

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
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

Articles scientifiques / Scientific papers

- Effects of Jinlu, an anti-juvenile hormone on the cocoon production of silkworm, *Bombyx mori* L.** 349
 Effets de Jinlu, une anti-hormone juvénile sur la production de cocons chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. 357
 MIAO YUNGEN

- Use of HP-size exclusion chromatography to study the degree of polymerization of silk (*B. mori*) fibroin fibres** 363
 Utilisation de la chromatographie d'exclusion HP pour étudier le degré de polymérisation des fibres de fibroïne de soie (*B. mori*) 375
 G. FREDDI, A. BERLIN, M. TSUKADA & E. DUBINI PAGLIA

- Management of mulberry root rot with antagonistic micro-organisms** 383
 Lutte contre le pourrissement de la racine chez le mûrier à l'aide de micro-organismes antagonistes 387
 R. SRIDAR, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN

Rapports techniques / Technical reports

- Artificial hatching of diapausing silkworm (*Bombyx mori* L.) eggs at different hours of oviposition through alternative chemicals** 389
 Ecllosion artificielle d'oeufs de vers à soie diapausants (*Bombyx mori* L.) plusieurs heures après la ponte par utilisation de produits chimiques alternatifs 395
 A. Q. RATHER & M. AIJAZ

- Studies on the light and water content of artificial diet for silkworm, *Bombyx mori* rearing** 399
 Etudes de l'effet de la lumière et de la teneur en eau de l'aliment artificiel sur l'élevage du ver à soie *Bombyx mori* 403
 MIAO YUNGEN

- Evolution of new productive bivoltine hybrid, CSR3 × CSR6** 407
 Mise au point d'un nouvel hybride bivoltin productif CSR3 × CSR6 417
 R. K. DATTA, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR, M. M. AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU

- Studies on development of an oral "vaccine" against nuclear polyhedrosis in silkworm *Bombyx mori* L.** 421
 Etudes sur la mise au point d'un vaccin oral contre la polyédrose nucléaire chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. 429
 B. NATARAJU, V. SIVAPRASAD & R. K. DATTA

Seasonal bioassay moulting response of silkworm (<i>Bombyx mori</i> L.) to the nutritive quality of preserved mulberry (<i>Morus</i> spp.) leaf	433
Evaluation biologique de la qualité nutritive de feuilles de mûrier (<i>Morus</i> spp.) conservées, par mesure de la réponse de mue et des performances du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. en fonction des saisons	
E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN	445

Gradual improvement of mulberry varieties under irrigated conditions in South India and the optimal program for varietal selection in the tropics	449
Amélioration progressive de variétés de mûrier irrigué dans le sud de l'Inde et programme optimal pour une sélection variétale dans les zones tropicales	
A. SARKAR, JALAJA S. KUMAR & R. K. DATTA	463

Evaluation of specific parameters in the isolation of protoplasts from mesophyll cells of three mulberry cultivars	469
Evaluation de paramètres spécifiques pour isoler des protoplastes à partir de cellules de mésophylle chez trois cultivars du mûrier	
U. PAVAN, A. V. RAO, V. YASHODHARA, N. RAMA SWAMY & A. SADANANDAM	475

Efficacy of biocontrol agents and plant products against <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> and <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mori</i> causing bacterial blight in mulberry .	479
Efficacité d'agents de lutte biologique et de produits à base de plantes contre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> et <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mori</i> responsables de la flétrissure bactérienne chez le mûrier	
M. F. BAQUAL, D. D. SHARMA, V. P. GUPTA & D. S. CHANDRASHEKAR	487

Maximisation of leaf yield of mulberry <i>Morus alba</i> (L.) and economic returns per unit area of land from sericulture through mulching	491
Maximalisation du rendement en feuilles et des revenus par unité de surface de mûriers (<i>Morus alba</i> L.) grâce au paillage	
S. K. GANGWAR, P. S. SINHA, B. D. SINGH, RAM NAGINA, J. JAYASWAL & U. P. GRIYAGHEY	499

Germination and seedling growth in <i>Machilus bombycina</i> King. morphotypes	503
Germination et croissance de plantules chez des morphotypes de <i>Machilus bombycina</i> King.	
A. SRIVASTAVA, K. SINGH, P. K. DAS, A. A. SIDDIQUI & S. S. RAGHUVANSHI	509

Note brève / Brief note

Design of silkworm feeding shed	513
Plan d'une magnanerie pour vers à soie	
J. REED & A. SNYMAN	519

Bibliographie / Bibliography	521
---	------------

Instructions aux auteurs / Information for contributors

EFFECTS OF JINLU, AN ANTI-JUVENILE HORMONE ON THE COCOON PRODUCTION OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUN-GEN

Department of Sericulture & Apiculture, College of Animal Science,
Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

The study showed the total larval duration was reduced considerably in the batches treated with Jinlu (an anti-JH) in the third instar or fourth instar in both spring and summer crop. Other parameters such as cocoon weight, shell weight, shell ratio, and filament length were reduced in the batches treated with Jinlu in the third or the fourth instar. On the other hand, reelability % increased with less size deviation and fine silk filament. In the batches treated with Jinlu in the fifth instar, marginal improvement was observed in shell weight, shell ratio and filament length.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., Jinlu (an anti-juvenile hormone).

INTRODUCTION

The silkworm growth, development and metamorphosis are controlled by hormones, as is true with other animals.

The insect endocrine organs, such as brain, subesophageal ganglion (SG), corpora cardiaca (CC), corpora allata (CA) and prothoracic gland (PG) have been found to play an important role in the development and regulation of the life cycle. In 1970s, the substance that works against JH was extracted from plants and is called "anti-juvenile hormone (Anti-JH)" (Bowers W. S. *et al.* 1976). Up to now, more than 20 kinds of anti-JH compounds were separated and synthesized, most of them are imidazole derivatives (Staal G. B. 1986). Intensive pioneering research showed that anti-juvenile hormone displays different physiological effects when administered in different stages of insects (Kiguchi K. *et al.* 1984; 1985; Lu Xuefang, Li Rongqi, 1987). At present, some imidazole derivatives such as KK-42, KK-84, SSP-11, SM-1 are applied practically to induce the trimolter and produce superfine cocoon silk (Akai H. *et al.* 1984, 1986, 1989; Lu Xuefang, Li Rongqi, 1987).

