30	45	60	75	
Traitement	cfu/g sol (× 10 ⁶)						% de baisse après 75 jours
	Jours après le traitement						
	Début	15	30	45	60	75	
Control / Témoin							
<i>F. solani</i>	267	247	222	211	193	186	30.33
<i>F. oxysporum</i>	249	230	214	199	184	176	29.32
Treated with <i>T. harzianum</i> / Traité avec <i>T. harzianum</i>							
<i>F. solani</i>	258	217	141	98	66	40	84.5
<i>F. oxysporum</i>	236	201	138	87	44	32	86.44

CD at 5% / DC à 5 %

Treatment / Traitement

-- 3.869**

Days / Jours

-- 4.738**

Treatment $\times$ days / Traitements $\times$ jours

-- 9.477**

Table II. Population density of *T. harzianum* (cfu $\times 10^6$ /g dry soil) in *F. solani* and *F. oxysporum* infested soil.

Tableau II. Densité de la population de *T. harzianum* (cfu $\times 10^6$ /g de sol sec) dans le sol infesté par *F. solani* et *F. oxysporum*.

Days after treatment	cfu/g of <i>T. harzianum</i> in soil inoculated with	
<i>Jours après le traitement</i>	cfu/g de <i>T. harzianum</i> dans le sol inoculé avec	
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Initial / <i>Début</i>	310	310
15	443	396
30	210	205
45	175	164
60	145	133
75	105	101
CD at 5% / DC à 5 %	13.967 **	13.414 **

Table III. Effect of biofungicide on root rot disease.

Tableau III. Effet du biofungicide sur la maladie du pourrissement de la racine.

Treatment	No. of plants treated	No. of plants affected by the disease	% disease	% disease control over check
<i>Traitement</i>	<i>Nbre de plants traités</i>	<i>Nbre de plants atteints par la maladie</i>	<i>% de maladie</i>	<i>% de lutte contre la maladie par rapport au témoin</i>
Control (inoculated with <i>F. solani</i>) <i>Témoin (inoculé avec F. solani)</i>	180	76	42.22	-
Inoculated with <i>F. solani</i> and treated with biofungicide <i>Inoculé avec F. solani et traité avec le biofungicide</i>	180	19	10.55	75.01
Inoculated with <i>F. oxysporum</i> (control) <i>Inoculé avec F. oxysporum (témoin)</i>	180	70	38.88	-
Inoculated with <i>F. oxysporum</i> and treated with biofungicide <i>Inoculé avec F. oxysporum et traité avec le biofungicide</i>	180	17	9.44	75.72
CD at 5%	6.004 **			

Application of *T. harzianum* in the form of biofungicide has considerably reduced the root rot disease of mulberry. In each control plot, out of 180 plants 76 and 70 plants were affected by root rot caused by *F. solani* and *F. oxysporum* respectively. Percentage disease was 42.22 and 38.88 against *F. solani* and *F. oxysporum* and disease control was 75 and 76% respectively (Table III). The bioformulation preserved at room temperature for 90 days has shown nearly equal efficacy to control the disease.

DISCUSSION

In the present study, talc based biofungicide was prepared by multiplying *T. harzianum* in a newly evolved media. The growth of the antagonist was found very quick in this media and the biomass was ready for harvest after 10 days. In plots previously inoculated with the pathogen, *T. harzianum* has provided significant protection (about 75%) against the disease. This is in confirmation to our earlier studies on this isolate which revealed very high antagonism against both *F. solani* and *F. oxysporum*. The efficacy can be attributed to the rhizosphere competence of *Trichoderma* which is known to produce active metabolites such as lytic enzymes, chitinases, gluconases, harziadinole and a sesquiterpene antibiotic "trichodermin" which kill many pathogenic fungi (Chet, 1987; Sivan and Chet, 1989).

The study also revealed the utility of talc as carrier of *T. harzianum* to the soil, which was able to maintain a significant number of viable colonies in the soil even after 90 days. The initial increase in the cfu of *T. harzianum* in pathogen infested soil could be due to the availability of rich organic content in the form of farm yard manure mixed with the biofungicide. The antagonist also considerably reduced the viable colonies of *F. solani* (84.5%) and *F. oxysporum* (86.44%) in the soil after 75 days of application. Elad *et al.*, (1980) have observed a positive correlation between the ability of biocontrol agent to suppress the growth of a pathogen and its biocontrol efficacy.

Talc has been used as carriers for *Trichoderma* by various workers (Ramakrishnan *et al.*, 1994; Jeyarajan and Ramakrishnan, 1991; Jeyarajan *et al.*, 1991). It was also found that *T. harzianum* population in the talc based biofungicide was maintained for about 15 days after storage at room temperature, thereafter gradually decreasing. After 90 days of storage at room temperature, there was a decrease of 87% in viable colonies while at a low temperature there was a decrease of only 65% colonies. Ramakrishnan *et al.*, (1994) found 8×10^7 cfu/g in the talc based formulation of *T. viride* after 120 days of storage. In the present study there was 40×10^6 cfu/g of the bioformulation after 90 days of storage at room temperature and 100×10^6 at 4°C. The results show that the formulation can be stored for about three months at room temperature and 6 months under refrigeration without losing its viability.

Thus the study shows that mulberry can be protected from the attack of root rot causing pathogens *F. solani* and *F. oxysporum* by the application of *T. harzianum* in the soil in the form of biofungicide mixed with well decomposed, finely powdered farm yard manure.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Dr R. K. Datta, Director, CSRTI, Mysore for providing the facilities for the study and to Ms M. Rekha for help in statistical analysis.

REFERENCES

- BAKER K. F. & COOK R. J. 1974, Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman, San Francisco.
- BELL D. K., WELLS H. D. & MARKHAM C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against fungal plant pathogens. Phytopathology. 72(4) 379-382.

- CHET I. 1987 *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. In: I. Chet (Ed) Innovative approaches to plant disease control (New York). John Wiley and Sons. Pp. 137-160.
- ELAD Y., CHET I. & KATAN J. 1980 *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70, 119-121.
- JEYARAJAN R. & RAMAKRISHNAN G. 1991 Efficacy of *Trichoderma* formulations against root rot disease of grain legumes. Petria 1, 137-138.
- JEYARAJAN R. & RAMAKRISHNAN G., RAJAMANICKAM B. & SANGEETHA. 1991 Field demonstration of efficacy of *Trichoderma* as biocontrol agent for root rot disease of grain legumes and oil seeds. Petria 1, 143.
- LIFSHITZ, WINDHAM M. T. & BAKER R. 1986 Mechanism of biological control of pre-emergence damping –off of pea seed treatment with *Trichoderma* spp. Phytopathology, 76, 720-725.
- MUKERJI K. G. 1983 Biocontrol of plant diseases. In: Recent advances in Plant Pathology (Eds. A. Husain, B. P. Singh, K. Singh & V. P. Agnihotri). Print Home (India) Lucknow pp 11-19.
- MUKHOPADHYAY A. N. 1987 Biological control of soil-borne diseases of vegetables and pulses by *Trichoderma* spp. Indian Phytopath. 40: 276-277.
- PAPAVIZAS G. C. 1985 *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Of Phytopathology 23, 23-54.
- PHILIP T., SHARMA D. D. & GOVINDAIAH (1994-95) Annual report CSRTI, Mysore pp. 42-43.
- PRASAD, SREENIVASA S. & K. MANIBHUSHAN RAO 1993 Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of ground nut root and stem rot diseases. Int. J. Pest Management 39(2) 167-171.
- RAMAKRISHNAN G., R. JEYARAJAN & D. DINAKARAN 1994 Talc-based formulation of *Trichoderma viride* for biocontrol of *Macrophomina phaseolina*. J. Biol. Control 8(1) 41-44.
- SHARMA B. S. & PATHAK V. N. 1994 Yield and sucrose losses in sugar beat due to root rot. Indian Phytopath. 47, 408-411.
- SIVAN A. & CHET I. 1989 The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *F. oxysporum* on rhizosphere colonisation. Phytopathology. 79: 198-200.
- WAKSMAN S. A. 1927 Principles of soil microbiology. Baltimore Williams and Wilkins W., USA.

MISE AU POINT D'UN BIOFONGICIDE A BASE DE TALC UTILISANT *TRICHODERMA HARZIANUM* ET SON EFFET SUR LA MALADIE DU POURRISSEMENT DE LA RACINE DE MURIER

T. PHILIP*, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH

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

La maladie du pourrissement de la racine du mûrier provoquée par *Fusarium solani* et *F. oxysporum* est un problème majeur dans de nombreuses zones séricicoles en Inde. La maladie entraîne un flétrissement soudain de la feuille, une défoliation et la mort des plantes. Des efforts ont été faits pour lutter contre la maladie de manière biologique. Nous avons étudié l'efficacité contre la maladie de la bio-formulation de *Trichoderma harzianum* cultivée sur un milieu sucre-levure-pomme de terre et placée dans le sol en utilisant du talc comme matériel de base, la survie des pathogènes et de l'agent de lutte biologique dans le sol et la durée de vie de la bioformulation. Dans la bioformulation à base de talc, il y a respectivement 40 et 110×10^6 unités formant des colonies / g de talc à température ambiante et au réfrigérateur (4° C). Sur le terrain, la bioformulation permet de réduire la population de *F. solani* et de *F. oxysporum* d'environ 85 % et elle permet de lutter contre la maladie à 75 % environ. Il n'y a pas de baisse significative de l'efficacité de la bioformulation même après 90 jours de stockage à température ambiante. L'efficacité du produit peut être attribuée à la compétence de *Trichoderma* à la rhizosphère, que l'on sait produire des métabolites actifs tels que les enzymes lytiques, la chitinase, la glucanase, l'harziadinole et un antibiotique " le trichodermin ", qui tuent de nombreux pathogènes du sol.

INTRODUCTION

La lutte biologique contre les maladies des plantes a pris beaucoup d'importance ces dernières années parce qu'on a pris conscience des effets nocifs des pesticides chimiques sur les microbes bénéfiques, l'environnement et les êtres humains (Baker et Cook, 1974 ; Papavizas, 1985 ; Lifshitz et coll., 1986). Plusieurs études sur les micro-organismes du sol et de la phylloplane indiquent leur utilité comme agents de lutte biologique (Mukerji, 1983; Chet, 1987 ; Prasad et Rao, 1993). Parmi les antagonistes du sol plusieurs espèces de *Trichoderma* se révèlent de bons agents de lutte biologique contre un grand nombre de maladies atteignant plusieurs cultures (Elad et coll., 1980 ; Bell et coll., 1982 ; Mukhopadhyay, 1987). Cet article présente les résultats d'une étude réalisée pour lutter contre la maladie du pourrissement de la racine de mûrier provoquée par *Fusarium solani* et *F. oxysporum* en utilisant une formulation à base de talc de *Trichoderma harzianum* cultivé sur un nouveau milieu mis au point.

* Central Sericultural & Training Institute, Research Extension Centre, Central Silk Board, Ministry of Textiles - Govt. of India, Kidangoor P O. Angamaly - 683 572, Ernakulam, Kerala, Inde.

MATERIELS ET METHODES

Mise au point des milieux et production en masse de *T. harzianum* :

Les isolats no. 1 de *T. harzianum*, qui ont été trouvés très antagonistes dans notre étude précédente (Philip et coll., 1994-95) contre les pathogènes du pourrissement de la racine de mûrier, *Fusarium solani* et *F. oxysporum*, ont été cultivés sur des milieux sucre-levure-pomme de terre en poudre. Les milieux liquides ont été inoculés avec deux disques de *Trichoderma* de 4 mm de diamètre d'une culture sur une gélose de dextrose de pomme de terre et conservé en incubation à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant dix jours. La biomasse de *T. harzianum* cultivé sur un milieu sucre-levure-poudre de pomme de terre est recueillie le 10^{ème} jour et mélangée dans un mixeur avec le filtrat.

Le contenu est incorporé dans du talc (500 ml à 1 kg de talc en poudre) et mélangé avec soin. La pâte de *T. harzianum* est séchée à l'air, réduite en poudre et mélangée avec de la carboxy-méthyl-cellulose (5 g par kg). Les unités de formation de la colonie initiale (cfu)/g dans la formulation à base de talc sont évaluées d'après la méthode de dilution sur plaque (Waksman, 1927). Par la suite des échantillons sont retirés et testés tous les 15 jours pour déterminer la durée de vie de la formulation.

Test du biofongicide sur le terrain :

Le biofongicide ainsi préparé est testé sur le terrain dans un champ infesté par la maladie du pourrissement de la racine pour évaluer son effet contre la maladie. Pour s'assurer de la présence de suffisamment d'inoculum du pathogène dans le sol, *F. solani* et *F. oxysporum* sont cultivés dans un milieu de farine de maïs et sont incorporés dans le sol avant d'entreprendre l'expérience. Un kg de bioformulation de *T. harzianum* est mélangé avec 50 kgs de fumier de ferme bien décomposé, finement émietté et conservé en tas. Le tas est humidifié avec de l'eau et recouvert avec du papier perforé pendant une semaine à l'ombre d'un arbre pour la multiplication de l'antagoniste. 500 g de ce mélange sont appliqués dans chaque trou de plantation et des jeunes plants sains de mûrier S36 sont plantés immédiatement. Suite à la plantation, on procède à une irrigation régulière et aux opérations d'entretien des cultures d'après les recommandations du CSR&TI de Mysore.

Les parcelles inoculées avec les pathogènes sont conservées comme témoins. Chaque traitement et témoin est répété dix fois. On calcule l'incidence du pourrissement de la racine trois mois après la plantation. Les plants sont déracinés et le nombre de plants infestés et le degré de pourrissement de la racine est enregistré d'après Sharma et Pathak (1994).

D'après le pourcentage d'incidence dans la parcelle témoin (PC) et dans la parcelle traitée (PT), le pourcentage de protection (PP) est calculé comme suit :

$$PP = \frac{PC - PT}{PC} \times 100$$

Echantillonnage du sol et isolement des pathogènes et de l'antagoniste :

Les échantillons du sol sont recueillis tous les 15 jours jusqu'au 75^{ème} jour à 5 endroits différents dans les parcelles où le biofongicide est appliqué et dans les parcelles témoins. Les échantillons sont séchés à l'air, compactés et mélangés avec soin. Les colonies de pathogènes et de *T. harzianum* sont comptées / g de sol sec dans un milieu agar de Czapek Dox selon la technique de dilution sur plaque (Waksman, 1927) et la baisse en pourcentage des colonies de pathogènes est calculée et présentée dans le Tableau I. De même, la survie de *T. harzianum* dans le sol est aussi mesurée tous les 15 jours (Tableau II). La durée de vie du biofongicide est déterminée en comptant les cfu/g dans le biofongicide gardé à température ambiante ($28 \pm 2^\circ \text{C}$) et dans un réfrigérateur (4°C) tous les 15 jours.

RESULTATS

L'effet de *T. harzianum* sur la survie de *F. solani* et de *F. oxysporum* dans le sol infesté est présenté dans le Tableau I. Dans les parcelles témoins le nombre de cfu de *F. solani* et de *F. oxysporum* par gramme de sol est respectivement de 267 et 249×10^6 au début et il descend respectivement à 186 et 176 à la fin du 75^{ème} jour. Le % de baisse est respectivement de 30,33 et de 29,32. L'amendement avec *T. harzianum* entraîne une baisse marquée de la survie du pathogène. Dans les parcelles amendées avec *T. harzianum*, la densité du pathogène baisse énormément et à la fin du 75^{ème} jour il y a seulement 40 et 32×10^6 cfu/g de sol soit une réduction respectivement de 84,5 et 86,44% pour *F. solani* et *F. oxysporum*.

Le biofongicide *T. harzianum* à base de talc donne au départ 310×10^6 cfu/g, et quand on le garde à température ambiante cela baisse progressivement jusqu'à 40 le 90^{ème} jour (baisse de 87 %), tandis que quand on le garde au froid (4° C) il y a 110 cfu le 90ème jour (baisse de 64,5 %). Le nombre de cfu est maintenu au même niveau pendant environ 15 à 20 jours, après quoi il y a une baisse progressive dans les deux conditions.

Quand le biofongicide à base de talc est mélangé avec du fumier de ferme et appliqué sur le terrain, il y a une soudaine augmentation du nombre des cfu récupérées dans le sol le 15^{ème} jour, puis une baisse progressive et le 75^{ème} jour 105×10^6 cfu/g sol sec sont récupérées là où *F. solani* a été inoculé, tandis que dans le sol inoculé avec *F. oxysporum*, il y en a 101×10^6 (Tableau II).

L'application de *T. harzianum* sous forme de biofongicide diminue considérablement la maladie de pourrissement de la racine de mûrier. Dans chaque parcelle témoin, sur 180 plants 76 et 70 plants sont affectés par le pourrissement de la racine provoqué respectivement par *F. solani* et *F. oxysporum*. Le pourcentage de maladie de *F. solani* et de *F. oxysporum* est de 42,22 et 38,88 et la réduction de la maladie est respectivement de 75 et 76 % (Tableau III). La bioformulation conservée à température ambiante pendant 90 jours est presque aussi efficace pour lutter contre la maladie.