In the present study, we investigated the effects of Jinlu, an anti-JH on the growth of silkworm, cocoon production and silk quality of silkworm, *Bombyx mori* L.

MATERIALS AND METHODS

1. Experiment animals:

The bivoltine silkworm hybrid Qing Song × Hao Yue forms the material for the study during spring crop and Xin Hang × Bai Yun form the material for the study during summer. The Hu Sang 197 variety of mulberry leaves harvested from the irrigated mulberry garden was used as the food for the silkworms in both seasons.

Silkworms were mass reared by following standard rearing practice upto fourth instar. After fourth moult, the larvae were separated into three groups. Each group consisted of three replications, each of 100 larvae for each treatment.

2. Administration of anti-juvenile:

One gram of Jinlu (anti-JH) was dissolved in water to make 250mg/l solution. For one group, 250mg/l Jinlu solution was sprayed on mulberry leaves and fed to silkworms at the rate of 4µg/larva during 0-48hrs of fourth instar. For the second group, Jinlu solution was sprayed on the mulberry leaves and fed to silkworms from 72-96hrs of fifth instar. The third group was kept as control without any treatment.

3. Investigation:

The matured larvae were mounted on the plastic collapsible mountages. The cocoons were harvested on sixth day after mounting and were tested to find out the number of dead and live pupae by gently shaking the cocoons. The percentage of dead pupae was calculated based on the cocoons harvested. Larval duration, cocoon weight, shell weight, shell ratio percentage were recorded sex wise. Defective cocoons were removed from each one of the replications and then cocoons of uniform shape, size and hardness were selected randomly and processed for single cocoon reeling for reeling parameters such as filament length, non breakable filament length, denier, reelability and size deviation.

RESULTS

1. Larval duration:

The rearing and reeling parameters of two bivoltine races obtained during spring and summer crops on the basis of the parameters, such as larval duration, trimolters induction rate, larval weight, percentage of dead pupae, cocoon weight, shell weight, shell ratio and reeling parameter such as filament length, non breakable filament length, filament thickness, reelability and size deviation of the experimental batches along with control were presented. The mean data obtained from the replicates for each one of the season are presented separately. The variability observed in the rearing and reeling parameters in the experimental batches with regard to the parameters studied are compared with control and are presented in Table I-IV.

During spring season, when Qing Song × Hao Yue race silkworms were treated with Jinlu during 0-48 hrs of fourth instar, the fourth instar larval period was extended upto 192 hrs and at the end all worms spun cocoons, whereas in the control batch the fourth instar was only 96hrs, but total larval duration was reduced in the Jinlu treated in the fourth instar and it was only 444 hrs, whereas control it was 558hrs. The Jinlu treated batch during 72-96 hrs of fifth instar the total larval duration was similar to control (558hrs) (Table I).

In summer crop, when treated with Jinlu during 0-48 hrs of third instar and fourth instar and 72-96 and 96-120 hrs of the fifth instar, total larval period varied considerably and it was 415, 391, 496 and 496 hrs respectively and in control it was 492 hrs. In this crop also larval period of Jinlu-treated instar was prolonged when compared to control (Table II).

2. Trimoulter induction rate:

When Jinlu was given to fourth instar silkworms in spring crop, all worms (100%) became trimolters, whereas in summer crop when Jinlu was given to the third and fourth instar, trimoulter induction rate was 89.50% and 94.25% respectively (Table I).

Table I. Effect of AJH(Jinlu) on larval growth, cocoon yield and cocoon characters. (Race: Qing Song × Hao Yue)

Tableau I. Effet de l'AJH (Jinlu) sur la croissance larvaire, le rendement en cocons et les caractères du cocon (Race : Qing Song × Hao Yue).

Parameters	Time of Jinlu application		
	4 th instar	5 th instar	Control
	4 ^{ème} âge (0-48 h)	5 ^{ème} âge (72-96 h)	Témoin
<i>Paramètres</i>	<i>Période d'application de Jinlu</i>		
4 th instar larval duration (h) / <i>Durée du 4^{ème} âge larvaire (h)</i>	192		96
Total larval duration (h) / <i>Durée larvaire totale (h)</i>	444	558	558
Trimolter induction rate (%) / <i>Taux d'induction de trimuants (%)</i>	100		
10 fully grown larval weight (g) / <i>Poids de 10 larves matures (g)</i>	20.73	48.50	48.30
% of dead pupae / <i>% de chrysalides mortes</i>	0.66	1.00	2.00
Single cocoon weight (g) / <i>Poids d'un cocon (g)</i>			
Female / <i>femelle</i>	0.96	2.36	2.34
Male / <i>mâle</i>	0.78	2.00	2.00
Single cocoon shell weight (g) / <i>Poids d'une coque (g)</i>			
Female / <i>femelle</i>	0.139	0.539	0.532
Male / <i>mâle</i>	0.131	0.535	0.529
Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>			
Female / <i>femelle</i>	14.48	22.83	22.73
Male / <i>mâle</i>	16.79	26.75	26.35
Average single cocoon (g) / <i>Cocon moyen (g)</i>	0.87	2.18	2.17
Average single shell weight (g) / <i>Poids moyen d'une coque (g)</i>	0.135	0.537	0.530
Average shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse moyenne (%)</i>	15.52	24.63	24.42

3. Larval weight:

The mean weight of ten fully-grown larvae of fifth instar, taken one day prior to spinning is presented in table I. When treated with Jinlu in the fourth instar and fifth instar of spring crop, the larval weight was 20.73g, 48.50g respectively and in control it was 48.30g (Table I).

In summer crop, the larval weight was 24.77g, 16.20g, 47.69g, 45.72g in batches treated with Jinlu during 0-48hrs of third and fourth instar, 72-96hrs and 96-120hrs of fifth instar respectively and in control it was 44.52g (Table II).

Table II. Effect of AJH(Jinlu) on larval growth, cocoon yield and cocoon characters. (Race: Xin Hang × BaiYun).*Tableau II. Effet de l'AJH (Jinlu) sur la croissance larvaire, le rendement en cocons et les caractères du cocon. (Race: Xin Hang × BaiYun).*

Parameters / Paramètres	Time of Jinlu application / Période d'application de Jinlu				
	3 rd instar 3 ^{ème} âge (0-48h)	4 th instar 4 ^{ème} âge (0-48h)	5 th instar 5 ^{ème} âge (72-96h)	5 th instar 5 ^{ème} âge (96-120h)	Control Témoin
3 rd instar larval duration (h) <i>Durée du 3^{ème} âge larvaire (h)</i>	96				72
4 th instar larval duration (h) <i>Durée du 4^{ème} âge larvaire (h)</i>	139	144			77
5 th instar larval duration (h) <i>Durée du 5^{ème} âge larvaire (h)</i>			160	160	156
Total larval duration (h) <i>Durée larvaire totale (h)</i>	415	391	496	496	492
Trimolter induction rate (%) <i>Taux d'induction de trimuants (%)</i>	89.50	94.25			
10 fully grown larval weight (g) <i>Poids de 10 larves mûres (g)</i>	24.77	16.20	47.69	45.72	44.52
% of dead pupae <i>% de chrysolide mortes</i>	1.00	0.66	2.00	2.00	3.00
Single cocoon weight (g) / <i>Poids d'un cocon (g)</i>					
Female / <i>femelle</i>	1.23	1.04	2.04	2.10	1.98
Male / <i>mâle</i>	1.00	0.80	1.53	1.35	1.51
Single cocoon shell weight (g) / <i>Poids d'une coque (g)</i>					
Female / <i>femelle</i>	0.248	0.135	0.422	0.440	0.403
Male / <i>mâle</i>	0.232	0.125	0.379	0.321	0.363
Shell ratio (%) / <i>richesse soyeuse (%)</i>					
Female / <i>femelle</i>	20.16	12.98	20.69	20.95	20.35
Male / <i>mâle</i>	23.20	15.62	24.77	23.77	24.04
Average single cocoon (g) <i>Poids moyen d'un cocon (g)</i>	1.12	0.95	1.79	1.73	1.75
Average single shell weight (g) <i>Poids moyen d'une coque (g)</i>	0.240	0.130	0.401	0.381	0.383
Average shell ratio (%) <i>Richesse soyeuse moyenne (%)</i>	21.43	14.13	22.40	22.02	21.88

4. Percentage of dead pupae:

In spring crop, Jinlu treated in fourth and fifth instar batches, % of dead pupae was less and it was 0.66% and 1.00% respectively, when compared to control (2.00%) (Table I). In summer crop, similar observation was recorded in Jinlu treated batches, when compared to control and data has been presented in table II.

5. Single cocoon weight:

In spring crop when Jinlu was treated in the fourth instar, cocoon weights of female and male larvae were reduced considerably and it was 0.96g, 0.78g respectively, whereas in Jinlu treated batch in the fifth instar, cocoon weight of female (2.36g) was increased marginally, when compared to control (2.34g in female and 2.00g in male). For the average cocoon weight a similar result was observed (Table I).

During summer season, when Jinlu was treated in third and fourth instar, cocoon weight of both female and male larvae was reduced and when Jinlu treated on fifth instar larvae, cocoon weight was marginally increased, compared to control and it is presented in Table II.

6. Single cocoon shell weight:

In single cocoon shell weight, similar trend was noticed for the single cocoon weight. Single shell weight was reduced considerably in both female and male larvae and average of female and male, when Jinlu was treated in third and fourth instar, whereas in the batches treated with Jinlu in the fifth instar marginal improvement was observed in single shell weight in both the sexes and also in average, when compared to control in both the seasons. The data was presented in Table I and II.

7. Shell ratio percentage:

The shell ratio % recorded in the experimental batches fed with Jinlu treated mulberry leaves in the fourth instar was found to be reduced in both the sexes (14.48% in female and 16.79% in males) compared to control (22.73% in females and 26.35% in males). On the other hand, shell ratio % was found to be increased marginally in the batches when Jinlu treated in fifth instar (22.83% in females, 26.75% in male), compared to control. In average shell ratio % also similar trend was observed in spring crop (Table I).

In summer crop, when Jinlu is given to third and fifth instars, shell ratio % in female, male larvae and average of female and male shell ratio was reduced and it was 20.16%, 23.20%, 21.43% in third instar treated batch and 12.98%, 15.62% and 14.13% in fourth instar treated batch with Jinlu for female, male and mean of female and male respectively. On the other hand, when Jinlu treated in fifth instar during 72-96 hrs and 96-120hrs, shell ratio % for female, male and mean of female and male was shown marginal improvement (Table II).

8. Filament length:

During spring crop, when Jinlu treated in the fourth instar, filament length was reduced (843m), whereas in Jinlu treated in fifth instar, filament length was marginally improved (1170m), compared to control (1154m) (Table III).

When administration of Jinlu was conducted in summer rearing season, the silk filament showed the same trend with spring crop (Table IV).

9. Non breakable filament length:

In both spring and summer rearing seasons, when Jinlu treated in fourth instar, non breakable filament length was reduced, whereas in the batches Jinlu treated in fifth instar, non breakable filament length was marginally improved (Table III & IV).

Table III. Effect of AJH (Jinlu) on silk quality(Race: Qing Song × Hao Yue)

Tableau III. Effet de l'AJH (Jinlu) sur la qualité de la soie (Race : Qing Song × Hao Yue).