DISCUSSION

Dans cette étude, le biofongicide à base de talc est préparé en multipliant *T. harzianum* dans un nouveau milieu mis au point. La croissance de l'antagoniste s'avère très rapide dans ce milieu et la biomasse est prête pour la récolte au bout de 10 jours. Dans les parcelles précédemment inoculées avec le pathogène, *T. harzianum* offre une protection significative (environ 75 %) contre la maladie. Cela confirme nos études précédentes sur cet isolat qui ont révélé un antagonisme très élevé à la fois contre *F. solani* et contre *F. oxysporum*. L'efficacité peut être attribuée à la compétence de *Trichoderma* à la rhizosphère qui est connu pour sa production de métabolites actifs tels que les enzymes lytiques, les chitinases, les glucanases, l'harziadinole et un antibiotique sesquiterpène le "trichodermin" qui tue de nombreux champignons pathogènes (Chet, 1987 ; Sivan et Chet, 1989).

L'étude révèle aussi l'utilité du talc comme porteur de *T. harzianum* dans le sol, qui est capable de maintenir un nombre significatif de colonies viables dans le sol même après 90 jours. L'augmentation initiale des cfu de *T. harzianum* dans le sol infesté par le pathogène pourrait être due à la présence d'un contenu organique riche obtenu grâce au fumier de ferme mélangé avec le biofongicide. L'antagoniste réduit aussi considérablement les colonies viables de *F. solani* (84,5 %) et de *F. oxysporum* (86,44 %) dans le sol 75 jours après l'application. Elad et coll., (1980) ont observé une corrélation positive entre la capacité de l'agent de lutte biologique à supprimer la croissance d'un pathogène et son efficacité en lutte biologique.

Le talc a été utilisé comme porteur de *Trichoderma* par plusieurs chercheurs, (Ramakrishnan et coll., 1994 ; Jeyarajan et Ramakrishnan, 1991 ; Jeyarajan et coll., 1991). On a aussi trouvé que la population de *T. harzianum* dans le biofongicide à base de talc se maintient pendant environ 15 jours après le stockage à température ambiante, et baisse ensuite. Après 90 jours de stockage à température ambiante, il y a une baisse de 87 % des colonies viables tandis qu'à faible température il y a une baisse

des colonies de seulement 65 %. Ramakrishnan et coll., (1994) ont trouvé 8×10^7 cfu/g dans la formulation à base de talc de *T. viride* après 120 jours de stockage. Dans cette étude, il ya 40×10^6 cfu/g dans la bioformulation après 90 jours de stockage à température ambiante et 100×10^6 à 4° C. Les résultats montrent que la formulation peut être stockée pendant environ trois mois à température ambiante et 6 mois au réfrigérateur sans perdre sa viabilité.

Ainsi cette étude montre que le mûrier peut être protégé de l'attaque du pourrissement de la racine provoquée par les pathogènes *F. solani* et *F. oxysporum* grâce à l'application de *T. harzianum* dans le sol sous la forme de biofongicide mélangé à du fumier de ferme finement émietté et bien décomposé.

A SIMPLE PROTOCOL FOR RAPID AND EFFICIENT ISOLATION OF PROTOPLAST FROM CALLUS CULTURES OF MULBERRY (*MORUS INDICA* L.) CV. S13

U. PAVAN, A. V. RAO, V. YASHODHARA, N. RAMA SWAMY & A. SADANANDAM*

Plant Biotechnology Research Unit, Department of Botany, Kakatiya University,
Warangal – 506 009, India.

*Callus cultures were initiated from mature nodal segments of mulberry (*Morus indica* L.) cultivar S13 on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg l^{-1} 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T). Protoplasts were isolated from 20 days old callus cultures incubated in digestion solution containing 0.25% of macerozyme R-10 and 1% of cellulase "Onozuka" R-10 after 4h of digestion. Furthermore, a new procedure is developed for isolation and purification of mulberry callus protoplasts.*

Keywords : *Morus indica* cv. S13, callus cultures, protoplast isolation.

INTRODUCTION

Fusion of protoplasts of mesophyll and callus origin is the most frequently used method for somatic hybridisation (Medgysey, 1990). The successful outcome of somatic hybridisation, whether it is to produce nuclear hybrids, limited gene transfer or cytoplasmic hybrids will depend on a basic knowledge of protoplast isolation. When attempting the isolation of protoplast, the constituents of the digestion solution play a significant role and any perturbation of this renders the protoplast yield ineffective.

In mulberry most of the protocols available to date to isolate either mesophyll protoplasts (Tewary and Lakshmisita, 1992; Chand *et al.*, 1996; Tohjima *et al.*, 1996) or callus protoplasts (Tewary and Lakshmisita, 1992; Tewary *et al.*, 1995; Chand *et al.*, 1996) involve prolonged incubation period (12-13h) with higher concentrations of macerozyme (1%) and cellulase (2%) in the digestion solution. In relation to the use of subcultured callus for protoplast isolation the freshly growing callus may possess the advantage that, it may give genetic stability and presumably little somaclonal variation is generated which may be greater when subcultured callus is used. Earlier it was found that when protoplasts were isolated from mulberry callus after subculture, the yield decreased compared with that in the primary culture (Ohnishi and Kiyama, 1989; Tewary *et al.*, 1995). Apart from subcultured callus the use of cell suspension culture is also avoided here to isolate protoplasts. This is because the suspension culture may accumulate changes in ploidy and mutations due to somaclonal variation (Larkin & Scowcroft, 1981; Hoffman *et al.*, 1994).

In this paper we report a protocol for quick (4h) isolation of protoplasts from callus cultures of mulberry (*Morus indica* L.) cv. S13 developed on 1 mg l^{-1} 2,4,5-T. Moreover, the possibility of using lower concentration of macerozyme and cellulase is also determined here for the first time. We also extend the protocol towards the purification of protoplasts, resulting in a procedure that may be applicable for isolating protoplasts from mesophyll cells in mulberry.

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

Initiation of callus cultures:

To initiate callus cultures, 2-4 cm nodal explants were excised from 2-3 months old field grown mature plants. Explants were surface sterilized with aqueous solution of HgCl_2 (0.1%) for 5 min., followed by four or five rinses in sterile distilled water. Explants were cultured singly on full-strength MS media supplemented with 1 mg l^{-1} 2,4,5-T alone and gelled with 0.8% of Difco Bacto agar. Cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ \text{C}$ under a 16h photoperiod provided by cool white fluorescent lamps at a light intensity of $40\text{-}60 \text{ lux m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Protoplast isolation:

Preparation of enzyme stocks :

Enzymes added to the digestion solution included macerozyme and cellulase taken from filter sterile stocks maintained separately as given below:

10% cellulase (cellulase R-10 100 g/l + sucrose 137 g/l)

10% macerozyme (macerozyme R-10 100g/l + sucrose 137 g/l)

Protoplast Isolation Medium for Mulberry (PIM):

The digestion solutions were prepared in macro and micronutrients of the B5 medium (Gamborg *et al.*, 1968) additionally supplemented with 200 mg l^{-1} CaCl_2 , 200 mg l^{-1} myoinositol, 1.0 mg l^{-1} thiamine-HCL, 2.0 mg l^{-1} Ca-panthotenate, 2.0 mg l^{-1} nicotinic acid, 2.0 mg l^{-1} pyridoxine-HCL, 0.02 mg l^{-1} biotin, adjusted to pH of 5.8 with NaOH. PIM was filter sterilized (F-PIM) and used in the incubation process.

Twenty days old one gram friable callus derived from nodal segments grown on MS medium was gently broken into small pieces of cells in 2 ml of F-PIM. Incubation was carried out in 10 ml of digestion solution containing F-PIM, macerozyme and cellulase (mixed from their respective stock solutions under sterile conditions) with 0.5 M mannitol as osmoticum. Flasks were incubated at 27°C and 50 rpm for about 4h in dark. After incubation, protoplasts were passed through stainless steel sieve of $60 \mu\text{m}$. Filtrate was collected in a screw cap centrifuge tube and overlaid with 2 ml of filter sterilized PCM (F-PCM, Protoplast Culture Medium for Mulberry) containing F-PIM + 1.0 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} NAA + sucrose 20 g l^{-1} + glucose 65 g l^{-1} adjusted to pH 5.8 and centrifuged for 10 min. at 70 rpm (Step I). This resulted in the formation of two distinct bands. Moreover, pellet formation also occurred at the bottom of the tube. Both the bands and also the pellet were collected with Pasteur-pipettes in separate centrifuge tubes and the volume of each was increased up to exactly 10ml with F-PCM. Contents were carefully mixed once by inverting the tubes and then centrifuged for 10 min. at 50 rpm (Step II = Sedimentation). Pellet formed in each tube was collected and the supernatant was discarded. Pellets were resuspended in 3 ml of F-PCM and were used for microscopic investigations. The yield of protoplasts was determined with a hemocytometer. Isolated protoplasts were cultured with an equal volume of F-PCM.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of protoplast:

Our first efforts focused to isolate callus protoplasts in a cell wall digesting medium based on the B5 medium nutrients containing mannitol as osmoticum. In previous studies protoplasts were isolated from hypocotyl and cotyledon derived callus tissues of mulberry using 2% cellulase and 1% macerozyme with 0.7M mannitol, prepared in MS salts (Tewary *et al.*, 1995). Chand *et al.*, (1996) reported that 2% rhozyme, 1% cellulase and 0.03% macerozyme in CPW 13M resulted in better yield of protoplasts from cell suspension. Moreover, prolonged incubation periods of 12-13h (Tewary *et*

al., 1995) and 16h (Chand *et al.*, 1996) in dark was reported to be beneficial for isolating the protoplasts from aforesaid explants.

In the present investigation we have successfully isolated the protoplasts from callus tissues of mulberry cv. S13 using digestion solution containing lower concentrations of both macerozyme and cellulase prepared in B5 nutrients, using a very short period of 4h incubation in dark (Fig. 1 & 2). Only a mixture of macerozyme (250 μ l) and cellulase (1000 μ l) allows a yield of 6×10^6 protoplasts/g of callus tissue. In this mixture, the use of lower levels of cellulase (250, 500 & 750 μ l) decreased the protoplast yield (Tab. 1). Since, these enzymes are expensive and entail a relatively careful use, the protocol mentioned above is efficient to meet such a demand. In addition, the use of higher concentrations of enzymes in the digestion solution may show deleterious effect on protoplasts which are released early during incubation period, thereby decreasing the final yield.

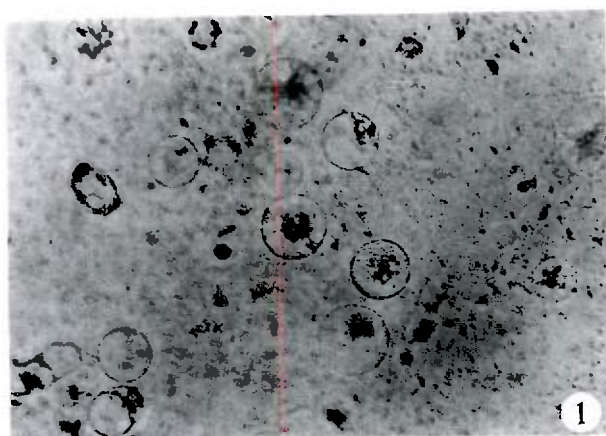


Fig. 1 & 2. Isolated primary callus derived protoplasts after 4h of incubation in the digestion solution containing 0.25% macerozyme and 1% cellulase.

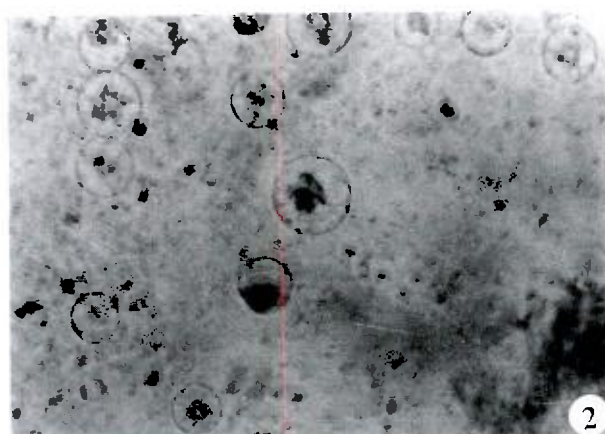


Fig. 1 & 2. Protoplastes isolés dérivés de cals primaires après 4 h d'incubation dans une solution de digestion contenant du macérozyme à 0,25% et de la cellulase à 1 %.

Table I. Protoplast yield in different concentrations of digestion solution isolated from 20 days old callus cultures of mulberry cv. S13.

Tableau I. Rendement en protoplastes isolés à partir de cultures de cal de mûrier de 20 jours du cv. S13 à différentes concentrations de solution de digestion.

Vol. of digestion solution (ml)	Digestion solution			Protoplast yield/ g of callus tissue ($\times 10^6$)
	F-PIM (ml)	Macerozyme (μ l)	Cellulase (μ l)	
<i>Vol. de digestion de la solution (ml)</i>	<i>Solution de digestion</i>			<i>Rendement en protoplastes / g de tissu de cal ($\times 10^6$)</i>
	<i>F-PIM (ml)</i>	<i>Macérozyme (μl)</i>	<i>Cellulase (μl)</i>	
10	9.50	250	250	—
10	9.25	250	500	1.2
10	9.00	250	750	3.4
10	8.75	250	1000	6.0

Purification of protoplast:

Protoplast purification is performed to remove undigested cell wall debris, traces of enzyme mixture and also the ruptured protoplasts. Centrifugation at 50-100g for 5-10 min. is repeated for 4-5 times to purify protoplasts from mulberry (Tewary *et al.*, 1995; Chand *et al.*, 1996). Extending and repeating the process of centrifugation may show a negative effect on protoplast viability (Mills and Hammerschlag, 1994). This may be attributed to the damage caused due to repeated centrifugation on the membrane integrity of the protoplast. In the present study protoplasts were therefore harvested by two step centrifugation process which may minimise the damage caused to the membrane integrity of the protoplast. Furthermore, Step I centrifugation resulted in direct separation of larger and smaller protoplasts in the form of two separate and distinct bands. Larger protoplasts were collected from upper band and smaller from the lower band. Moreover, the pellet containing the cell wall debris and ruptured protoplasts settled at the bottom during this process. Further purification of larger and smaller protoplasts was achieved during Step II centrifugation on washing with F-PCM. This was done to remove the traces of enzyme solution. Protoplast recovery was 82% and 75% for step I and step II centrifugation respectively. The above result confirms the earlier report of considerable variation in the size of protoplasts isolated from callus tissue (Tewary *et al.*, 1995). After purification the rate of impurity of the protoplast fraction is rarely seen. This suggests therefore that the preparation contains only pure protoplasts. Trials to induce growth and division of callus protoplasts were attempted using

F-PCM. More work is needed to find conditions permitting further growth and development of *in vitro* callus derived protoplasts.

Based on these observations and to our knowledge for the first time we describe the efficient protocol for isolation of protoplasts from callus cultures of mulberry. We have assessed the possibility of using lower concentrations of macerozyme and cellulase in the digestion solution to isolate *in vitro* callus derived protoplasts. Furthermore, *in vitro* callus cultures may offer potential for quick isolation of protoplasts in mulberry. The motivation for this study was the search for further improvements in protoplast isolation procedures and to use improved protocol for somatic fusion, plastid transformation studies and direct DNA transfer to protoplast in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr R. K. Datta, Director, CSR& TI, Mysore for providing mulberry cultivar. This work is supported by the Department of Biotechnology (BT/PRO 300/OSC/10/003/96), Government of India, New Delhi and the authors gratefully acknowledge the financial assistance. A.V.R. is grateful to CSIR, New Delhi for the award of Research Associateship.

REFERENCES

- CHAND P. K., SAHOO Y., PATNAIK S. K., PATNAIK S. N. (1996) Evaluation of procedures for interspecific protoplast fusion in mulberry. *Indian J. Seric.*, 35, 46-49.
- GAMBORG O. L., MILLER R. A., OHIMA K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 7, 151-158.
- HOFFMANN A., HALFTER U., MORRIS P. (1994) Transient expression in leaf mesophyll protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36, 53-58.
- LARKIN P. M., SCOWCROFT W. R. (1981) Somaclonal variation — a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. App. Genet.*, 60, 197-214.
- MEDGYSEY P. (1990) Selection and analysis of cytoplasmic hybrids, in *Plant cell line selection*, edited by PJ Dix (VCH, Weinheim) 287-316.
- MILLS D., HAMMERSCHLAG F. A. (1994) Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36, 99-105.
- OHNISHI T., KIYAMA S. (1987) Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56, 407-410.
- TEWARY P. K., LAKSHMISITA G. (1992) Protoplast isolation, purification and culture in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 32, 651-657.
- TEWARY P. K., MOHAN RAM H. Y., RANGASWAMY N. S. (1995) Isolation and culture of mulberry (*Morus alba* L.) protoplasts from callus tissues. *Indian J. Plant physiol.*, 38, 114-117.
- TOHJIMA F., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H. (1996) Effects of various enzymes on the efficiency of protoplast isolation from mulberry mesophylls. *J. Seric. Sci. Japan.*, 65, 485-489.