Parameters	Time of Jinlu application		
	4 th instar	5 th instar	Control
Paramètres	Période d'application de Jinlu		
	4 ^{ème} âge (0-48 h)	5 ^{ème} âge (72-96 h)	Témoin
Filament length (m) / Longueur du filament (m)	843	1170	1154
Non breakable filament length (m) Longueur du filament sans rupture (m)	697	873	828
Filament thickness (d) / Titre du filament (d)	1.10	2.91	2.88
Reelability(%) / Dévidabilité (%)	82.72	76.50	72.37
Size deviation / Variation du titre	0.04	0.10	0.09

Table IV. Effect of AJH (Jinlu) on silk quality (Race:Xin Hang × Bai Yun)

Tableau IV. Effet de l'AJH (Jinlu) sur la qualité de la soie (Race : Xin Hang × Bai Yun)

Parameters	Time of Jinlu application				
	3 rd instar	4 th instar	5 th instar	5 th instar	Control
Paramètres	Période d'application de Jinlu				
	3 ^{ème} âge (0-48h) (0-48h)	4 ^{ème} âge (0-48h)	5 ^{ème} âge (72-96 h)	5 ^{ème} âge (96-120 h)	Témoin
Filament length (m) Longueur du filament (m)	844	722	915	888	870
Non breakable filament length (m) Longueur du filament sans rupture (m)	844	656	787	738	721
Filament thickness (d) Titre du filament (d)	1.69	1.21	2.76	2.97	2.73
Reelability(%) / Dévidabilité (%)	100.00	90.86	86.01	80.23	68.47
Size deviation / Variation du titre	0.11	0.08	0.32	0.16	0.18

10. Filament thickness:

In spring crop, when Jinlu treated in fourth instar, silk filament was very thin and it was 1.10d, but when Jinlu treated in fifth instar, filament size was thicker when compared to control (2.88d) (Table III).

In summer crop, when larvae treated with Jinlu in third, fourth and fifth instar, greater variation was observed in filament size, it was in the order of 1.12d, 1.69d, 2.97d, and 2.76d for the batches treated with Jinlu during third, fourth and 2-96 and 96-120hrs of fifth respectively, compared to control (2.73d) (Table IV).

11. Size deviation:

In spring crop, when Jinlu treated in fourth instar, minimum size deviation was recorded (0.04), whereas in the batch treated with Jinlu in fifth instar it was 0.10 and in control it was 0.09 (Table III).

In summer crop, maximum size deviation was recorded when Jinlu treated during 72-96hrs of fifth instar and minimum (0.08) was recorded in the batches treated with Jinlu in fourth instar. But in control (0.18), the value was in between (Table IV)

DISCUSSION

The growth of silkworms, especially those at the larval stage, is controlled by the endocrine system, which is mainly ecdysone and juvenile hormone.

Ordinary silkworms are tetramoulters and make cocoons in their fifth instar. By administering the AJH, which induces tetramoulters into trimoulters, such silkworms make their cocoons in their fourth instar, therefore, trimoulters are smaller than that of tetramoulters. The size of the filament produced by trimoulters is far smaller than that of the filament made by tetramoulters. By giving AJH to silkworms in different instars, many researchers succeeded in changing the number of larval moults and in changing greatly the length of the larval period, cocoon size and size of cocoon filament (Akai *et al.*, 1984, 1986, and Lu Xuefang and Li Rongqi, 1987). Because of reduction in larval period and better leaf-silk conversion efficiency in induced trimoulters, amount of leaf required for one case of silkworm eggs of common tetramoulters could rear 1.5 or 2.5 cases of trimoulters with same cocoon yield per unit amount of mulberry leaves with superfine silk filament. Hence, the application of AJH in the third and fourth instar is the most promising and practical technique (Akai, 1988). In this report, we administered Jinlu (an anti-JH) in the later part of the fifth instar, without changing the moltinism, the duration of the fifth instar was slightly prolonged and the cocoon weight was increased.

It is evident from the present study, that administering Jinlu on spring and summer races were found to have significant effects on most of the economic characters studied. Eventhough, some of the economic traits such as cocoon weight, shell weight, shell ratio % have reduced, other economic characters has increased considerably.

In this study, a marginal improvement was observed in the batches treated with Jinlu in the fifth instar of both the seasons (table III and IV). The improvement observed is attributed to the increase of DNA and RNA content in the posterior silk gland. The attributed reason is parallel with the findings of Dai Zhuying *et al.*, 1987, who reported the improvement of nucleic acid contents in the posterior silk gland after treating with AJH(SM-1) in the fifth instar.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Prof. Lu Xuefang and Prof. Xu Junliang, The University of Zhejiang University for their kind supervision. The author also thanks Dr. Sateesh Kumar, Central Sericultural Research and Training Institute, India for his critical reading and improvement of the manuscript.

REFERENCES

- AKAI, H., KIMURA, K., KIUCHI, M. & SHIBUKAWA, A., Effects of anti-juvenoid treatment on Cocoon and cocoon filaments in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 1984, 53 (6):545-546.
- AKAI, H., KIUCHI, M. & KIMURA, K., Effects of anti-JH treatment on the Size and fine structure of the cocoon filament of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 1986, 55 (5):388-396.
- AKAI H., Hormone regulation of larval development and its utilization in silk production by *Bombyx* silkworm. JARQ, 1988, 22(2):128-134
- AKAI H., Suppressive effects of an imidazole derivative KK-42 on JH levels in haemolymph of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 1989, 58(1):73-74.
- BOWERS W. S., OHTA, T., CLEERE, J. S. & MARSELLA, P. A., Discovery of Insect Anti-juvenile Hormone in Plants. Science, 1976, 193 (4253): 542-547.
- DAI ZHUYING & LU XUEFANG, Effect of trimoulting silkworm inducer SM-1 on the regulation mechanisms of the silk fibroin synthesis of silkworm. Sci. Seric., 1987, 13(3):143-149
- KIGUCHI, K., MORI, T. & AKAI, H., Effects of anti-juvenile hormone ETB on the development and metamorphosis of the silkworm *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 1984, 30(6):499-506
- KIUCHI, M., KIMURA, K. & AKAI, H., Induction of trimolters from a tetramolter strain of *Bombyx mori* by anti-juvenoid treatment. J. Seric. Sci. Jpn., 1985, 54 (1):77-81.
- LU XUEFANG, LI RONGQI. Study on the trimolter induction of SM-1 to produce superior silk filament. J. of sericultural Science, 1987, 13(2),71-75
- MIAO YUNGEN, YU SHENGWEN REN XIAOMI. Mechanism of anti-JH and molting hormone to silkworm *Bombyx mori*. J. of Zhejiang Agricultural University, 1996, 22(4), 345-348
- STAAL G. B. Antijuvenile Hormone Agents. Ann. Rev. Entomol., 1986, 31:391-429

EFFETS DE JINLU, UNE ANTI-HORMONE JUVENILE SUR LA PRODUCTION DE COCONS CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUNGEN

Department of Sericulture & Apiculture, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Chine.