UN PROTOCOLE SIMPLE POUR L'ISOLEMENT DE PROTOPLASTES RAPIDE ET EFFICACE A PARTIR DE CULTURES DE CALS DE MURIER (*MORUS INDICA* L.) DU CV. S₁₃

U. PAVAN, A. V. RAO, V. YASHODHARA, N. RAMA SWAMY & A. SADANANDAM*

Plant Biotechnology Research Unit, Department of Botany, Kakatiya University,
Warangal – 506 009, Inde.

*Nous avons démarré des cultures de cals à partir de segments nodaux matures du cultivar de mûrier (*Morus indica* L.) S₁₃ sur du milieu Murashige et Skoog (MS) additionné avec 1 mg l⁻¹ d'acide 2, 4, 5 trichlorophenoxy acétique (2, 4, 5-T). Les protoplastes ont été isolés sur des cultures de cals de 20 jours incubés dans une solution de digestion contenant du macerozyme R-10 à 0,25 % et de la cellulase " Onozuka " R-10 à 1 % après 4 h de digestion. De plus, nous avons mis au point une nouvelle procédure d'isolement et de purification des protoplastes de cals de mûrier.*

INTRODUCTION

La fusion des protoplastes provenant du mésophylle et du cal est la méthode la plus fréquemment utilisée pour l'hybridation somatique (Medgysey, 1990). Le succès de l'hybridation somatique, que ce soit pour produire des hybrides nucléaires, le transfert de gènes limités ou des hybrides cytoplasmiques dépend de connaissances de base sur l'isolement des protoplastes. Quand on essaie d'isoler des protoplastes, les constituants de la solution de digestion jouent un rôle important et s'il y a une quelconque perturbation cela rend le rendement en protoplastes inefficace.

Chez le mûrier, la plupart des protocoles disponibles jusqu'à présent pour isoler soit les protoplastes du mésophylle (Tewary et Lakshmisita, 1992 ; Chand et coll., 1996 ; Tohjima et coll., 1996) soit les protoplastes du cal (Tewary et Lakshmisita, 1992 ; Tewary et coll., 1995 ; Chand et coll., 1996) nécessitent une période d'incubation prolongée (12 à 13 h) avec des concentrations très élevées en macerozyme (1 %) et en cellulase (2 %) dans la solution de digestion. Quand on utilise des sous-cultures de cals pour l'isolement de protoplastes, le cal venant de pousser pourrait avoir l'avantage de donner une stabilité génétique et vraisemblablement peu de variation somaclonale, alors que celle-ci serait plus importante quand on utilise une sous-culture de cal. On a trouvé précédemment que lorsque l'on isolait des protoplastes de cals de mûrier après une sous-culture, le rendement baissait comparé à celui de la culture primaire (Ohnishi et Kiyama, 1989 ; Tewary et coll., 1995). Nous avons évité ici l'utilisation de sous-cultures de cals et de cultures de cellules en suspension pour isoler les protoplastes. En effet, la culture en suspension pourrait accumuler des changements de ploïdie et des mutations dues à la variation somaclonale (Larkin & Scowcroft, 1981 ; Hoffman et coll., 1994).

Dans cet article, nous présentons un protocole d'isolement rapide (4 h) des protoplastes à partir de cultures de cals de mûrier (*Morus indica* L.) du cv. S₁₃ mis au point sur 2, 4, 5-T à 1 mg l⁻¹. De plus, nous envisageons ici pour la première fois la possibilité d'utiliser une concentration plus faible en macerozyme et en cellulase. Nous avons aussi étendu le protocole à la purification des protoplastes,

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

ce qui donne une procédure qui pourrait être appliquée à l'isolement des protoplastes de cellules à partir du mésophylle chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Démarrage des cultures de cals :

Pour commencer les cultures de cals, des explants nodaux de 2 à 4 cm sont excisés sur des plants adultes cultivés sur le terrain âgés de 2 à 3 mois. La surface des explants est stérilisée avec une solution aqueuse de HgCl_2 (0,1 %) pendant 5 minutes, puis on les rince quatre ou cinq fois dans de l'eau distillée stérile. Les explants sont cultivés séparément sur un milieu MS complet additionné de 2,4,5-T à 1 mg l^{-1} et gélifié avec une gélose Difco Bacto à 0,8 %. Les cultures sont maintenues à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ sous une photopériode de 16 h fournie par des lampes fluorescentes blanches froides dont l'intensité lumineuse est de $40\text{-}60 \text{ lux m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Isolement des protoplastes :

Préparation des enzymes mères :

Les enzymes ajoutées à la solution de digestion comprennent de la macérozyme et de la cellulase prises sur des bouillons stériles filtrés maintenus séparément comme suit :

10 % de cellulase (cellulase R-10 100 g/l + saccharose 137 g/l)

10 % de macérozyme (macérozyme R-10 100g/l + saccharose 137 g/l)

Milieu d'Isolement des Protoplastes pour le Mûrier (PIM) :

Les solutions de digestion sont préparées dans des macro et micro-nutriments du milieu B5 (Gamborg et coll., 1968) complétée avec 200 mg l^{-1} de CaCl_2 , 200 mg l^{-1} de myoinositol, 1 mg l^{-1} de thiamine-HCl, $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ de Ca-panthotenate, 2 mg l^{-1} d'acide nicotinique, 2 mg l^{-1} de pyridoxine-HCl, $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ de biotine, ajusté au pH de 5,8 avec NaOH. Le PIM est stérilisé par filtration (F-PIM) et utilisé dans le processus d'incubation.

Un gramme de cal friable de vingt jours dérivé de segments nodaux cultivés sur un milieu MS est coupé en petits bouts de cellules avec soin dans 2 ml de F-PIM. L'incubation est réalisée dans 10 ml de solution de digestion contenant du F-PIM, de la macérozyme et de la cellulase (mélangés à partir de leurs solutions mères respectives dans des conditions stériles) avec du mannitol à 0,5 M comme solution osmotique. Les flacons sont incubés à 27°C et 50 tpm pendant environ 4 h à l'obscurité. Après l'incubation, les protoplastes sont passés au travers d'un tamis dont la maille fait $60 \mu\text{m}$. Le filtrat est recueilli dans un tube pour centrifugeuse avec un bouchon qui se visse et recouvert avec 2 ml de PCM stérilisé et filtré (F-PCM, Milieu de Culture de Protoplaste pour Mûrier) contenant du F-PIM + 1 mg l^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA + 20 g l^{-1} de saccharose + 65 g l^{-1} de glucose ajusté à un pH de 5,8 et centrifugé pendant 10 minutes à 70 tpm (Etape I). Cela entraîne la formation de deux bandes distinctes. De plus, un culot se forme au fond du tube. Les deux bandes et le culot sont recueillis avec des pipettes Pasteur dans des tubes à centrifugeuse séparés et on augmente le volume de chacun jusqu'à exactement 10 ml avec du F-PCM. Le contenu est soigneusement mélangé une fois en retournant les tubes puis centrifugé 10 minutes à 50 tpm (Etape II = Sédimentation). Le culot formé dans chaque tube est recueilli et le surnageant est jeté. Les culots sont resuspendus dans 3 ml de F-PCM et sont utilisés pour des observations microscopiques. Le rendement en protoplastes est déterminé avec un hémocytomètre. Les protoplastes isolés sont cultivés dans un volume égal de F-PCM.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolement des protoplastes :

Nos premiers efforts ont consisté à isoler les protoplastes du cal dans un milieu digérant les parois des cellules constitué à partir de nutriments du milieu B5, contenant du mannitol comme substance

osmotique. Dans des études précédentes les protoplastes étaient isolés à partir de tissus de cal dérivés de l'hypocotyle et du cotylédon du mûrier en utilisant de la cellulase à 2 % et de la macérozyme à 1 % avec du mannitol à 0,7 M, préparé dans des sels MS (Tewary et coll., 1995). Chand et coll., (1996) ont signalé que du rhozyme à 2 %, de la cellulase à 1 % et du macérozyme à 0,03 % dans du CPW 13M donnent un meilleur rendement en protoplastes à partir de la suspension de cellules. De plus, on a signalé que des périodes d'incubation prolongées de 12 à 13 h (Tewary et coll., 1995) et de 16 h (Chand et coll., 1996) à l'obscurité sont bénéfiques pour isoler les protoplastes des explants ci-dessus.

Dans notre étude, nous avons isolé avec succès les protoplastes des tissus de cals du mûrier du cv. S13 en utilisant une solution de digestion contenant des concentrations plus faibles à la fois en macérozyme et en cellulase préparées dans des nutriments B5, en utilisant une période d'incubation à l'obscurité très courte (4 h) (Fig. 1 & 2). Seul un mélange de macérozyme (250 μ l) et de cellulase (1000 μ l) permet un rendement de 6×10^6 protoplastes/g de tissu de cal. Dans ce mélange, l'utilisation de niveaux plus faibles en cellulase (250, 500 et 750 μ l) diminue le rendement en protoplastes (Tab. I). Comme ces enzymes sont chères et doivent être utilisées avec parcimonie, le protocole cité ici est efficace pour répondre à une telle exigence. De plus, l'utilisation de concentrations plus importantes en enzymes dans la solution de digestion pourrait avoir un effet nocif sur les protoplastes qui sont libérés au début de la période d'incubation, ce qui diminue le rendement final.

Purification des protoplastes :

On procède à la purification des protoplastes pour enlever les débris des parois non digérées, les traces du mélange d'enzymes et aussi les protoplastes rompus. La centrifugation à 50 à 100g pendant 5 à 10 minutes est répétée 4 à 5 fois pour purifier les protoplastes du mûrier (Tewary et coll., 1995 ; Chand et coll., 1996). Si l'on rallonge et répète le processus de centrifugation cela pourrait avoir un effet négatif sur la viabilité du protoplaste (Mills et Hammerschlag, 1994). Cela peut être attribué aux dégâts provoqués par les centrifugations répétées par rapport à l'intégrité de la membrane du protoplaste. Dans notre étude, les protoplastes sont donc recueillis grâce à un processus de centrifugation en deux étapes qui pourrait minimiser les dégâts sur l'intégrité de la membrane du protoplaste. De plus, l'étape no. 1 de la centrifugation entraîne la séparation directe des protoplastes les plus grands et les plus petits sous la forme de deux bandes séparées et distinctes. Les protoplastes les plus grands sont recueillis sur la bande supérieure et les plus petits sur la bande inférieure. De plus, le culot contenant les débris de paroi cellulaire et les protoplastes rompus se stabilise au fond pendant ce processus. La purification supplémentaire des protoplastes plus grands et plus petits a lieu pendant la 2^{ème} étape de la centrifugation lors du nettoyage avec du F-PCM, dont le but est d'enlever les traces de la solution d'enzyme. On recouvre 82 % de protoplastes avec la première étape de centrifugation et 75 % avec la deuxième étape. Ces résultats confirment le rapport précédent sur la variation considérable de la taille des protoplastes isolés à partir du tissu de cal (Tewary et coll., 1995). Après la purification on voit rarement d'impuretés dans la fraction protoplastes. Cela laisse donc supposer que la préparation contient seulement des protoplastes purs. On a essayé d'induire la croissance et la division de protoplastes du cal en utilisant du F-PCM. Il faudrait entreprendre des travaux supplémentaires pour trouver quelles conditions permettraient une croissance et un développement plus importants de cals *in vitro* dérivés de protoplastes.

D'après ces observations et ce que nous savons, nous décrivons ici pour la première fois un protocole efficace d'isolement de protoplastes à partir de cultures de cals de mûrier. Nous avons évalué la possibilité d'utiliser des concentrations plus faibles en macérozyme et en cellulase dans la solution de digestion afin d'isoler des cals *in vitro* dérivés de protoplastes. De plus, les cultures de cals *in vitro* pourraient offrir un potentiel pour un isolement rapide des protoplastes de mûrier. Le but de cette étude est la recherche d'améliorations supplémentaires dans les procédures d'isolement des protoplastes et la mise au point d'un protocole amélioré pour les études de fusion somatique, de transformation des plastides et le transfert direct de l'ADN dans le protoplaste de mûrier.

ALLOCATION OF ENERGY FOR COCOON AND PUPAL LIFE OF MATURED LARVA OF *ANTHRAEA MYLITA* (DRURY) (SATURNIIDAE), THE INDIAN TASAR SILK INSECT

J. PATTANAYAK¹ & A. K. DASH²

1. Department of Zoology, Siddheswar College, Amarda Road, Balasore, Orissa, India.

2. Department of Zoology, Dr Jadunath College, Rasalpur, Balasore – 756021, Orissa, India.

*The energy content of matured 5th instar larva of both sexes grown on different food plants in rainy season was evaluated. The larvae of both sexes raised on Sal (*Shorea robusta*) food plant accumulated significantly highest amount of energy (Joules) in rainy season followed by the larvae grown on Asan (*Terminalia tomentosa*), Arjun (*Terminalia arjuna*) and Ber (*Zizyphus jujuba*). The amount of energy allocated towards cocoon preparation and post-larval life was significantly highest in Sal grown larvae of both sexes followed by Asan, Arjun and Ber in rainy season.*

Keywords: *Antheraea mylitta*, energy, rainy season, food plant, larva, pupa.

INTRODUCTION

The Indian tasar silk insect *Antheraea mylitta* (Drury) is a semidomesticated polyphagous insect which is reared on food plants in outdoor condition for commercial production of tasar silk during the three seasons in a year i.e. rainy (July-August), autumn (September- October) and winter (November – December) season. The larva of insect feeds on various food plants although Asan (*Terminalia tomentosa*), Ber (*Zizyphus jujuba*) and Sal (*Shorea robusta*) are of primary importance on the basis of ideal biocommercial performances of the insect (Dash *et al.*, 1992). In case of saturniids, the larvae representing the feeding stage are the energy transformers working at certain level of efficiency under ecological conditions.

Hence the success of post larval life is much dependent on energy gathering ability at larval stage especially at 5th instar period. It influences the performances of insect's life during pupal and imaginal stages which are most important for reproductive success, adaptation to adverse climate, population dynamics and above all management programme of commercial grainage of tasar crop.

Extensive studies have already been made on energetics of larva of *A. mylitta* in different ecological conditions (Dash and Dash, 1989-90; Dash *et al.*, 1996). A little literature is available on pupal energetics of *Bombyx mori* L. only (Nakano and Monsi, 1968; Hori and Watanabe, 1983). But no literature is available on energy allocation for cocoon and post larval energy budget of *A. mylitta*. Hence the present investigation was made to obtain preliminary information on post larval energetics.

MATERIALS AND METHODS

In the present study a number of healthy *T. tomentosa*, *T. arjuna*, *Z. jujuba* and *S. robusta* food plants having identical growth were selected at random at the State Tasar Research Farm, Durgapur in the district of Mayurbhanj of Orissa state where a huge population of freshly hatched *A. mylitta* larvae were reared as reserve batch until cocoon stage during rainy season for experimental use. At

maturity of 5th instar (just before spinning the cocoon), 20 larvae of both sexes were taken at random from larval population grown on each food plant. The fresh and dry (oven drying as per Southwood, 1966) weight of larvae were recorded. Then each dry larva was powdered, mixed thoroughly and subjected to calorimetry to know the energy content of body tissue of 20 dry larvae of both sexes taken separately from different food plants. The fresh and dry weight of 20 shells of cocoons of both sexes (marked before spinning) collected from different food plants at random by dissecting out pupae at the end of spinning were recorded and subjected to calorimetry to measure the energy content. Another lot of 20 cocoons of both sexes were collected at random from each food plant at the end of spinning and were subjected to respirometry. The daily rate of oxygen consumption was calculated. The total amount of oxygen consumption by above batch of larvae up to the period ending with metamorphosis of larvae to pupae was determined. The joulerific conversion (19.64 J/ml; Brown, 1964) of consumed oxygen was made to know the energy lost in respiration during the said period. Finally, the fresh and dry (oven drying as per Southwood, 1966) weight of above batch of freshly metamorphosed pupae were taken. Then they were powdered, thoroughly mixed and subjected to calorimetry to know the amount of energy reserved in body of pupae for subsequent life. The exuvae shed during moulting by above batch of pupae were collected, oven dried and subjected to calorimetry to know the amount of energy lost with exuvae. The energy budgeting was made as shown in Table I. The data were statistically analysed following Sokal and Rohlf (1966).

RESULTS AND DISCUSSION

The comparison of energy content of matured 5th instar larvae of both sexes grown in different food plants in rainy season indicated accumulation of highest amount of energy (joules) in larvae grown on Sal food plant followed by Asan, Arjun and Ber food plant. The 't' test and ANOVA test showed significant (P at 0.01) difference in accumulation of energy in larvae of both sexes grown in four food plants. The above trend was observed in allocating the amount of energy for preparation of the protective cocoon shell which is made up of silk fibre of commercial importance. The amount of energy lost in form of exuvae produced during larval-pupal metamorphosis was highest in larvae of both sexes raised on Asan followed by Sal, Arjun and Ber. The 't' test and ANOVA test indicated significant (P at 0.01) difference in loss of energy in form of exuvae lost by larvae of both sexes grown on different food plants except 5% level of significance of 't' test between Arjun and Ber. The amount of oxygen consumption as well as metabolic loss of energy until the period ending with larval metamorphosis to pupa was highest in larvae of both sexes grown on Sal followed by Asan, Arjun and Ber. The 't' test and ANOVA test showed significant (P at 0.01) difference in consumption of oxygen and metabolic loss of energy in larvae of both sexes raised on different food plants except 5% level of significance of 't' test between Arjun and Ber. The amount of energy reserved for subsequent life activities was highest in pupae of both sexes grown on Sal followed by Asan, Arjun and Ber. The 't' test and ANOVA test indicated significant (P at 0.01) difference in amount of energy reserved in pupae of both sexes raised on different food plants.

The fifth instar larva of both sexes grown on Sal in rainy season accumulated highest energy in form of tissue. It might be due to better nutritional supplement from Sal food plant than other food plants in rainy season condition. Similarly the energy content of cocoon shell raised on Sal food plant indicated higher values probably due to more silk synthesis in silk gland. Previous studies on *B. mori* indicate influence of nutrition on cocoon productivity (Askari and Sharma, 1982). The pupa of both sexes grown on Sal stored highest amount of energy in their bodies followed by Asan, Arjun and Ber. It was about 58% of total larval body energy. Reservation of 11% energy for pupal stage of *B. mori* was reported earlier (Nakano and Monsi; 1968).

Table I. Mean energy (joules $\pm$ standard deviation) budget during late larval life of male (M) and female (F) *A. mylitta* raised on different food plants in rainy season.

*Tableau I. Utilisation moyenne d'énergie (joules $\pm$ écart type) pendant la fin de la vie larvaire des larves *A. mylitta* mâles (M) et femelles (F) élevées sur différentes plantes hôtes pendant la saison des pluies.*

Food plant	Sex	Energy content of matured 5 th instar	Energy allocated for shell	Energy lost in casted exuvae	Amount of O ₂ consumed (MJ) (Energy lost in respiration)	Energy reserved in pupa
<i>Plante hôte</i>	<i>Sexe</i>	<i>Teneur en énergie du 5^{ème} âge mature</i>	<i>Energie allouée à la coque</i>	<i>Energie perdue dans l'exuvie</i>	<i>Quantité d'O₂ consommée (MJ) (Energie perdue dans la respiration)</i>	<i>Energie réservée à la nymphe</i>
ASAN	M	75194.14 $\pm$ 34.93	21029.91 $\pm$ 24.01	1519.41 $\pm$ 12.03	348.23 $\pm$ 6.41 (6839.24)	45714.07 $\pm$ 16.87
	F	84971.28 $\pm$ 39.63	22992.75 $\pm$ 22.58	1570.19 $\pm$ 14.58	572.46 $\pm$ 13.06 (11243.11)	49055.67 $\pm$ 17.20
ARJUN	M	71287.35 $\pm$ 32.68	19353.84 $\pm$ 20.04	1487.57 $\pm$ 12.43	323.40 $\pm$ 5.98 (6351.58)	44013.33 $\pm$ 15.55
	F	79750.17 $\pm$ 35.34	21293.68 $\pm$ 22.89	1529.42 $\pm$ 11.95	556.34 $\pm$ 12.61 (10926.52)	45900.16 $\pm$ 17.36
BER	M	66301.39 $\pm$ 28.50	17551.77 $\pm$ 17.62	1467.69 $\pm$ 10.22	315.25 $\pm$ 4.99 (6191.51)	40998.60 $\pm$ 11.78
	F	75251.86 $\pm$ 34.69	19471.19 $\pm$ 20.07	1486.33 $\pm$ 10.17	540.98 $\pm$ 10.62 (10624.85)	43577.41 $\pm$ 13.64
SAL	M	88145.77 $\pm$ 39.14	26984.82 $\pm$ 27.29	1570.32 $\pm$ 14.70	492.74 $\pm$ 9.96 (9677.41)	49805.39 $\pm$ 17.60
	F	97159.98 $\pm$ 43.69	29096.86 $\pm$ 69.42	1622.62 $\pm$ 14.88	696.17 $\pm$ 13.83 (13672.78)	52688.72 $\pm$ 23.39

REFERENCES

- ASKARI S., SHARMA R. K. (1982) Studies on the effects of feeding leaves of varying maturity on the developmental stages of *Bombyx mori* L. J. Adv. Zool., 3(2), 90-94.
- BROWN G. W. Jr. (1964) In physiology of Amphibia (ed. J. A. MOORE), Academic press, New York and London.
- DASH A. K., DASH M. C. (1989-90) Energetics of the Indian tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) raised on Asan (*Terminalia alata*) food plant. Wild Silkmooths, 1, 165-172.
- DASH A. K., DASH M. C., NAYAK B. K. (1996) Energetics of the Indian tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) raised on Arjun (*Terminalia arjuna*). In. J. Wild Silkmooth and silk, 2, 41-48.
- HORI Y., WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter in food by the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 18(1), 70-80.
- NAKANO K., MONSI M. (1968) An experimental approach to some quantitative aspects of grazing by silkworms (*Bombyx mori*). Jap. J. Ecol. 18(5), 217-230.
- SOKAL R. R., ROHLF F. J., (1969) Biometry: The principles and practices of statistics in Biological Research, W. H. Freeman & Co., San Francisco, p. 776.
- SOUTH WOOD T. R. E. (1966) Estimation of productivity and construction of energy budget. In: Ecological methods with particular reference to the study of insect populations. Champman and Hall Ltd., London, p. 354-368.

DISTRIBUTION DE L'ÉNERGIE POUR LA VIE DU COCON ET DE LA NYMPHE CHEZ DES LARVES MATURES D'*ANTHERAEA MYLITTA* (DRURY) (SATURNIIDES), L'INSECTE TASAR INDIEN DE LA SOIE

J. PATTANAYAK¹ & A. K. DASH²

1. Department of Zoology, Siddheswar College, Amarda Road, Balasore, Orissa, Inde.

2. Department of Zoology, Dr Jadunath College, Rasalpur, Balasore – 756021, Orissa, Inde.

*Nous avons évalué la teneur en énergie chez des larves matures du 5^{ème} âge, des deux sexes, élevées sur différentes plantes hôtes pendant la saison des pluies. Les larves des deux sexes élevées sur la plante hôte Sal (*Shorea robusta*) accumulent la quantité d'énergie significativement la plus élevée (Joules) pendant la saison des pluies, suivies par les larves élevées sur Asan (*Terminalia tomentosa*), sur Arjun (*Terminalia arjuna*) et sur Ber (*Zizyphus jujuba*). La quantité d'énergie allouée à la préparation du cocon et à la vie post-larvaire est significativement plus élevée chez les larves des deux sexes élevées sur Sal, suivies par celles élevées sur Asan, Arjun et Ber pendant la saison des pluies.*

INTRODUCTION

L'insecte tasar indien de la soie *Antheraea mylitta* (Drury) est un insecte polyphage semi-domestiqué, qui est élevé sur des plantes hôtes à l'extérieur pour la production commerciale de soie tasar pendant les trois saisons de l'année, la saison des pluies (juillet-août), l'automne (septembre – octobre) et l'hiver (novembre – décembre). La larve de l'insecte se nourrit sur des plantes hôtes variées bien qu'Asan (*Terminalia tomentosa*), Ber (*Zizyphus jujuba*) et Sal (*Shorea robusta*) soient d'une importance primordiale en raison des performances commerciales idéales de l'insecte (Dash et coll., 1992). Dans le cas des saturniidés, les larves représentent le stade de nourrissage et sont les transformateurs d'énergie cherchant à atteindre un certain niveau d'efficacité dans les conditions écologiques.

Le succès de la vie post-larvaire dépend donc largement de la capacité à rassembler de l'énergie au stade larvaire et surtout au 5^{ème} âge. Ceci influence les performances de la vie de l'insecte pendant les stades nymphal et adulte qui sont très importants pour le succès de la reproduction, pour l'adaptation aux climats adverses, pour la dynamique de population et par-dessus tout pour le programme de gestion du grainage commercial de la récolte tasar.

Des études poussées ont déjà été faites sur la dépense énergétique des larves de *A. mylitta* dans différentes conditions écologiques (Dash et Dash, 1989-90 ; Dash et coll., 1996). Il existe un peu de littérature sur les besoins énergétiques de la chrysalide chez *Bombyx mori* L. (Nakano et Monsi, 1968 ; Hori et Watanabe, 1983). Mais il n'existe pas de littérature sur la disponibilité de l'énergie pour le cocon et la nymphe chez *A. mylitta*. Nous avons donc entrepris cette recherche pour obtenir des informations préliminaires sur la dépense énergétique post-larvaire.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, un certain nombre de plantes hôtes saines *T. tomentosa*, *T. arjuna*, *Z. jujuba* et *S. robusta* dont la croissance est similaire, sont sélectionnées au hasard à la Station de Recherche d'Etat du Tasar, à Durgapur dans la région de Mayurbhanj de l'état d'Orissa où une grande population de larves *A. mylitta* fraîchement écloses sont élevées comme lot de réserve jusqu'au stade du cocon pendant la saison des pluies pour un usage expérimental. A maturité du 5^{ème} âge (juste avant le filage du cocon), 20 larves des deux sexes sont prises au hasard dans la population larvaire élevée sur chaque plante hôte. Les poids frais et sec (séchage au four d'après Southwood, 1966) sont enregistrés. Puis chaque larve sèche est réduite en poudre, mélangée avec soin et soumise à la calorimétrie pour connaître la teneur en énergie de 20 larves sèches des deux sexes prises séparément sur des plantes hôtes différentes. Les poids frais et sec de 20 coques des deux sexes, (marquées avant le filage) élevées sur différentes plantes hôtes et prises au hasard sont enregistrés et elles sont soumises à la mesure calorimétrique dans le but de mesurer l'énergie. Un autre lot de 20 cocons des deux sexes provenant de chaque plante hôte à la fin du filage est recueilli au hasard et soumis à la mesure de respirométrie. Le taux quotidien de consommation d'oxygène est calculé. La quantité totale de consommation d'oxygène du lot de larves ci-dessus jusqu'à la métamorphose des larves en nymphes est déterminée. On procède à la conversion en joules (19,64 J/ml ; Brown, 1964) de l'énergie consommée pour connaître l'énergie perdue en respiration pendant la période considérée. Finalement, les poids frais et sec (séchage au four d'après Southwood, 1966) du lot ci-dessus nouvellement métamorphosé en nymphes sont mesurés. Puis les nymphes sont réduites en poudre, mélangées avec soin et soumises à la calorimétrie pour connaître la quantité d'énergie en réserve dans le corps de la nymphe pour sa vie ultérieure. Les exuvies perdues pendant la mue par le lot de nymphes sont recueillies, séchées au four et soumises à la calorimétrie pour connaître la quantité d'énergie perdue avec les exuvies. L'utilisation d'énergie est présentée dans le Tableau I. Les données sont analysées de manière statistique d'après Sokal et Rohlf (1966).

RESULTATS ET DISCUSSION

La comparaison de la teneur en énergie des larves matures du 5^{ème} âge, des deux sexes, cultivées sur des plantes hôtes différentes pendant la saison des pluies indique que les larves cultivées sur la plante hôte Sal accumulent une quantité d'énergie plus élevée (joules), suivies par celles élevées sur Asan, sur Arjun et sur Ber. Le test "t" et l'analyse de variance montrent une différence significative ($P < 0,001$) pour l'accumulation d'énergie entre les larves des deux sexes cultivées sur quatre plantes hôtes. Cette tendance est observée pour la répartition de l'énergie destinée à la préparation de la coque protectrice qui est faite à partir de fibres de soie d'importance commerciale. La quantité d'énergie perdue lors de la production de l'exuvie pendant la métamorphose de la larve en nymphe est plus élevée chez les larves des deux sexes élevées sur Asan, suivies par celles élevées sur Sal, Arjun et Ber. Le test "t" et l'analyse de variance indiquent une différence significative ($P < 0,01$) pour la perte d'énergie, lors de la perte de l'exuvie chez les larves des deux sexes, élevées sur différentes plantes hôtes sauf entre Arjun et Ber dont le seuil de signification est à 5 % avec le test "t". La quantité d'oxygène consommée et la perte d'énergie métabolique jusqu'à la métamorphose de la larve en nymphe sont les plus élevées chez les larves des deux sexes cultivées sur Sal, suivies par celles élevées sur Asan, Arjun et Ber. Le test "t" et le test d'analyse de variance montrent une différence significative ($P < 0,01$) pour la consommation d'oxygène et pour la perte d'énergie métabolique chez les larves des deux sexes élevées sur des plantes hôtes différentes sauf entre Arjun et Ber dont le seuil de signification s'élève à 5 % avec le test "t". La quantité d'énergie réservée aux activités vitales ultérieures est plus élevée chez les nymphes des deux sexes cultivées sur Sal, suivies par celles élevées sur Asan, Arjun et Ber. On remarque une différence significative ($P < 0,01$) pour la quantité d'énergie

réservée aux nymphes des deux sexes élevées sur des plantes hôtes différentes avec le test "t" et l'analyse de variance.

Ce sont les larves du cinquième âge des deux sexes cultivées sur Sal pendant la saison des pluies qui accumulent le plus d'énergie sous forme de tissu. Cela pourrait être dû au fait que la plante hôte Sal représente un meilleur apport nutritionnel que les autres plantes hôtes pendant la saison des pluies. De même, la quantité d'énergie de la coque obtenue sur la plante hôte Sal donne des valeurs plus élevées probablement parce qu'il y a plus de synthèse de soie dans la glande séricigène. Des études antérieures sur *B. mori* indiquent l'influence de la nutrition sur la productivité du cocon (Askari et Sharma, 1982). Les nymphes des deux sexes élevées sur Sal sont celles qui stockent le plus d'énergie dans leurs corps, suivies par celles élevées sur Asan, Arjun et Ber. Cela représente environ 58 % de l'énergie larvaire corporelle totale. Chez *B. mori*, on a rapporté précédemment que 11 % de l'énergie était réservée au stade nymphal (Nakano et Monsi, 1968).

ON THE NOMENCLATURE OF ERI SILKWORM

D. N. R. REDDY

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

Keywords: Nomenclature, eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Boisduval).

There has been confusion regarding the taxonomic status of the genus *Samia* Hubner especially on its nomenclature. Packard (1914) treated *Samia* and *Philosamia* Grote as a separate genus. Seitz (1926) considered *Samia* as a valid genus and treated *Philosamia* and *Drepanoptera* Rothchild as its counterparts representing Indian and African fauna of *Samia*, respectively. Subsequently, Draudt (1927) referred to *Drepanoptera* as a subgenus of *Epiphora* but Schiissler (1933) treated *Drepanoptera* as an independent genus. He also revalidated both *Samia* and *Philosamia* as separate genera, representing African, American and Oriental fauna. Michener (1952) set at rest the controversy and regarded the genus *Philosamia* as a junior synonym of *Samia* and stated "this (*Samia*) is an Oriental genus represented in the Eastern United States by a single introduced species". Ferguson (1972) followed Michener (1952) and was also of the view that "*Samia* is indigenous to the Oriental region, but the type species was introduced into the United States, where it has not been naturalised for years". The genus *Samia* belongs to the old world group which includes Asiatic genera *Attacus*, *Archaeoattacus* and the African genus *Drepanoptera*. The genus *Samia* is more closely allied to *Archaeoattacus* than *Attacus* in respect of characters of frons, labial palpi and spurs but can be distinguished by the olive-green coloration, long lunate discal spots and by the abdominal markings.

Chronology of Nomenclature of the genus *Samia* Hubner:

- 1820. *Samia* : Hubner, Verz. Bek. Schmett. : 156.
- 1874. *Philosamia* : Grote, Proc. American phil. Soc., 14: 258.
- 1914. *Desgodinisia* Oberthur, Ethud. Lepid. Comp., 9 (2): 56.
- 1972. *Samia* : Ferguson, The Moths of America North of Mexico., 20(2B): 212-214.

Samia cynthia (Drury) one of the most economically important non-mulberry silk moths, popularly called "*Ailanthus* or Eri Silkmoth" is represented by a single species *cynthia* Drury with several sub species, including *ricini* Boisduval which is a domesticated race (Arora and Gupta, 1979). These two (*cynthia* and *ricini*) were treated as separate species by Hampson (1892), who differentiated *ricini* from *cynthia* on the basis of abdomen having segmented band of white hairs instead of tufts. Its fore wing with an antemedial line is more angled and generally joining the postmedial band; the lunule is much shorter, the post medial band of both wings with fuscous replacing the pink. Seitz (1926), however treated *ricini* as a form of *cynthia* as considered by Hampson (1892).