L'étude montre que la durée totale du stade larvaire baisse considérablement chez les lots traités avec du Jinlu (une anti-hormone juvénile) pendant le 3^{ème} ou le 4^{ème} âge à la fois pendant les récoltes de printemps et d'été. Les autres paramètres comme le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament diminuent chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 3^{ème} ou le 4^{ème} âge. D'autre part, le pourcentage de dévidabilité augmente avec une régularité du titre plus élevée et un filament de soie plus fin. Chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge, on observe une amélioration marginale du poids de la coque, de la richesse soyeuse et de la longueur du filament.

INTRODUCTION

La croissance, le développement et la métamorphose du ver à soie sont contrôlés par les hormones, comme chez d'autres animaux.

On a trouvé que les organes endocriniens de l'insecte, tels que le cerveau, le ganglion suboesophagien (SG), les *corpora cardiaca* (CC), les *corpora allata* (CA) et la glande prothoracique (PG) jouent un rôle important dans le développement et la régulation du cycle de vie. Dans les années 1970, la substance qui agit contre les hormones juvéniles a été extraite de plantes et dénommée "anti-hormone juvénile (Anti-JH)" (Bowers W. S. et coll., 1976). Jusqu'à présent on a séparé et synthétisé plus de 20 types de composants anti-JH, dont la plupart sont des dérivés d'imidazole (Staal G. B., 1986). Une recherche de pionnier intensive a montré que l'anti-hormone juvénile a des effets physiologiques différents quand elle est administrée à différents stades du développement de l'insecte (Kiguchi K. et coll., 1984 ; 1985 ; Lu Xuefang, Li Rongqi, 1987). A présent des dérivés d'imidazole tels que le KK-42, KK-84, SSP-11, SM-1 sont appliqués de manière pratique pour induire des trimuants et donner une soie extrêmement fine (Akai H. et coll., 1984, 1986, 1989, ; Lu Xuefang, Li Rongqi, 1987).

Dans cette étude, nous nous sommes penchés sur les effets de Jinlu, une anti-hormone juvénile, sur la croissance du ver à soie, la production de cocons et la qualité de la soie de *Bombyx mori* L.

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux expérimentaux :

Le ver à soie hybride bivoltin Qing Song × Hao Yue sert de matériel d'étude pour la récolte de printemps et Xin Hang × Bai Yun sert de matériel d'étude pendant l'été. La variété de mûrier Hu Sang 197 dont les feuilles sont récoltées dans une mûraie irriguée est utilisée comme nourriture pour les vers à soie pendant les deux saisons.

Les vers à soie sont élevés en masse en suivant les pratiques standards jusqu'au quatrième âge. Après la quatrième mue, les larves sont séparées en trois groupes. Chaque groupe est constitué de trois répétitions de 100 larves pour chaque traitement.

2. Administration de l'anti-hormone :

Un gramme de Jinlu (anti-JH) est dissout dans de l'eau pour faire une solution de 250 mg/l. Pour le premier groupe, une solution de 250mg/l est vaporisée sur les feuilles de mûrier, qui sont données en nourriture au taux de 4 µg/ larve pendant les 48 premières heures du quatrième âge. Pour le deuxième groupe, la solution de Jinlu est vaporisée sur les feuilles de mûrier qui sont données en nourriture aux vers à soie 72h à 96 h après le début du cinquième âge. Le troisième groupe est gardé comme témoin sans traitement.

3. Etude :

Les larves matures sont montées sur des encabanages pliants en plastique. Les cocons sont récoltés le sixième jour après la montée et l'on vérifie le nombre de chrysalides mortes et vivantes en secouant doucement les cocons. Le pourcentage de chrysalides mortes est calculé sur la base des cocons récoltés. La durée larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse sont enregistrés en fonction du sexe. Les cocons défectueux sont retirés de chacune des répétitions, puis les cocons de taille, de forme et de dureté uniformes sont sélectionnés au hasard pour analyser le dévidage du cocon et les paramètres de dévidage tels que la longueur du filament, la longueur du filament sans rupture, le titre, la dévidabilité et la régularité du titre.

RESULTATS

1. Durée larvaire :

Les paramètres d'élevage et de dévidage des deux races bivoltines obtenus pendant les récoltes du printemps et de l'été sur la base de paramètres tels que la durée larvaire, le taux d'induction de trimuants, le poids larvaire, le pourcentage de chrysalides mortes, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et les paramètres de dévidage tels que la longueur du filament, la longueur du filament sans rupture, le titre du filament, la dévidabilité et la régularité du titre des lots expérimentaux et témoins sont présentés. Les données moyennes obtenues pour les répétitions pour chacune des saisons sont présentées séparément. La variabilité observée pour les paramètres d'élevage et de dévidage chez les lots expérimentaux par rapport aux paramètres étudiés est comparée avec le témoin et est présentée dans les Tableaux I à IV.

Pendant la saison du printemps, quand les vers à soie de la race Qing Song × Hao Yue sont traités avec du Jinlu pendant les 48 premières heures du 4^{ème} âge, la durée larvaire du 4^{ème} âge atteint jusqu'à 192 heures et à la fin tous les vers ont filé des cocons, tandis que chez le lot témoin, le quatrième âge ne dure que 96 heures, mais la durée larvaire totale baisse chez les larves traitées avec du Jinlu pendant le quatrième âge et ne dure que 444 heures, tandis que chez le témoin, elle dure 558 heures. Chez le lot traité avec du Jinlu 72 à 96 h après le début du 5^{ème} âge, la durée larvaire totale est similaire à celle du témoin (558 heures) (Tableau I).

Pendant la récolte d'été, la durée larvaire totale varie considérablement avec un traitement au Jinlu pendant les 48 premières heures du 3^{ème} âge et du 4^{ème} âge et 72 à 96 et 96 à 120 heures après le début du 5^{ème} âge. elle est respectivement de 415, 391, 496 et 496 heures et chez le témoin de 492 heures. Pendant cette récolte, la durée larvaire de l'âge traité avec du Jinlu est prolongée par rapport à celle du témoin (Tableau II).