Chronology of nomenclature of Eri silkmoth:

1773. *Phalanea attacus cynthia* Drury Illust. Nat. Hist. Exot. Ins., 2: 10 (Type locality China).
1790. *Bombyx cynthia*: Olivier, Encyclop. Meth. Hist. Nat. Ins., 5: 30.
1820. *Samia cynthia*: Hubner, Verz. Bek. Schmett: 156.
1837. *Saturnia cynthia*: West wood. Illust. Exot. Ent., 2: 12.
1837. *Phalanea cynthia*: Helfer, J. Asiat. Soc. Bengal., 6: 45.
1854. *Saturnia ricini* Boisduval, Anns. Soc Ent. France., 8 (2): 755.
1855. *Attacus cynthia*: Walker, Cat. Lep. Het. Brit. Mus., 5: 1220-1221.
1858. *Bombyx querini* Moore, Cat. Lep. E.I House, 2: 409.
1859. *Attacus ricini* :Moore, Proc. Zool. Soc. London : 267.
1860. *Attacus canningi* : Huntton, J. Agric. Soc. India: 10.
1874. *Philosamia cynthia*: Grote, Proc. American Phil. Soc., 14 : 258.
1879. *Attacus obscurus* Butler, Trans. Ent. Soc London: 5.
1887. *Attacus vesta* Cotes and Swinhoe, Cat. Moths India: 225.
1887. *Philosamia ricini*: Wardle, Royal Jubilee Exhibition: 23.
1933. *Philosamia cynthia*: Schiissler, Lepid. Cat., 55: 24-41.
1972. *Samia cynthia* Ferguson, The moths of America North of Mexico, 20 (2B): 215-218.
1979. *Samia cynthia ricini*: Arora and Gupta, Taxonomic studies on some of the Indian non-mulberry silk moths (Lepidoptera: Saturniidae: Saturniinae). Mem. Zool. Survey India., 16(1) 49-53.

The current valid name of the domesticated Eri silkworm is *Samia cynthia ricini* (Boisduval). It is distributed in India (Himachal Pradesh, Uttar Pradesh, Arunachal Pradesh, Assam, Meghalaya, West Bengal, Bihar, Sikkim, and South Andamans), Bhutan, Bangladesh, Sri Lanka (Ceylon), Myanmar (Burma), Indonesia (Java) and China (Arora and Gupta, 1979).

ACKNOWLEDGEMENT

I am immensely grateful to Dr C.A. Viraktamath, Professor, Department of Entomology, College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, Bangalore – 560 065 for having corrected the manuscript and suggesting suitable changes for the authenticity of nomenclature and the spirit behind me in all my pursuits.

REFERENCES

- ARORA G.S. & GUPTA I.J. (1979) Taxonomic studies on some of the Indian Non-mulberry silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae : Saturniinae). Mem. Zool. Survey India 16(1); 49-53.
- DRAUDT M. (1927) Saturniidae (American) In "The Macrolepidoptera of the world" 6: 713-827.
- FERGUSON D. C. (1972) The moths of America North of Mexico (Bombycoidea: Saturniidae). Fascicle 20 (2B): 155-275.

- HAMPSON G. F. (1892) The fauna of British India including Ceylon and Burma – Moths 1: 12-29.
- MICHENER C. D. (1952) The Saturniidae (Lepidoptera) of the Western Hemisphere – Morphology, Phylogeny and Classification.. Bull. American Mus. Nat. Hist. New-York, 98(5): 335-420.
- PACKARD A. S. (1914) Monograph of the Bombycine moths of North America, including their transformations and origin of the larval markings and armature. Mem. Natl. Acad. Sci. Washington 12(1): 276.
- SCHLISSLER H. (1933) Saturniidae-I. Sub-Family Attacinae, Saturniinae Lepid. Cat. Berlin. 55: 85-324.
- SEITZ A. (1926) Saturniidae (Indo-Australian) The Macrolepidoptera of the world. 10: 497-520.

NOMENCLATURE DU VER A SOIE ERI

D. N. R. REDDY

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

Il y a eu une confusion à propos du statut taxonomique du genre *Samia* Hubner surtout à propos de sa nomenclature. Packard (1914) a traité *Samia* et *Philosamia* Grote comme deux genres séparés. Seitz (1926) a considéré *Samia* comme un genre valide et traité *Philosamia* et *Drepanoptera* Rothchild comme ses équivalents représentant respectivement la faune indienne et africaine de *Samia*. Par la suite, Draudt (1927) s'est référé à *Drepanoptera* comme un sous-genre d'*Epiphora* mais Schiessler (1933) a traité *Drepanoptera* comme un genre indépendant. Il a aussi revalidé à la fois *Samia* et *Philosamia* comme des genres séparés, représentant la faune africaine, américaine et orientale. Michener (1952) a apaisé la controverse et considéré le genre *Philosamia* comme un jeune synonyme de *Samia* et affirmé " ce genre (*Samia*) est un genre oriental représenté à l'est des Etats-Unis par une seule espèce introduite ". Ferguson (1972) a suivi Michener (1952) et était aussi d'avis que " *Samia* fait partie de la région orientale, mais ce type d'espèce a été introduit aux Etats Unis, où il n'a pas été naturalisé depuis des années ". Le genre " *Samia* " appartient au groupe du vieux monde, qui comprend les genres asiatiques *Attacus*, *Archaeoattacus* et le genre africain *Drepanoptera*. Le genre *Samia* est plus étroitement apparenté à *Archaeoattacus* qu'à *Attacus* par rapport aux caractères de front, de palpes labiaux et d'éperon mais il peut être distingué par sa coloration vert olive, ses taches discales en forme de croissant et ses marques abdominales.

Chronologie de la Nomenclature du genre *Samia* Hubner :

- | | |
|------|--|
| 1820 | <i>Samia</i> : Hubner, Verz. Bek. Schmett. : 156 |
| 1874 | <i>Philosamia</i> : Grote, Proc. American Phil. Soc., 14 : 258. |
| 1914 | <i>Desgodinisia</i> Oberthur, Ethud. Lepid. Comp., 9 (2) : 56. |
| 1972 | <i>Samia</i> : Ferguson, The Moths of America North of Mexico, 20(2B) : 212-214. |

Samia cynthia (Drury) un des papillons non-mûrier les plus importants économiquement, appelé communément " *Atlanthus* ou papillon eri " est représenté par une espèce unique *cynthia* Drury avec plusieurs sous-espèces, dont *ricini* Boisduval qui est une race domestiquée (Arora et Gupta, 1979). Ces deux-là (*cynthia* et *ricini*) ont été traitées comme des espèces séparées par Hampson (1892), qui a différencié *ricini* de *cynthia* parce que son abdomen a une bande segmentée de poils blancs au lieu de huppes. Ses ailes avant avec une ligne antémédiane sont plus angulaires et celle-ci rejoint en général la bande post-médiane ; la lune est beaucoup plus petite, la bande post-médiane des deux ailes est brun foncé au lieu d'être rose. Seitz (1926), a cependant traité *ricini* comme une forme de *cynthia* comme Hampson (1892).

Chronologie de la nomenclature du papillon eri :

- 1773 : *Phalanea attacus cynthia* Drury Illust. Nat. Hist. Exot. Ins., 2: 10 (Type localité Chine).
- 1790 *Bombyx cynthia*: Olivier, Encyclop. Meth. Hist. Nat. Ins., 5: 30.
- 1820 *Samia cynthia*: Hubner, Verz. Bek. Schmett: 156.
- 1837 *Saturnia cynthia*: West wood. Illust. Exot. Ent., 2: 12.
- 1837 *Phalanea cynthia*: Helfer, J. Asiat. Soc. Bengal., 6: 45.
- 1854 *Saturnia ricini* Boisduval, Annls. Soc Ent. France., 8 (2): 755.
- 1855 *Attacus cynthia*: Walker, Cat. Lep. Het. Brit. Mus., 5: 1220-1221.
- 1858 *Bombyx querini* Moore, Cat. Lep. E.I House, 2: 409.
- 1859 *Attacus ricini* :Moore, Proc. Zool. Soc. London : 267.
- 1860 *Attacus canningi* : Huntton, J. Agric. Soc. India: 10.
- 1874 *Philosamia cynthia*: Grote, Proc. American Phil. Soc., 14 : 258.
- 1879 *Attacus obscurus* Butler, Trans. Ent. Soc London: 5.
- 1887 *Attacus vesta* Cotes and Swinhoe, Cat. Moths India: 225.
- 1887 *Philosamia ricini*: Wardle, Royal Jubilee Exhibition: 23.
- 1933 *Philosamia cynthia*: Schiissler, Lepid. Cat., 55: 24-41.
- 1972 *Samia cynthia* Ferguson, The moths of America North of Mexico, 20 (2B): 215-218.
- 1979 *Samia cynthia ricini*: Arora and Gupta, Taxonomic studies on some of the Indian (Non-mulberry silk moths (Lepidoptera: Saturniidae: Saturniinae). Mem. Zool. Survey India., 16(1) 49-53.

Le nom correct actuel du ver   soie domestiqué est *Samia cynthia ricini* (Boisduval). Il est distribué en Inde (Himachal Pradesh, Uttar Pradesh, Arunachal Pradesh, Assam, Meghalaya, Bengale Ouest, Bihar, Sikkim et dans les Iles Andaman), au Bhoutan, Bangladesh, Sri Lanka (Ceylan), Myanmar (Burma), Indonésie (Java) et en Chine (Arora et Gupta, 1979).

STUDIES ON CONSUMPTION AND UTILIZATION OF *SHOREA ROBUSTA* LEAVES IN *LARIA* LARVAE

U. S. P. SINHA, S. K. MATHUR & A. K. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, P.O. Piska Nagri, Dist- Ranchi 835303, State Bihar, India.

Food consumption, utilisation and tissue growth during different larval instars were worked out through a feeding trial of Laria eco race of tropical tasar silkworm, Antheraea mylitta Drury on the foliage of Shorea robusta. During its larval span of 42 days, the average total consumption of an individual larva was 108.06 g of which 61.81 g was assimilated by the larva. The assimilation and tissue growth were found positively correlated with the leaf consumption and maturity of the larva. The approximate digestibility declined with the advancement of age whereas efficiency of conversion of ingested and digested food rose up in fourth instar and decreased in the fifth instar.

Keywords: *Laria*, eco-race, *Antheraea mylitta*, *Shorea robusta*, consumption.

INTRODUCTION

Studies on nutritional parameters of sericigenous insects are necessary for better management and development of the sericulture industry. Studies on the food ingestion, digestion and utilization of leaves in mulberry, muga and eri silkworms have already been reported by Ueda and Suzuki (1967), Barah *et al.*, (1989) and Pant *et al.*, (1986) respectively.

Shorea robusta is one of the primary food plant of tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Jolly *et al.*, 1968) and *Laria* is one among the important eco-races of the tropical tasar silkworm *A. mylitta* feeding on *Shorea robusta* (Sinha *et al.*, 1992). It was therefore thought worthwhile to study the instarwise consumption and utilization of *Shorea robusta* leaves by *Laria* larvae to arrive at consumption and utilization pattern of *Shorea robusta* leaves by *Laria* eco-race of *A. mylitta* D.

MATERIALS AND METHODS

Healthy larvae of *Laria* eco-race of *A. mylitta* were reared indoor from first to fifth instar on *S. robusta* leaves during second rearing season (Sept.-Nov.) as per method described by Rana *et al.*, (1987). Four replications with fifty larvae in each replication were maintained throughout the larval stage right from brushing till the end of rearing. A parallel batch of worms was reared under identical conditions to replace the weak and dead larvae during the course of the study. Besides, a control set of leaves from the lot fed to the worms was also maintained to determine the loss in weight of leaves due to dessiccation. The amounts of consumption, excretion and larval weight were measured and recorded except during the moulting period. The gravimetric method of Waldbauer (1968) was followed for the evaluation of day-to-day food consumption by the larvae.

The IPB formula of Petrusiewicz and Mac Fayden (1970) was used for calculation of food energy assimilation and respiration. The data on the assimilation and gain in weight were converted to coefficient of utilization and growth, as suggested by Evans (1939).

RESULTS AND DISCUSSION

Instarwise quantity of food consumption, excretion, assimilation, tissue growth and food oxidised for all the larval instars have been presented in Table I. It is evident from the table that average total leaf consumption by an individual larva was of 108.068 gms. In the process of natural growth of the larvae, the amount of food consumed started increasing from first to fifth instar. In the described experiment the consumption was maximum during the fifth instar being 77.377% of the total consumption. Prem Chand (1979) in *Diacrisia obliqua* has reported almost similar results.

Table I. Average consumption, egestion, assimilation, tissue growth and respiration in different instars of *Laria* larvae fed on *S. robusta* (fresh weight in g).

*Tableau I. Consommation, évacuation, assimilation, croissance des tissus et respiration de la larve *Laria* nourrie sur *S. robusta* (poids frais en g) à différents âges.*

Instar	Consumption	Egestion	Assimilation	Tissue growth	Respiration
Age	Consommation	Evacuation		Croissance des tissus	
I	0.521 ± 0.007 (0.482)	0.122 ± 0.005	0.401 ± 0.005 (0.649)	0.065 ± 0.002 (0.365)	0.335 ± 0.002
II	3.097 ± 0.006 (2.866)	0.800 ± 0.004	2.297 ± 0.003 (3.716)	0.739 ± 0.002 (4.153)	1.558 ± 0.001
III	5.560 ± 0.007 (5.145)	1.580 ± 0.004	3.980 ± 0.004 (6.438)	1.490 ± 0.002 (8.374)	2.490 ± 0.002
IV	15.270 ± 0.007 (14.130)	5.630 ± 0.004	9.640 ± 0.004 (15.594)	4.500 ± 0.035 (25.289)	5.140 ± 0.032
V	83.620 ± 0.007 (77.377)	38.122 ± 0.002	45.498 ± 0.006 (73.602)	11.000 ± 0.178 (61.819)	34.498 ± 0.172
Grand total	108.068 ± 0.035	46.254 ± 0.016	61.816 ± 0.022	17.794 ± 0.218	44.021 ± 0.209

± Value indicate standard error; instar wise percentages of consumption, assimilation and tissue growth are given in parentheses.

Les valeurs ± indiquent l'écart type ; les pourcentages de consommation, d'assimilation et de croissance des tissus en fonction de l'âge sont donnés entre parenthèses.

In the insects, assimilation is the total quantity of food available to be incorporated as body substances or to be metabolised for energy (Reddy and Alfred, 1979). In the current experiment the highest assimilation was recorded in the fifth instar (73.602%) and was found to be related with the amount of food consumed. This finding is in agreement with those of Vats and Kaushal (1982). It is also clear from the data that there is a direct correlation of tissue growth with the age of the larvae. The tissue growth was also found to be positively related with the amount of food consumed (Fig. 1 & 2) and was maximum (61.819%) in the fifth instar larvae. The average larval weight of mature larva in the fifth instar was 18.000 gms.

The three primary parameters of nutritional physiology i.e., digestibility, efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food to body substances have been depicted in Table II. It is evident from this table that the approximate digestibility (AD) was the highest (76.986%) in the first instar larvae which gradually reduced with the advancement of instar and reached the lowest (54.410%) in the fifth instar larvae. Almost similar findings have been reported in *P. ricini* (Poonia, 1978) and *B. mori* (Horie *et al.*, 1978). The highest AD in early instars may be due to the fact that young larvae are generally selective feeders and feed on the young and succulent leaves which contain low content of crude fibre which is easy to digest while the old instar larvae ingest mature leaves with its veins in which crude fibre content is high. This results in the decline of approximate digestibility. The grand mean value of AD for the fifth larval instars in *Larva* larvae fed on *S. robusta* on fresh weight basis was calculated and found to be 68% while in *Antheraea proylei* it was of 71% (Rana *et al.*, 1987).

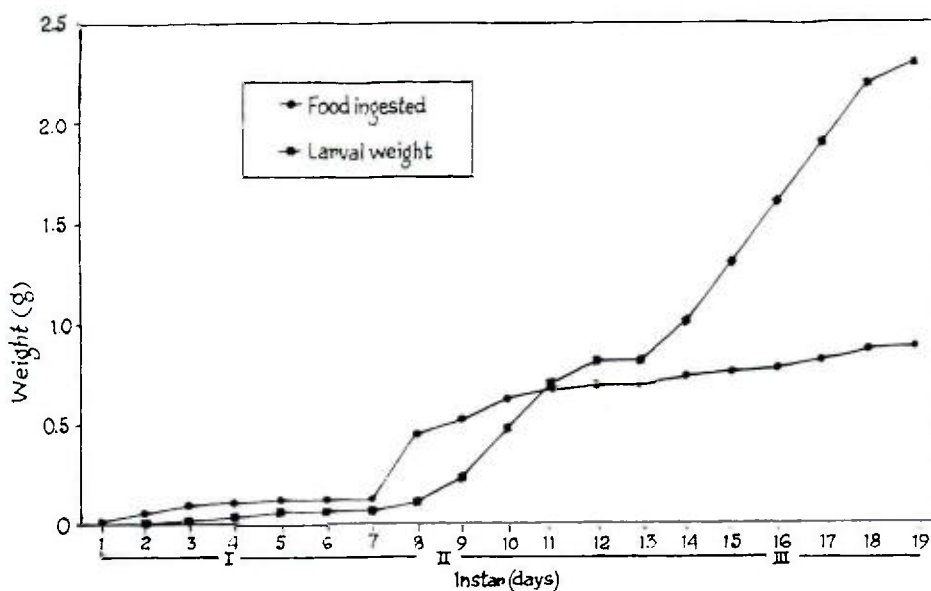


Fig. 1. Daily cumulative weights attained vrs. food consumed by larval instars I-III.

Fig. 1. Poids cumulatifs journaliers atteints en fonction de la nourriture consommée aux âges larvaires I à III.

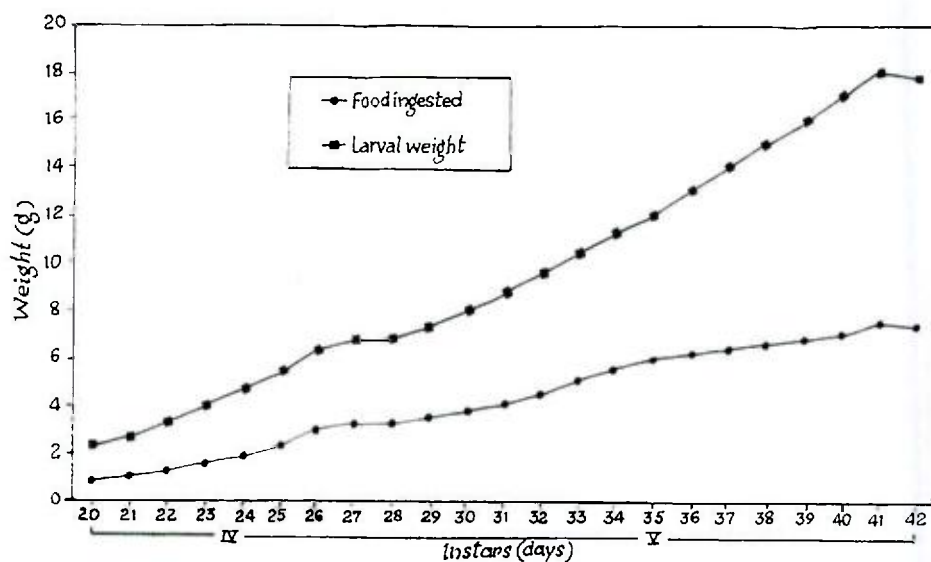


Fig. 2. Daily cumulative weights attained vrs. food consumed by larval instars IV - V.

Fig. 2. Poids cumulatifs journaliers atteints en fonction de la nourriture consommée aux âges larvaires IV à V.

Table II. Mean efficiency of food utilization of *Laria* larvae fed on *S. robusta* leaves.

Tableau II. Efficacité moyenne de l'utilisation de nourriture chez la larve *Laria* nourrie avec des feuilles de *S. robusta*.

Instar / Age	AD (%)	ECI (%)	ECD (%)
I	76.986 ± 0.430	12.469 ± 0.168	16.201 ± 0.304
II	74.169 ± 0.065	23.862 ± 0.008	32.172 ± 0.006
III	71.583 ± 0.028	26.799 ± 0.009	37.437 ± 0.007
IV	63.130 ± 0.006	29.469 ± 0.218	46.680 ± 0.350
V	54.410 ± 0.003	13.155 ± 0.212	24.176 ± 0.388
Grand mean / Moyenne totale	68.056 ± 0.105	21.151 ± 0.118	31.333 ± 0.209

± Values indicate standard error / Les valeurs ± indiquent l'écart type.

It is also evident from Table II that the efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food to body substances increased from first to fourth instar and then declined in the fifth instar. Mukherji & Guppy (1970) and Latheef & Harcourt (1972) have also found the same trend of rise and fall in ECI & ECD in different insects. The lower values of ECI and ECD in the early instar may be due to the fact that a smaller portion of the ingested or digested food is used for tissue growth and more for its maintenance, while in the later stage, the metabolic rate is higher than the early stage and hence more of the ingested or digested food is available for conversion to body tissue. The grand mean value of ECI over the entire larval period was of 21.151%. The same value has been found to be 22-23% in the mature larva of *B. mori* (Horie and Watanabe, 1983). The grand mean value of ECD was 31.333% in *Larva* larvae fed on *S. robusta* while ECD for *A. proylei* fed on *Quercus serrata* was reported to be 34% (Rana *et al.*, 1987).

Further, both ECI and ECD declined in the fifth instar where maximum tissue growth takes place. The longer span and maximum consumption of food during this instar (77.377% of the total consumption) was perhaps responsible for the high rate of tissue growth in spite of the decline in ECI and ECD. The fall of ECI and ECD in the fifth instar may be due to the fact that the higher amount of ingested or digested food was metabolised for maintenance of the body and lesser amount was used for tissue growth.

REFERENCES

- BARAH A., GOSWAMI M. C. & SAMSON M. V. (1989) Consumption and utilization of food in different instars of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.), 98(2): 99-103.
- EVANS A. C. (1939) The utilization of food by certain Lepidopterous insects. Trans. R. Entomol. Soc. London, 89: 13-22.
- HORIE Y., INOKUCHI T. & WATANABE K. (1978) Quantitative studies of food utilization by the silkworm *B. mori* L. through the life cycle. II. Economy of nitrogen and amino acids. Bull. Seric. Expt. Stn., 27: 531-578.
- JOLLY M. S., CHATURVEDI S. N. & PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. Indian J. Seric., 7(1): 56-57.
- LATHEEF M. A. & HARCOURT D. C. (1972) Quantitative study of food consumption, assimilation and growth in *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Chrysom.) on two host plants; Can Entomol. 104: 1271-1278.
- MUKHERJI M. K. & GUPPY J. C. (1970) Quantitative study of food consumption and growth in *Pseudaletia unipuncta* (Lep.: Noct.), Can. Entomol. 102: 1179-1188.
- PANT R., RAMANA D. & SARKAR A. (1986) Consumption and utilization of food in *Philosamia ricini* larva during development, Sericologia, 26: 49-54.
- PETRUSEWICZ K. & MAC FAYDEN A. (1970) Productivity of terrestrial animals, IPB Handb., 13: 109.
- POONIA F. S. (1978) Studies on food utilization and rate of growth during the development stages of eri silkworm *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Satur.) Indian J. Seric., 17: 48-60.
- PREM CHAND (1979) Utilization of food by the Bihar hairy caterpillar, *Diacrisia obliqua* Walker, Indian J. Ent., 41(3), 237-239.
- RANA B., PRASAD. B & NIGAM M. P. (197) Consumption and utilization of food by oak tasar silkworm *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae), Sericologia, 27(1): 11-19.
- REDDY M. V. & ALFRED J. R. B. (1979) Utilization of castor *Ricinus communis* Linn. leaves by the last instar larvae of the silkmoth *Philosamia ricini* Hutt. (Lep. : Satur), Indian Biol., 2:35-40.
- SINHA A. K., SINHA R. K., GOEL A. K. & SINHA B. R. R.P. (1992) Abstract IV. All India Conference on Cytology and Genetics and Symposium on Cytogenetics of mulberry and non-mulberry silkworm of Bangalore, Nov. 5th to 7th: 108-109.

- UEDA S. & SUZUKI K. (1967) Studies on the growth of the silkworm *B. mori* L. I. Chronological change of the amount of food ingested and digested, body weight and water content of the body and their mutual relationship. Bull. Seric. Expt. Stn. 22(1), 65-67.
- VATS L. K. & KAUSHAL B. R. (1982) A quantitative study of food consumption, assimilation and growth of *Pieris brassicae* (Lep.: Pieridae) on two host plants, Indian J. Ecol., 9: 292-297.
- WALDBAUER G. P. (1968) The consumption and utilization of food by insects, Adv. Insect Physiol. 5: 229-288.

ETUDES SUR LA CONSOMMATION ET L'UTILISATION DE FEUILLES DE *SHOREA ROBUSTA* PAR LES LARVES *LARIA*

U. S. P. SINHA, S. K. MATHUR & A. K. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Piska Nagri, Dist. Ranchi 835303,
Etat de Bihar, Inde.

La consommation, l'utilisation de nourriture et la croissance des tissus pendant différents âges larvaires ont été mesurées chez l'écorace Laria du ver à soie tasar tropical, Antheraea mylitta Drury nourrie sur le feuillage de Shorea robusta. Pendant sa vie larvaire de 42 jours, la consommation totale moyenne d'une larve est de 108,06 g dont 61,81 g sont assimilés par la larve. L'assimilation et la croissance des tissus s'avèrent être positivement corrélées avec la consommation de feuilles et la maturité de la larve. La digestibilité approximative baisse avec l'avancement en âge tandis que l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée augmente jusqu'au quatrième âge et baisse au cinquième âge.

INTRODUCTION

Les études sur les paramètres nutritionnels des insectes séricigènes sont nécessaires pour une meilleure gestion et un meilleur développement de l'industrie séricicole. Des études sur l'ingestion de nourriture, la digestion et l'utilisation de feuilles de mûrier chez les vers à soie mûrier, muga et eri ont déjà été faites respectivement par Ueda et Suzuki (1967), Barah et coll., (1989) et Pant et coll. (1986).

Shorea robusta est l'une des principales plantes hôtes du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury (Jolly et coll., 1968) et *Laria* est l'une des écoraces les plus importantes du ver à soie tropical *A. mylitta* se nourrissant sur *Shorea robusta* (Sinha et coll., 1992). Nous avons donc pensé qu'il serait utile d'étudier la consommation et l'utilisation des feuilles de *Shorea robusta* par l'écorace *Laria* de *A. mylitta* D. pour connaître le mode de consommation et d'utilisation des feuilles de *Shorea robusta* par l'écorace *Laria* de *A. mylitta* D.

MATERIELS ET METHODES

Des larves saines de l'écorace *Laria* de *A. mylitta* sont élevées en intérieur du premier au cinquième âge sur des feuilles de *S. robusta* pendant la deuxième saison d'élevage (sept.-nov.) d'après la méthode décrite par Rana et coll., (1987). Quatre répétitions de cinquante larves chacune sont conservées pendant toute la période larvaire de la levée jusqu'à la fin de l'élevage. Un lot parallèle de vers est élevé dans des conditions identiques pour remplacer les larves faibles et mortes au cours de l'étude. De plus, un lot témoin de feuilles provenant du lot donné en nourriture aux vers est aussi conservé, pour déterminer la perte de poids des feuilles due à la dessiccation. Les quantités consommées, excrétées et le poids larvaire sont mesurés et enregistrés sauf pendant la période de mue. La méthode gravimétrique de Waldbauer (1968) est employée pour l'évaluation au jour le jour de la consommation de nourriture par les larves.

La formule IPB de Petruszewicz et de Mac Fayden (1970) est utilisée pour le calcul de l'énergie, de l'assimilation de la nourriture et de la respiration. Les données sur l'assimilation et le gain en poids sont converties en coefficient d'utilisation et de croissance, d'après la suggestion d'Evans (1939).

RESULTATS ET DISCUSSION

La quantité de nourriture consommée, évacuée, assimilée, la croissance des tissus et la nourriture oxydée en fonction de l'âge sont présentées dans le Tableau I pour tous les stades larvaires. Il est évident d'après le tableau que la consommation moyenne totale de feuilles par une larve est de 108,068 g. Dans le processus de croissance naturelle des larves, la quantité de nourriture consommée augmente du premier au cinquième âge. Dans l'expérience décrite, la consommation est maximum pendant le cinquième âge soit 77,377 % de la consommation totale. Prem Chand (1979) a rapporté des résultats presque similaires chez *Diacrisia obliqua*.

Chez les insectes, l'assimilation est la quantité totale de nourriture disponible pour être incorporée comme substances corporelles ou pour être métabolisée pour l'énergie (Reddy et Alfred, 1979). Dans notre expérience, l'assimilation la plus élevée est enregistrée pendant le cinquième âge (73,602 %) et s'avère être liée à la quantité de nourriture consommée. Cette observation corrobore celles de Vats et Kaushal (1982). Il est clair d'après les données qu'il y a une corrélation directe entre la croissance des tissus et l'âge des larves. Il s'avère que la croissance des tissus est également positivement liée à la quantité de nourriture consommée (Figs 1 & 2) et est maximum (61,819 %) chez les larves du cinquième âge. Le poids larvaire moyen des larves matures au cinquième âge est de 18,00 grammes.

Les trois paramètres principaux de la physiologie nutritionnelle, c'est à dire la digestibilité, l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) en substances corporelles sont présentés dans le Tableau II. Il est évident d'après ce tableau que la digestibilité approximative (AD) est la plus élevée (76,986 %) chez les larves du premier âge, elle baisse progressivement avec l'avancement en âge et atteint son seuil minimum (54,410 %) chez les larves du cinquième âge. Des observations presque similaires ont été rapportées chez *P. ricini* (Poonia, 1978) et *B. mori* (Horie et coll., 1978). L'AD plus élevée aux premiers âges pourrait être due au fait que les jeunes larves sont généralement des mangeurs sélectifs et se nourrissent de jeunes feuilles succulentes qui contiennent un faible taux de fibres brutes et sont faciles à digérer tandis que les larves d'âge plus avancé ingèrent des feuilles adultes avec des nervures dans lesquelles le taux de fibres brutes est élevé ; cela entraîne la baisse de la digestibilité approximative. La valeur moyenne totale de l'AD pour le cinquième âge larvaire chez les larves *Laria* nourries sur *S. robusta* a été calculée sur la base du poids frais et s'élève à 68 % tandis que chez *Antheraea proylei* elle est de 71 % (Rana et coll., 1987).

Il est évident d'après le Tableau II que l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) en substances corporelles augmente du premier au quatrième âge et baisse au cinquième âge. Mukherji & Guppy (1970) et Latheef & Harcourt (1972) ont aussi trouvé la même tendance à la hausse et à la baisse pour l'ECI et l'ECD chez différents insectes. Les valeurs plus faibles d'ECI et d'ECD aux premiers âges pourraient être dues au fait qu'une plus petite portion de la nourriture ingérée ou digérée est utilisée pour la croissance des tissus et plus pour l'entretien, tandis qu'aux derniers âges, le taux de métabolisme est plus élevé qu'aux premiers stades et donc il y a plus de nourriture ingérée ou digérée disponible pour la conversion en tissu corporel. La valeur moyenne totale de l'ECI pendant toute la période larvaire est de 21,151 %. La même valeur s'élève à 22-23 % chez les larves matures de *B. mori* (Horie et Watanabe, 1983). La valeur moyenne totale de l'ECD est de 31,333 % chez les larves *Laria* nourries sur *S. robusta* tandis qu'on a rapporté que l'ECD pour *A. proylei* nourri sur *Quercus serrata* est de 34 % (Rana et coll., 1987).

De plus, l'ECI et l'ECD baissent toutes les deux au cinquième âge où il se produit une croissance maximum des tissus. La consommation maximum de nourriture pendant cet âge qui dure le plus longtemps (77,37 % de la consommation totale) est peut être responsable du taux élevé de croissance des tissus malgré la baisse de l'ECI et de l'ECD. La baisse de l'ECI et de l'ECD au cinquième âge pourrait être due au fait qu'une quantité plus importante de nourriture ingérée ou digérée est métabolisée pour l'entretien du corps et une moins grande quantité est utilisée pour la croissance des tissus.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	681
General sericulture	
Mûrier	683
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	685
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	689
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	692
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	694
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	697
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	698
Silkworms: silk glands	
Soie	699
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>Romanian</i> .	

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

Sériciculture générale

General sericulture

Whitefly, *Dialeuropora decempuncta* - A new challenge to sericulturists.

La mouche blanche, *Dialeuropora decempuncta* - Un nouveau défi pour les sériciculteurs.

BANDYOPADHYAY U.K., SANTHAR KUMAR M.V.

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 10-12. (E)

National strategy for conservation and sustainable use of seri-biodiversity: a felt need.

Stratégie nationale pour la conservation et l'utilisation soutenue de la biodiversité séricicole : un besoin reconnu.

DANDIN S.B.

NSSP, Bangalore, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 5-10. (E)

Study of available phosphorus in soils of mulberry gardens in Karnataka.

Etude du phosphore disponible dans les sols des plantations de mûriers au Karnataka.

PRABHURAJ D.K. *et al.*

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, Karnataka, India.

2000 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 47-51. (E)

Effects of water from different sources on reeling performance and raw silk quality of silkworm (BR-Urboshi) cocoons. 2/ Water of Rajshahi area.

Effets de l'eau de différentes sources sur les performances de dévidage et la qualité de soie sauvage des cocons de vers à soie (BR-Urboshi). 2/ Eau de l'aire de Rajshahi.

RAHMAN M.M., ZAMAN M.B.

1997 Bangladesh J. Sci. Ind. Res., Vol. 32(44), 602-606.

Popularisation of bivoltine sericulture technology.

Popularisation de la technologie de sériciculture bivoltine.

RAJAN R.K., HIMANTHARAJ M.T., SINGH G.B., DATTA R.K.

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 22-24. (E)

Adoption of new technology packages in Kolar district.

Adoption d'ensembles de nouvelles technologies dans le district de Kolar.

RAMA MOHANA RAO P. *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 17-18. (E)

Korean sericulture - Adding new dimensions.

Sériciculture coréenne - Prise en compte de nouvelles dimensions.

SHARMA K.R., SINHA R.K.

Regional Office, Central Silk Board, New Dehli, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 24-26. (E)

Role of sericulture on sustenance of joint forest management.