2. Taux d'induction de trimuants :

Quand on administre du Jinlu aux vers à soie pendant le quatrième âge au cours de la récolte de printemps tous les vers (100 %) deviennent trimuants tandis que pendant la récolte d'été, lorsqu'on

administre du Jinlu pendant le 3^{ème} et 4^{ème} âge, le taux d'induction de trimuants est respectivement de 89,50 % et de 94,25 % (Tableau I).

3. Poids larvaire :

Le poids moyen de dix larves adultes au 5^{ème} âge, relevé un jour avant le filage est présenté dans le Tableau I. Quand on traite les larves avec du Jinlu pendant le 4^{ème} ou le 5^{ème} âge au printemps, le poids larvaire est respectivement de 20,73 g et de 48,50 g et chez le témoin il est de 48,30 g (Tableau I).

Pendant la récolte d'été le poids larvaire est respectivement de 24,77 g, 16,20 g, 47,69 g, 45,72 g chez les lots traités avec du Jinlu pendant les 48 premières heures du troisième et quatrième âge, 72 à 96 h et 96 à 120 h après le début du 5^{ème} âge et chez le témoin il est de 44,52 g (Tableau II).

4. Pourcentage de chrysalides mortes :

Pendant la récolte du printemps, chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 4^{ème} ou le 5^{ème} âge, le pourcentage de chrysalides mortes est inférieur, et il est respectivement de 0,66 % et de 1 %, par rapport au témoin (2 %) (Tableau I). Pendant la récolte d'été, on fait une observation similaire chez les lots traités avec du Jinlu, les données sont présentées dans le Tableau II.

5. Poids d'un cocon :

Pendant la récolte de printemps, quand on administre du Jinlu pendant le quatrième âge, les poids des cocons des larves femelles et mâles baissent considérablement et ils sont respectivement de 0,96 g, 0,78 g, tandis que chez le lot traité avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge, le poids du cocon femelle (2,36 g) augmente de manière marginale par rapport au témoin (2,34 g pour la femelle et 2 g pour le mâle). Pour le poids moyen du cocon, un résultat similaire est observé (Tableau I).

Pendant la saison d'été, quand Jinlu est donné pendant le 3^{ème} et 4^{ème} âge, le poids du cocon des larves femelles et mâles baisse et quand Jinlu est donné aux larves du 5^{ème} âge, le poids du cocon augmente de manière marginale par rapport au témoin. Ceci est présenté dans le Tableau II.

6. Poids d'une coque :

Pour le poids d'une coque, on observe une tendance similaire à celle obtenue pour le poids du cocon. Le poids de la coque diminue considérablement à la fois chez les larves femelles et mâles et pour la moyenne femelle-mâle, quand Jinlu est administré pendant le 3^{ème} et 4^{ème} âge, tandis que chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge on observe une amélioration marginale pour le poids de la coque chez les deux sexes et aussi pour la moyenne, par comparaison au témoin pendant les deux saisons. Les données sont présentées dans les Tableaux I et II.

7. Richesse soyeuse :

La richesse soyeuse enregistrée chez les lots expérimentaux nourris avec des feuilles de mûrier traitées avec du Jinlu pendant le 4^{ème} âge baisse chez les deux sexes (14,48 % pour les femelles et 16,79 % pour les mâles) comparée à celle du témoin (22,73 % pour les femelles et 26,35 pour les mâles). D'autre part, la richesse soyeuse augmente de manière marginale chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge (22,83 % chez les femelles, 26,75 % chez les mâles), par comparaison au témoin. Pour la richesse soyeuse moyenne, on observe une tendance similaire pendant la récolte du printemps (Tableau I).

Pendant la récolte d'été, quand Jinlu est administré pendant les 3^{ème} et 5^{ème} âges, la richesse soyeuse des larves femelles et mâles et la moyenne des richesses soyeuses femelle-mâle diminue et elle est respectivement de 20,16 %, 23,20 %, 21,43 % pour le lot traité pendant le 3^{ème} âge et de 12,98 %, 15,62 % et 14,13 % pour le lot traité avec du Jinlu pendant le 4^{ème} âge chez la femelle, le mâle et la moyenne femelle-mâle. D'autre part, quand on donne du Jinlu 72 à 96 h et 96 à 120 heures après le début du 5^{ème} âge, on remarque une amélioration marginale de la richesse soyeuse des femelles, des mâles et de la moyenne femelles-mâles (Tableau II).

8. Longueur du filament :

Pendant la récolte du printemps, quand on administre du Jinlu pendant le 4^{ème} âge, la longueur du filament diminue (843 m), tandis que quand Jinlu est administré pendant le 5^{ème} âge, la longueur du filament s'améliore de manière marginale (1170 m), comparée à celle du témoin (1154 m) (Tableau III).

Quand on administre du Jinlu pendant l'élevage d'été, la longueur du filament de soie montre la même tendance que pendant la récolte de printemps (Tableau IV).

9. Longueur du filament sans rupture :

Pendant les deux saisons d'élevage du printemps et de l'été, quand on administre du Jinlu pendant le 4^{ème} âge, la longueur du filament sans rupture diminue, tandis que chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge, la longueur du filament sans rupture augmente de manière marginale (Tableaux III & IV).

10. Titre du filament :

Pendant la récolte du printemps, quand on administre du Jinlu pendant le 4^{ème} âge, le filament de soie est très fin et il est de 1,10d, mais quand on administre du Jinlu pendant le 5^{ème} âge, le titre du filament est plus épais par comparaison au témoin (2,88 d) (Tableau III).

Pendant la récolte d'été, quand les larves sont traitées avec du Jinlu pendant le 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} âge, on observe une plus grande variation du titre du filament. Il est de l'ordre de 1,12 d, 1,69d, 2,97d et de 2,76d chez les lots traités avec du Jinlu respectivement pendant les 3^{ème} et 4^{ème} âges et 2 à 96 et 96 à 120 heures après le début du cinquième âge comparé au témoin (2,73 d) (Tableau IV).

11. Régularité du titre :

Pendant la récolte du printemps, quand on administre du Jinlu pendant le 4^{ème} âge, on enregistre une régularité maximale du titre (0,04) tandis que chez le lot traité avec du Jinlu pendant le 5^{ème} âge elle est de 0,10 et chez le témoin elle est de 0,09 (Tableau III).