Le rôle de la sériciculture sur la gestion de la forêt.

SINGH B.M.K., SINHA A.K.

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, Bihar, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 14-18. (E)

Soil fertility - A major reason for yield gap in sericulture.

Fertilité du sol - Une cause majeure pour le manque de rendement en sériciculture.

SUBBASWAMY M.R. *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 5-6. (E)

Soyabean to boost cocoon production.

Le soja pour relancer la production de cocons.

SUNDAR RAJ S., CHINNASWAMY K.P., NANGIA N.

University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 11-13. (E)

New mulberry silkworm race authorization system in India.

Système d'autorisation de nouvelles races de vers à soie du mûrier en Inde.

SURENDRA NATH B. *et al.*

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 13-16. (E)

Mûrier

Mulberry

Prospects of biofertilizers for mulberry in humid tropics.

Les bioengrais pour mûriers dans la zone tropicale humide.

ANILKUMAR A.S., JOHN P.S.

College of Horticulture, Kerala Agricultural University, Vellanikkara, Trichur, Kerala, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 19-21. (E)

Studies on the breeding of clonal autotriploid mulberry variety Shaansang 305.

Etudes sur le lignage de la variété de mûrier autotriploïde, Shaansang 305.

HAN M. *et al.*

2000 Canye Kexue, Vol. 26(3), 195-196. (C)

Growth-inhibition effect of *Streptomyces* sp. 39L40C to mulberry twig blight pathogen, *Fusarium lateritium* f. *sp. mori*.

Inhibition de la croissance du pathogène de la rouille des branches de mûrier, *Fusarium lateritium* f. *sp. mori* par *Streptomyces* sp. 39L40C.

IKEDA K., SAITO H., SATO S. I., KODAMA T.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan.

2000 J. Seric. sci. Jpn., Vol. 69(3), 163-168. (Ej)

Effect of sericulture by-products and other organic manures on leaf yield and elemental composition of mulberry.

Effet des dérivés de la sériciculture et autres engrais organiques sur le rendement en feuilles et la composition élémentaire des mûriers.

RAJANNA B.H. *et al.*

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore 650065, Karnataka, India.

2000 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 70-74. (E)

Water stress-mediated changes in antioxidant enzyme activities of mulberry (*Morus alba* L.).

Changements liés au stress hydrique des activités des enzymes antioxydantes du mûrier (*Morus alba* L.).

RAMACHANDRA REDDY A., CHAITANYA K.V., SUNDAR D.

School of Life Sciences, Pondicherry University, Pondicherry 605-014, India.

2000 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(3), 169-175. (Ej)

Purification of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) ferredoxin and its aminoacid sequence analysis.

Purification de la ferrédoxine du mûrier (*Morus bombycis* Koidz.) et analyse de sa séquence d'acides-aminés.

SAKAI K. *et al.*

1998 *Res. Commun. Biochem. Cell. Mol. Biol.*, Vol. 2(3/4), 165-173. (E)

Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice.

Expression transgénique de cécropine B, un peptide antibactérien de *Bombyx mori*, qui confère une résistance renforcée à la rouille bactérienne des feuilles chez le riz.

SHARMA A., SHARMA R., IMAMURA M., YAMAKAWA M., MACHII H.

2000 *FEBS Lett.*, Vol. 484(1), 7-11. (E)

Micropropagation of mulberry Berhampore local variety from apical bud explants of aseptic and field grown plants.

Micropropagation de la variété locale de mûrier de Berhampore à partir d'explants de bourgeons apicaux provenant de plants aseptiques.

SRINIVASA M.N., REVANASIDDIAH H.M., GAYATRI M.C.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 056, Karnataka, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 1-7. (E)

Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR.

Détection d'une petite population de phytoplasmes (MD) du nanisme du mûrier chez les mûriers sans symptômes par PCR.

WEI W., KAWAKITA H., SATO M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(4), 261-269. (E,j)

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

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

Impact of feeding spiralling whitefly affected mulberry leaf on nutritional parameters and cocoon conversion efficiency in the silkworm, *Bombyx mori* L. during fifth instar.

Impact de l'alimentation par des feuilles de mûrier affectées par la mouche blanche sur les paramètres nutritionnels et l'efficacité de la conversion en cocon chez le ver à soie *Bombyx mori* L., pendant le cinquième âge.

AFTAB C.A. *et al.*

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

1999 *Mysore J. Agric. Sci.*, Vol. 33, 355-360. (E)

Effect of different rearing structures on the performance of pure Mysore silkworm breed (*Bombyx mori*).

Effet des différentes structures d'élevage sur la performance du ver à soie de la race Pure Mysore (*Bombyx mori*).

BHARATHI V.P., JAYARAMAIAH M.

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

1999 *Mysore J. Agric. Sci.*, Vol. 33(2), 119-124. (E)

Antiviral substance from silkworm faeces: characterization of its antiviral activity.

Substance antivirale dans les fèces de vers à soie : caractérisation de cette activité antivirale.

HIRAKI A., HIRAYAMA E., KIM J.

Institute of Molecular and Cellular Biology for Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University, Japan.

2000 *Microbiol. Immunol.*, Vol.44(8), 669-676. (E)

Insecticidal effects of a recombinant baculovirus expressing scorpion toxin LqhIT2.

Effets insecticides d'un baculovirus recombinant exprimant la toxine LqhIT2 de scorpion.

IMAI N. *et al.*

Laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(3), 197-205. (Ej)

Rapid method for determination of chlorophyll in silkworm manure.

Méthode rapide pour la détermination de la chlorophylle dans le fumier de vers à soie.

LIU L., DAI D.

1999 *Chongqing Daxue Xuebao Ziran Kexueban*, Vol. 22(3), 139-142.

Effect of naphthylamine compounds on remission of fluorine toxicosis of silkworm.

Effet des composés de naphthylamine sur la rémission de la toxicose au fluor chez le ver à soie.

LU S., DU M.

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

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(3), 146-149. (C,e)

Epizootiological analysis on the occurrence of pebrine in silkworm eggs production.

Analyses épizootologiques sur la présence de la pébrine dans la production d'oeufs de vers à soie.

LU X., WU H., LI Y.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(3), 165-171. (C,e)

Artificial diet rearing for the silkworm - I. Types of diet.

Elevage sur aliment artificiel pour le ver à soie - I. Types d'aliments.

MIAO Y.

Department of Sericulture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 35-38. (E)

Yield attributing and silk technological traits among some multivoltine and bivoltine breeds and their hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Rendement et caractéristiques technologiques de la soie chez des races multivoltines et bivoltines de ver à soie, *Bombyx mori* L. et leurs hybrides.

NARAYAMA SWAMY T.K., GOVINDAN R., ANANTHANARAYAN S.R.

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

1999 *Mysore J. Agric. Sci.*, Vol. 33(1), 39-44. (E)

Role of male silkmoths in transmission of pebrine.

Rôle des papillons mâles dans la transmission de la pébrine.

PATIL C.S., JYOTHI N.B., DASS C.M.S.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura Road, Bangalore 560062, India.

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(7), 7-9. (E)

Consumption and utilization of mulberry leaves by the silkworm, *Bombyx mori* L.

Consommation et utilisation des feuilles de mûrier par le ver à soie, *Bombyx mori* L.

PRABHAKAR M.K., REDDY D.N.R., NARAYANASWAMY K.C.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560065, Karnataka, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 52-60. (E)

Genetic analysis of some quantitative characters in newly evolved bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L.

Analyse génétique des caractères quantitatifs de races bivoltines de ver à soie, *Bombyx mori* L., nouvellement développées.

RADHAKRISHNA P.G., SEKHARPPA B.M., KESHAVA REDDY K.S., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, Karnataka, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 39-46. (E)

Influence of different sources of nitrogenous fertilizers applied to mulberry on rearing performance and cocoons traits of silkworm, *Bombyx mori* L.

Influence des différentes sources d'engrais azotés appliqués aux mûriers sur les performances d'élevage et les caractéristiques des cocons du ver à soie *Bombyx mori* L.

SANNAPPA B., DEVAIAH M.C., GOVINDAN R., CHINNASWAMY K.P.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKV Bangalore 560065, Karnataka, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 15-19. (E)*

Influences of refrigeration humidity on the weight and hatchability of silkworm eggs *Bombyx mori*.

Influences de l'humidité de la réfrigération sur le poids et le taux d'éclosion des oeufs de ver à soie *Bombyx mori*.

SHIROTA T., ASOH T.

The Dainippon Raw Silk Foundation, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

2000 *Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 48, 49-53. (J,e)*

Nutritional status of mulberry leaves as influenced by sewage water irrigation.

Valeurs nutritionnelles des feuilles de mûrier, influencées par l'irrigation.

SHREE M.P., VENKATESH C.M., SUBBARAYAPPA C.T.

Department of Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharati Campus, Bangalore 560056, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 61-66. (E)*

Types of mountages practised in chinese sericulture.

Types d'encabanages utilisés en sériciculture chinoise.

SUGUN R., CHANDRAKALA M.V., KATTI S.R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560062, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 82-84. (E)*

Preliminary study on the effect of different coloured light on the rearing performance and oviposition in the silkworm *Bombyx mori* L.

Etude préliminaire sur les effets de lumières de différentes couleurs sur les performances d'élevage et l'oviposition chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

VENKATESH H., KATTI S.R., PUTTASWAMY S., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560062, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 78-81. (E)*

Effects of dimehypo (disodium 2-methylaminotrimethylene dithiosulfonate) on growth and cocooning of the silkworm *Bombyx mori*. (*Lepidoptera: Saturniidae*).

Effets de diméthypo (disodium 2-méthylaminotriméthylène dithiosulfonate) sur la croissance et le coconage du ver à soie *Bombyx mori* (*Lepidoptera: Saturniidae*).

WANG J., YIN D., LU G., ZHOU F.

1999 *Pestic. Sci., Vol. 55(11), 1070-1076.*

Cloning and biological characterization of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedroviruses isolated in China.

Clonage et caractérisation biologique des virus de la polyédrose nucléaire de *Spodoptera exigua*, isolés en Chine.

WU F. Q. *et al.*

2000 *J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(3), 177-189. (J,e)*

Distribution law studies of major economic characteristics of silkworm (*Bombyx mori*) variety resources.

Etudes des lois de distribution des caractéristiques économiques majeures des différentes variétés de vers à soie (*Bombyx mori*).

ZHANG Z. *et al.*

Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Zhejiang 212018, China.

2000 Canye Kexue, Vol. 26(3), 134-139. (C,e)

Relationship between the neatness of raw silk and the mounting conditions with the checker cocooning frames.

Relation entre la finesse de la soie grège et les conditions de montée avec les encabanages en casiers.

ZHU L.

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

2000 Canye Kexue, Vol. 26(3), 155-158. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry: rearing, feeding, pathology

Impact of hydrocarbons on the non-mulberry silkworms *Antheraea assama* and *Philosamia ricini*.

Impact des hydrates de carbone sur les vers à soie non-mûriers *Antheraea assama* et *Philosamia ricini*.

BARUAH R., UNNI B.G., HANDIQUE R.

1999 *Ecol. Environ. Conserv.*, Vol. 5(4), 347-351. (E)

Influence of egg laying chamber and wing removal on the fecundity of tasar silk moth *Antheraea paphia* Linn. (Saturniidae).

Influence du local de ponte et du retrait des ailes sur la fécondité du papillon tasar *Antheraea paphia* Linn. (Saturniidae).

DASH A.K., BEHERA J., GURU B C

Department of Zoology, Dr Jadunath College, Rasalpur, Balasore 760021, Orissa, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 31-34. (E)

Popularisation of oak tasar in Jammu and Kashmir: promising future.

Popularisation du tasar du chêne dans le Jammu et le Kashmir : avenir prometteur.

DHAR S.L., YADAV R.S.

RTRS, Batote, India.

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(6), 25, 28. (E)

Studies on cocoon biometry of the wild tasar silkmoth *Antheraea paphia* Linn. of Kaptipada forest range and to establish its commercial grading.

Etudes sur la biométrie du ver à soie sauvage tasar *Antheraea paphia* Linn. de la forêt de Kaptipada et établissement de son classement commercial.

GURU B.C., NAYAK B.K., DAS S.K.

P. G. Dept. of Zoology, Utkal University, Bhubaneswar 751004, Orissa, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 67-69. (E)

An effective method to control stem borer infestation in tasar host plants.

Une méthode efficace pour contrôler l'invasion de perceurs de tiges chez les plantes hôtes de tasar.

KAR P.K., MISHRA N.J.

Central Tasar Research and Training Institute, Research Extension Centre, Katghora, Korba, India.

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(5), 15-18. (E)

Muga cocoon stifling: appropriate technologies.

Etouffage des cocons muga : technologies appropriées.

MISHRA S.N.

DCTSC, Sualkuchi, Assam, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(2), 11-12, 17. (E)

Medicinal values of non-mulberry host plants.

Valeurs médicinales des plantes hôtes de séricigènes non-mûriers.

NAIKA R.,DORESWAMY C., VENKATESH GOWDA T.N.

University of Agricultural Sciences, Sericulture College, Chintamani, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(3), 15-17. (E)

Commercial exploitation of diapause potential of muga silkworm (*A. assama* Ww).

Exploitation commerciale du potentiel de diapause des vers à soie muga (*A. assama* Ww).

SAHU A.K., DAS P.K.

RMRS, CSB, Boko, Assam, India.

2000 Indian Silk, Vol.39(5), 23-25. (E)

Influence of tannins and phenols in leaves of castor genotypes on economic parameters of eri silkworm *Samia cynthia ricini* Boisduval (*Lepidoptera: Saturniidae*).

Influence des tannins et des phénols des feuilles des génotypes de ricin sur les paramètres économiques du ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* Boisduval (*Lepidoptera : Saturniidae*).

SANNAPPA B., JAYARAMAIAH M.

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

1999 Mysore J. Agric. Sci., Vol. 33, 297-300. (E)

Result demonstration of integrated package for tasar silkworm rearing.

Résultats du management intégré pour l'élevage de vers à soie tasar.

SHANKARA RAO K.V. *et al.*

Regional Tasar Research Station, Jagdalpur, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(4), 20-22. (E)

Combating termite damage in tasar food plants.

Lutte contre les dommages des termites chez les plantes hôtes des tasars.

TEWARI S.K., SINHA M.K., PAL S.

CTSSS, Lakha, Raigarh, Madhya Pradesh, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(7), 19-23. (E)

Distribution of sericin content in thick tussah cocoon layer.

Distribution de la sérécine contenue dans les couches des cocons de tussah.

WANG J., CHANG L., WANG J., ZHAO G.

1999 Dalian Qinggongye Xueyuan Xuebao, Vol. 18(3), 269-270.

Effect of ectohormone on the duration of instar of giant silkworm (*Antheraea yamamai*).

Effet de l'ectohormone sur la durée de la mue du ver à soie géant (*Antheraea yamamai*).

WANG Y. *et al.*

Shandong Agricultural University, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol.30(3), 18-20. (C,e)

Studies of the association and interaction of temperature, relative humidity and rainfall in tasar forest ecosystem of Vidarbha.

Etudes sur l'association et l'interaction de la température, de l'humidité relative et des précipitations pour l'écosystème de la forêt tasar de Vidarbha.

YADAV G.S.

Regional Tasar Research Station, Post Box 17, Bhandara 441 904, Maharashtra, India.

2000 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 4(1), 20-30. (E)

Breeding of Oak silkworm cocoon varieties 855.858 and the preparation of their F1 hybrid.

Breeding des variétés 855.858 de ver à soie du chêne et préparation de leur hybride F1.

YANG L. *et al.*

2000 Canye Kexue, Vol. 26(2), 125-126. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Identification and characterisation of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila* white.

Identification et caractérisation chez le ver à soie d'un gène transporteur ABC homologue au white de la drosophile.

ABRAHAM E.G., SEZUTSU H., KANDA T., SUGASAKI T., SHIMADA T., TAMURA T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2000 *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 264(1-2), 11-19. (E)

Deletion analysis of all genes of *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis (BmNPV).

Analyse par délétion de tous les gènes de polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV).

GOMI S., KAMITA S.G., MAEDA S.

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 39-41.

***Bombyx mori* prothoracicotropic hormone gene was expressed by recombinant *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus.**

Le gène de l'hormone prothoracicotrope de *Bombyx mori* est exprimé par le virus recombinant de la polyédrose nucléaire d'*Hyphantria cunea*.

GONG C., KOBAYASI J., JIN W., WU X.

Sericultural College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(3), 150-154. (C,e)

The construction of EST database for genome analysis of *Bombyx mori*.

La construction d'une base de données EST pour l'analyse du génome de *Bombyx mori*.

MITA K. *et al.*

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 63-67.

Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*.

Progrès récents de la génétique moléculaire du ver à soie, *Bombyx mori*.

NAGARAJU J.

Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, CDFD Interim Building Complex, Nacharam, ECIL Road, Hyderabad 500 076, India.

2000 *Current Science*, Vol. 78(2), 151-161. (E)

Extrachromosomal transmission of microinjected DNA to the progeny of silkworm *Bombyx mori*.

Transmission extrachromosomique d'ADN micro-injecté chez le ver à soie *Bombyx mori*.
SHAMILA Y., MATHAVAN S.

1999 *Biotechnol. Lett.*, Vol. 21(5), 425-430. (E)

Isolation and purification of recombinant human GM-CSF from hemolymph fluid of *Bombyx mori*.

Isolément et purification du GM-CSF humain recombinant à partir de l'hémolymphe de *Bombyx mori*.
SHU H. *et al.*

1999 *Gaojishu Tongxun*, Vol. 9(7), 45-49.

Estimation of heritability and correlation of some quantitative traits in line x tester analysis in silkworm, *Bombyx mori* L.

Estimation de l'héritabilité et corrélation des traits quantitatifs dans les analyses lignée x testeur chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

SOFI A. M., MASSODI M. A., KAMALI A.S.

Division of Sericulture, SKUST, Mirgund, Jammu and Kashmir, India.

1999 *Mysore J. Agric. Sci.*, Vol. 33, 289-296. (E)

Mariner (Mos1) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells.

Transposase de Mariner (Mos1) et intégration génomique des séquences de gènes étrangers dans les cellules de *Bombyx mori*.

WANG W., SWEVERS L., IATROU K.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Canada.

2000 *Insect Molecular Biology*, Vol. 9(2), 145-155. (E)

PfDNV nonstructural proteins suppress viral RNA splicing.

Les protéines non structurales PfDNV suppriment l'épissage de l'ARN viral.

YAMAGISHI J., ASANO S., SAHARA K., IIZUKA T., BANDO H.

Applied Molecular Biology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(4), 271-276. (J,e)

RAPD marker of the cocoon filament size gene in the silkworm (*Bombyx mori*).

Marqueur RAPD du gène du titre du filament du cocon chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

ZHAO Q. *et al.*

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(3), 188-189. (C)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Regulation of secretion of neuropeptide hormones: prothoracicotropic hormone (PTTH) of *Bombyx mori*.

Régulation de la sécrétion des hormones neuropeptidiques : hormone prothoracicotrope (PTTH) de *Bombyx mori*.

AIZONO Y., SHIRAI Y.

1998 *Horumon no Bunshi Seibutsugaku*, Vol. 8, 149-175.

The principal transregulatory protein of nuclear polyhedrosis virus, IE1: a functional analysis of BmNPVIE1.

La principale protéine transrégulatrice du virus de la polyédrose nucléaire, IE1 : analyse fonctionnelle de BmNPVIE1.

BANDO H. *et al.*

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 26-29.

Bombyxin exhibits an insulin-like response to modification in the N-terminal region of the A chain.

La bombyxine présente une réponse comme l'insuline à la modification dans la région N-terminale de la chaîne A.

BULLESBACH E.E.

1999 *J. Pept. Res.*, Vol. 54(1), 12-17. (E)

Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* cryII-type crystal protein gene.

Clonage d'un nouveau gène de protéine de type cryII de *Bacillus thuringiensis*.

CHOI S.K., SHIN B.S., KONG E.M., RHO H.M., PARK S.H.

Laboratory of Microbial and Bioprocess Engineering, Korea Research Institut of Bioscience and Biotechnology, Yusong, China.

2000 *Curr. Microbiol.*, Vol. 41(1), 65-69.(E)

Equilibrium unfolding of *Bombyx mori* glycyl-tRNA synthetase.

Déplieement à l'équilibre de la glycyl-tRNA synthétase de *Bombyx mori*.

DIGNAM J.D., QU X., CHAIRES J.B.

Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Ohio, Toledo, Ohio 43614-5804, USA.

2000 *J. Biol. Chem.* (E)

The receptor binding conformation of bombyxin is induced by Alanine.

La conformation de la liaison au récepteur de la bombyxine est induite par l'Alanine.

FULLBRIGHT G., BULLESBACH E.E.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina,
173 Ashley Av, Po Box 250509, USA

2000 *Biochemistry*, Vol. 39(32), 9718-9724. (E)

Chemical studies on diapause hormone.

Etudes chimiques de l'hormone de diapause.

IMAI K.

1999 *Bull. Fac. Bioresour. Mie Univ.*, Vol. 21, 87-100.

Same ancestral hormones in invertebrates and vertebrates: bombyxin and insulin.

Des hormones ancestrales identiques chez les invertébrés et les vertébrés : la bombyxine et l'insuline.

IWAMI M.

1998 *Hormon no Bunshi Seibutsugaku*, Vol. 8, 37-70.

Baculovirus infection blocks the progression of fat body degradation during metamorphosis in *Bombyx mori*.

L'infection par le baculovirus bloque la progression de la dégradation du corps adipeux pendant la métamorphose chez *Bombyx mori*.

IWANAGA M., KANG W.K., KOBAYASHI M., MAEDA S.

Laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, Wako, Japan.

2000 *Arch. Virol.*, Vol. 145(9), 1763-1771. (E)

Genetic variant and inheritance of the 35K protease in digestive juice of silkworm, *Bombyx mori*.

Variant génétique et hérédité de la protéase 35K dans le suc digestif du ver à soie, *Bombyx mori*.

JIANG Y., BANNO Y., FUJII H.

College of Animal Science, Zhejiang University, 268 Kaixuan Road, Hangzhou, 310029, China.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(3), 225-227. (E,j)

Characteristics of greenish pigments from silkworm excrement by ethanol extraction.

Caractéristiques des pigments verdâtres des excréments de vers à soie par extraction à l'éthanol.

KIM Y.H.

1998 *Han'guk Sikp'um Yongyang Hakhoechi*, Vol. 11(4), 375-380.

Silkworm Bm1 SINE RNA increases following cellular insults.

L'ARN SINE Bm1 de ver à soie augmente après des dommages cellulaires.

KIMURA R.H., CHOUDARY P.V., SCHMID C.W.

1999 *Nuc. Acid Res.*, Vol. 27(16), 3380-3387.

Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects.

Régulation dynamique de l'ecdystéroïdogénèse de la glande prothoracique : l'hormone prothoracicotrope recombinante de *Manduca sexta* et les extraits de cerveau ont des effets identiques.

LI G. *et al.*

Department of Biology, Campus Box 3280, Coker Hall, University of North Carolina, 27599-3280, Chapel Hill, NC, USA.

2000 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30(11), 1079-1089. (E)

Reciprocal transplant of an ovarian imaginal disc and uptake of vitellogenin by the ovaries of two wild silkworms, *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*.

Transplantation réciproque d'un disque imaginal ovarien et absorption de la vitellogénine par les ovaires de deux vers à soie sauvages, *Antheraea pernyi* et *Antheraea yamamai*.

LIU C.L., KAJIURA Z., TAKEI R., NAKAGAKI M.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda-shi, Nagano-ken, 386-8567, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(4), 251-260. (J,e)

Sniffing by a silkworm moth: wing fanning enhances air penetration through and pheromone interception by antennae.

La respiration d'un papillon de ver à soie : le battement des ailes améliore la pénétration de l'air et l'interception de phéromone par les antennes.

LOUDON C., KOEHL M.A.

Division of Biology, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, USA.

2000 *J. Exp. Biol.*, Vol. 203(19), 2977-2990. (E)

Analysis of the fixed direction of a silkworm body during cocoon construction.

Analyse de la direction fixe du corps d'un ver à soie pendant la construction du cocon.

MIURA M. *et al.*

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386-8657, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(3), 207-214. (E,j)

Free fatty acid composition in a silkworm (*Bombyx mori*) blood.

Composition en acides gras libres du sang de ver à soie (*Bombyx mori*).

NAKAMURA T.

1999 *Nat. Prod. lett.*, Vol. 13(4), 317-320.

Ecdysone receptors and their biological actions.

Les récepteurs d'ecdysone et leurs actions biologiques.

RIDDIFORD L.M., CHERBAS P., TRUMAN J.W.

Department of Zoology, University of Washington, Seattle 98195-1800, USA.

2000 *Vitam. Horm.*, Vol. 60, 1-73. (E)

Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*.

Caractérisation et purification par affinité de l'estérase d'hormone juvénile de *Bombyx mori*.

SHIOTSUKI T. *et al.*

Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Japan.

2000 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 64(8), 1681-1687. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo.

Les amyloïdes protègent l'ovocyte des papillons de vers à soie et l'embryon.

ICONOMIDOU V.A., VRIEND G., HAMODRAKAS S.J.

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Greece.

2000 FEBS Lett., Vol. 479(3), 141-145. (E)

Studies on artificial insemination of the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'insémination artificielle du ver à soie, *Bombyx mori*.

TAKEMURA Y.

The Dainippon Raw Silk Foundation, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

2000 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 48, 1-47. (J,e)

Changes of ATPase activity for esterase A4 in vitro 25 C and its relationship with diapause in silkworm eggs, *Bombyx mori*.

Changements de l'activité de l'ATPase pour l'estérase A4, in vitro à 25 C, et ses relations avec la diapause des oeufs chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

XU S. *et al.*

Sericultural College, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

2000 Canye Kexue, Vol. 26(3), 140-145. (C,e)

Effects of juvenile hormone and ecdysteroid on ovarian development of the japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Effets de l'hormone juvénile et d'ecdystéroïde sur le développement ovarien du ver à soie japonais du chêne, *Antheraea yamamai*.

YE G., HU C., GONG H.

1999 Zhejiang Nongye Daxue Xuebao, Vol. 25(3), 276-280.

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Subunit structure and conformation of *Bombyx mori* silk proteins.

Structure et conformation des sous-unités des protéines de la soie de *Bombyx mori*.

CAI Z., YU T., HUANG W.

1998 *J. China Text. Univ.*, Vol. 15(4), 6-9.

A 13C NMR study on the structural change of silk fibroin from *Samia cynthia ricini*.

Une étude RMN 13C sur le changement structural de la fibroïne de soie de *Samia cynthia ricini*.

NAKAZAMA Y., NAKAI T., KAMEDA T., ASALYRA T.

1999 *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 311(5), 362-366.

Dynamic rearrangement within the *Antheraea pernyi* silk fibroin gene is associated with four types of repetitive units.

Le réarrangement dynamique à l'intérieur du gène de fibroïne de soie d'*Antheraea pernyi* est associé avec quatre types d'unités répétées.

SEZUTSU H., YUKUHIRO K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2000 *J. Mol. Evol.*, Vol. 51(4), 329-338. (E)

Expression of cyclin E in endomitotic silk-gland cells from mulberry silkworm.

Expression de cycline E dans les cellules endomitotiques de la glande séricigène du ver à soie du mûrier.

SUDHAKAR B., GOPINATHAN K.P.

Microbiology and Cell Biology Department, Indian Institute of Science, 560012, Bangalore, India.

2000 *Gene*, Vol. 257(1), 77-85. (E)

Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation.

Contrôle de l'assemblage en feuillets bêta dans une soie produite par génie génétique par phosphorylation/déphosphorylation enzymatique.

WINKLER S., WILSON D., KAPLAN D.L.

Department of Chemical and Biological Engineering and Bioengineering Center, Tufts University, Massachusetts 02155, USA.

2000 *Biochemistry*, Vol. 39(41), 12739-12746. (E)

Soie

Silk

Structure and dynamics of silk fibroin studied with ^{13}C , ^{15}N , and ^2H solid-state NMR.

Structure et dynamiques de la fibroïne de soie étudiée par RMN à l'état solide de ^{13}C , ^{15}N , et ^2H .

ASAKURA T., DEMURA M.

1998 *Macromol. Symp.* 143, 1-10.

Preparation and properties of powdered fibroin from natural silk.

Préparation et propriétés de fibroïne en poudre à partir de soie naturelle.

GELLER B.E. *et al.*

1999 *Uzb. Khim. Zh.*, Vol. 3, 69-72.

Studies on functional antibacterial and deodorous fibre developed out of floss of mulberry cocoons.

Etudes sur les fibres fonctionnelles antibactériennes et désodorisantes développées à partir de la bourre de cocons de soie.

HU Z.W., CHEN W.X.

Zhejiang Institute of Science and Technology, College of Materials and Textiles, Hangzhou 310033, China.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 8-14. (E)

Dyeing behavior of silk proteins in relation to silkworm diet.

Comportement tinctorial des protéines de soie en relation avec l'alimentation des vers à soie.

ITO H. *et al.*

1999 *Text. Res. J.*, Vol. 69(11), 825-828.

Dyeability of chitosan-treated tussah silk fabric by 1:1 type premetalized and 1:2 type premetalized dyes.

Capacité de teinture des tissus de soie tussah traités au chitosan par des colorants de type prémetalisé 1:1 et prémetalisé 1:2.

KAKO T.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(3), 221-224. (J)

Dyeability of tussah silk fabric treated with chitosan to vat dye.

Capacité de teinture de tissus de soie tussah traités avec du chitosan.

KAKO T.

School of Humanity for Environment Policy and Technology, Himeji Institute of Technology, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(4), 277-282. (J,e)

Dynamics of the tyrosine side chain in *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* silk fibroin studied by solid state ^3H NMR.

Dynamique des chaînes latérales de tyrosine chez la fibroïne de soie de *Bombyx mori* et *Samia cynthia ricini*, étudiée par RMN de ^3H à l'état solide.

KAMEDA T. *et al.*

1999 *Macromolecules*, Vol. 32(25), 8491-8495. (E)

Hydrogen bonding structure of serine side chains in *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* silk fibroin determined by solid-state ^3H NMR.

Structure des liaisons hydrogène des chaînes latérales de sérine chez la fibroïne de soie de *Bombyx mori* et *Samia cynthia ricini*, déterminée par RMN de ^3H à l'état solide.

KAMEDA T. *et al.*

1999 *Macromolecules*, Vol. 32(21), 7166-7171. (E)

Production and mechanical properties of fibroin-cellulose blended fiber.

Production et propriétés mécaniques des fibres du mélange fibroïne-cellulose.

KANEKATSU R., IIZUKA E., SHIRAI K., KIGUCHI K., ABE K., HACHIMORI A.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(3), 191-196. (E,j)

Application of fibroin in controlled release tablets containing theophylline.

Application de fibroïne dans la délivrance contrôlée de comprimés contenant de la théophylline.

KATAYAMA H., ISSIKI M., YOSHITOMI H.

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Hiroshima, Japan.

2000 *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 23(10), 1229-1234. (E)

Transverse long period in wet silk fibers.

Longue période transversale chez les fibres de soie humides.

KAWAHARA Y., SHIOYA M.

1999 *Text. Res. J.*, Vol. 69(10), 791-792.

Effect on fibroin's adsorbing and releasing capacity by the modification to amide.

Effet de la modification en amide sur la capacité d'absorption et de relargage de la fibroïne.

MIN S., ZHU L., YAO J., HU Z.

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

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(3), 159-164. (C,e)

Structural changes and their effect on mechanical properties of silk fibroin/chitosan blends.

Changements structuraux et leurs effets sur les propriétés mécaniques des mélanges fibroïne de soie/chitosan.

PARK S.J. *et al.*

1999 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 74(11), 2571-2575. (E)

Effect of dusting some plant products on quantitative and qualitative characters of mulberry silk.

Effet du saupoudrage de produits végétaux sur les caractères quantitatifs et qualitatifs de la soie.

SANTOSHKUMAR G.H. *et al.*

KLE'S School of Agriculture, Lingaraj College Campus, Belgaon 590001, Karnataka, India.

2000 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 4(1), 75-77. (E)

Silk fiber modification by chemical finishing.

Modification de la fibre de soie par apprêtage chimique.

SHIOZAKI H.

1999 *Senshoku Kenkyu*, Vol. 43(2), 33-38.

Effect of bleaching on dyeing of silk fabric with acid green and basic red dyes.

Effet du blanchiment sur la teinture des tissus de soie avec des colorants acides vert et basiques rouges.

SINGH A., GROVER E., GAHLOT M.

Department of Clothing and Textiles, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, Uttar Pradesh, India

2000 Indian Silk, Vol. 39(6), 26-28. (E)

Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds.

Effets encourageants d'un film de soie pour le recouvrement épidermique des blessures profondes de la peau.

SUGIHARA A. *et al.*

The First Department of Pathology and Department of Dermatology, Kansai Medical University, Osaka, Japan.

2000 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 225(1), 58-64. (E)

Development of the reeling machines of three-dimensional type silk material "Silk Shell" and the production.

Développement des machines à dévider la soie en trois dimensions de type "Silk Shell" et production.

TAKABAYASHI C., HIKOBE K., MIYAZAKI E., ITSUBO T., NAKAMURA K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-4-8, Gohda, Okaya, Nagano, 394-0021, Japan.

2000 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(3), 215-219. (J,e)

Stability of molecular order in silkworm silk.

Stabilité de l'ordre moléculaire chez la soie du ver à soie.

WATT S.W., MAC EWEN I.J., VINEY C.

1999 Macromolecules, Vol. 32(25), 8671-8673. (E)

Synthesis, transport and accumulation of vitellogenin in the japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae).

Synthèse, transport et accumulation de vitellogénine chez le ver à soie japonais du chêne, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae).

YE G., HU C., HONG J., GONG H.

1999 Kunchong Xuebao, Vol. 42(3), 225-233.