Pendant la récolte d'été, une régularité du titre minimale est enregistrée quand Jinlu est administré 72 à 96 h après le début du 5^{ème} âge et elle est maximale (0,08) chez les lots traités avec du Jinlu pendant le 4^{ème} âge. Chez le témoin (0,18), la valeur est entre les deux (Tableau IV).

DISCUSSION

La croissance des vers à soie, surtout au stade larvaire est contrôlée par le système endocrinien, qui comprend principalement l'ecdysone et l'hormone juvénile.

Les vers à soie ordinaires sont des tétramants et font des cocons au 5^{ème} âge. En administrant de l'AJH, qui rend les tétramants trimants, ces vers à soie font leurs cocons au 4^{ème} âge, ceux des trimants sont donc plus petits que ceux des tétramants. Le titre de la bave produit par les trimants est beaucoup plus fin que le filament sécrété par les tétramants. De nombreux chercheurs ont réussi à changer le nombre de mues larvaires et à considérablement changer la longueur de la durée larvaire, la taille du cocon et le titre du filament du cocon (Akai et coll., 1984, 1986 et Lu Xuefang et Li Rongqi, 1987) en donnant de l'AJH aux vers à soie à différents âges. Grâce à la diminution de la durée larvaire et à la meilleure efficacité de conversion feuille-soie chez les trimants induits, la quantité de feuilles requise pour des œufs de vers à soie de tétramants ordinaires permettrait d'élever 1,5 ou 2,5 fois plus de trimants avec le même rendement en cocons par quantité unitaire de feuilles de mûrier avec un filament de soie extrêmement fin. L'application d'AJH pendant les 3^{ème} et 4^{ème} âges est donc une technique très prometteuse qui peut être appliquée pratiquement (Akai, 1988). Dans cette étude, nous avons administré du Jinlu (une anti-hormone juvénile) pendant la dernière partie du 5^{ème} âge, sans

changer le nombre de mues, la durée du 5^{ème} âge a légèrement augmenté et le poids du cocon a augmenté.

Il est évident d'après cette étude, que l'administration de Jinlu à des races de printemps et d'été a des effets significatifs sur la plupart des caractères économiques étudiés. Bien que certains des traits économiques tels que le poids du cocon, de la coque, la richesse soyeuse aient diminué, d'autres caractères économiques ont considérablement augmenté.

Dans cette étude, nous avons observé une amélioration marginale chez les lots traités avec du Jinlu au 5^{ème} âge pendant les deux saisons (Tableau III et IV). L'amélioration observée est attribuée à l'augmentation de la teneur en ADN et en ARN dans la glande séricigène postérieure. Ceci confirme les observations de Dai Zhuying et coll., 1987, qui ont observé une amélioration des teneurs en acide nucléique dans la glande séricigène postérieure après le traitement avec de l'AJH (SM-1) au 5^{ème} âge.

USE OF HP-SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY TO STUDY THE DEGREE OF POLYMERIZATION OF SILK (*B. MORI*) FIBROIN FIBRES

G. FREDDI^{1*}, A. BERLIN¹, M. TSUKADA² & E. DUBINI PAGLIA³

1. Stazione Sperimentale per la Seta, via Giuseppe Colombo, 83, 20133, Milano, Italy.
2. National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba City, Ibaraki 305-8634, Japan.
3. Dipartimento di Chimica Fisica ed Elettrochimica, Università degli Studi di Milano, via Golgi 19, 20133 Milano, Italy.

The present study deals with the chromatographic determination of molecular weight and degree of polymerization of *Bombyx mori* silk fibroin by HP-Size Exclusion Chromatography (HP-SEC). The column was calibrated with three series of water-soluble molecular weight standards: proteins, pullulans, and polyethylene oxides. The effect of a denaturing mobile phase, containing 5M urea, on the elution behaviour of the standard polymers was investigated. The calibration curve of proteins was significantly affected by the presence of the chaotrope, while those of the two other polymers remained unchanged. Silk fibroin samples with different degree of polymerization were dissolved with saturated aqueous LiSCN and analysed by HP-SEC after dialysis against the mobile phase. The chromatographic profiles allowed the following parameters to be calculated for each sample: $\overline{M}_w$ (weight-average molecular weight), $\overline{M}_n$ (number-average molecular weight), $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ (polydispersity index), MWD (molecular weight distribution). The intrinsic viscosity $[\eta]$ of the samples was measured according to the SNV 195 595 standard method and a relation between the values of $[\eta]$ and $\overline{M}_w$ was established. The advantages of using the HP-SEC method for the determination of the degree of polymerization of silk fibroin fibres are discussed.

Keywords: Silk Fibroin (*B. mori*), Degree of Polymerization, HP-Size Exclusion Chromatography, Molecular Weight, Intrinsic Viscosity

INTRODUCTION

Silk processing consists of a series of working steps starting with cocoon drying, cooking, and reeling, leading to production of raw silk yarns and fabrics which afterwards can be degummed, bleached, dyed or printed, and finished. A detailed discussion of silk processing is out of the scope of this paper. Comprehensive reviews and books dealing with this subject have been published (Carboni, 1952; Gallese, 1961; Gulrajani, 1993; Zahn, 1993). From the beginning to the end of the processing chain silk undergoes a series of physical and chemical treatments which inevitably bring about modification of the intrinsic fibre structure and properties. In fact, silk can be exposed to dry or wet environments, at temperatures, pHs, and for times variable as a function of the individual process to be performed, in the presence of various kinds of chemicals. Moreover, these treatment conditions are often accompanied by physico-mechanical stresses. Besides processing, storage

* To whom correspondence should be addressed.

conditions may affect silk properties as well, depending on duration, temperature, humidity, exposure to light, etc. (Becker and Tuross, 1994).

As a protein fibre, silk possesses target groups potentially sensitive to the attack of various chemical agents (Otterburn, 1994). The primary effect usually consists in breaking covalent bonds (peptide and disulphide bonds), as well as other weak interactions (hydrogen bonds, electrostatic and hydrophobic interactions, van der Waals forces, etc.). Cross-linking between reactive groups of adjacent side chain amino acid residues can be induced as well, although this event might be considered marginal in the context of conventional processing conditions. The outcome of all these events is a more or less extensive degradation of fibroin macromolecules.

Changes in the chemical structure of silk, *i.e.* rupture of bonds leading to decrease of the degree of polymerization, are known to entail significant effects on fibre performance, such as loss of tensile properties, changes in dye uptake, higher sensitivity to surface rubbing and yellowing, poor handle, draping, luster, etc. (Centola *et al.*, 1959). The quality of silk goods therefore depends on one side on the possibility of limiting as much as possible the negative consequences that some treatments inevitably imply, and on the other on a systematic control of both processing conditions and material quality. The latter aspect has long been considered and various analytical methods have been proposed for the quality control of silk (Rochas and Pierret, 1958; Knott *et al.*, 1983). The determination of intrinsic viscosity (SNV 195 595 test method) is specifically designed to evaluate the degree of polymerization of silk, and is one of the most useful tests performed in the textile laboratory for both scientific and technological purposes.

The well established viscosity measurements suffer from some limitations. One is related to the amount of silk needed for a single measurement (from 50 to 250mg), which does not represent a real limitation when industrial samples are tested, but might become a limiting factor when only small samples resulting from lab-scale treatments or coming from ancient textiles of great artistic and historical interest are available. Additionally, although the value of intrinsic viscosity unambiguously characterizes a sample, it does not give any information on the molecular weight and molecular weight distribution of silk fibroin, two parameters extremely useful for studying the kinetics and mechanism of degradation processes.

The present study was therefore undertaken with the aim of setting up a chromatographic method for the determination of the degree of polymerization of silk. The results reported deal with the development of a method based on the HP-Size Exclusion chromatography technique (HP-SEC). The discussion will cover various aspects, from column standardization procedure, to analysis of silk fibroin with variable degree of polymerization and molecular weight calculation. Correlation between intrinsic viscosity and molecular weight of silk fibroin will be discussed as well.

MATERIALS AND METHODS

The following silk fibroin samples were used in this study: *BmF-1* (reference sample; raw twill fabric, degummed with boiling 0.7% aqueous Marseille soap for 30+30min, thoroughly rinsed with deionized water, dried at room temperature and then Soxhlet extracted with diethyl ether to remove residual fatty matters); *BmF-2* (degummed twill fabric, degraded by prolonged alkaline degumming); *BmF-3* (degummed twill fabric, aged in the lab by prolonged exposure to day light radiation); *BmF-4* (degummed twill fabric, degraded by prolonged acidic treatment); *BmF-5* (silk yarn, from a fabric manufactured at the end of the 19th century); *BmF-6* (silk yarn, from a fabric manufactured during the 15th century).

Intrinsic viscosity ($[\eta]$) of silk was measured according to the standard procedure of the SNV 195 595 (1968) test method.

For chromatographic analyses, silk fibroin (1-5mg) was dissolved with a small volume of 50% (w/v) aqueous LiSCN, at room temperature, for 30min. After dilution with 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.15M KCl, 5M urea, the solution was extensively dialyzed against the same buffer

for 48hr, with cellulose membrane tubing (Spectra/Por 6, Spectrum, $MWCO = 3.5$ kDa). At the end of dialysis, the solution was diluted until a silk fibroin concentration of 1mg/ml, filtrated with 0.2µm porous filters and immediately analyzed by size exclusion chromatography.

The Waters chromatographic system was composed of a pump (mod. 510), a manual injector (mod. U6K), and a refractive index detector (mod. 410) equipped with a temperature control module. The system was controlled by the chromatographic software Maxima 820 (Waters), including GPC data handling software. Column temperature was set at 30°C. The column used was a Shodex Protein KW-804 (Waters, 8x300mm), packed with porous spherical silica gel covered with hydrophilic hydroxy groups (pre-column Shodex Protein KW-G, 6x50mm). Column efficiency was measured on the basis of the half-width peak of ethylene glycol ($N = 15000$). Injection volume of standard and unknown samples varied in the range 50-100µl. Flow rate was 0.5ml/min. Bidistilled water, 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.15M KCl, with and without 5M urea, were used as mobile phases.

The molecular weight standards used were as follows: proteins (HMW and LMW Gel Filtration Calibration Kits, Pharmacia Biotech, containing: blue dextran 2000, 2000 kDa; thyroglobulin, 669 kDa; ferritin, 440 kDa; catalase, 232 kDa; aldolase, 158 kDa; bovine serum albumin, 67 kDa; ovalbumin, 43 kDa; chymotrypsinogen A, 25 kDa; ribonuclease A, 13.7 kDa); pullulans (Shodex Standard P-82, Showa Denko, linear macromolecular polysaccharides of maltotriose sorted by molecular weight into 8 grades ranging from 788 kDa to 5.9 kDa, with narrow molecular weight distribution: $1.23 > \overline{M}_w / \overline{M}_n > 1.06$); polyethylene oxides (TSK Standard, Tosoh, composed of 8 linear polymers with a molecular weight ranging from 913 kDa to 7.1 kDa, with narrow molecular weight distribution: $1.20 > \overline{M}_w / \overline{M}_n > 1.04$). Standard solutions were prepared according to manufacturer suggestions.

Definition of HP-SEC molecular weight averages and molecular weight distribution (Yau *et al.*, 1979):

- number-average molecular weight: $\overline{M}_n = \sum n_i M_i / \sum n_i = \sum w_i / \sum (w_i / M_i)$
- weight-average molecular weight: $\overline{M}_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i = \sum w_i M_i / \sum w_i$

where n_i and w_i are the number and weight of molecules of molar mass M_i , respectively, and i is an incrementing index of the molecular weights present. $\overline{M}_n$ and $\overline{M}_w$ provide a measure of the average chain length and weight, respectively, in a polymer sample. The value of $\overline{M}_w$ is always larger than $\overline{M}_n$ ($\overline{M}_w = \overline{M}_n$ for monodisperse polymer species). Both parameters are correlated with a number of physical properties of synthetic polymers (strength toughness, fluidity, density, etc.).

The ratio $\overline{M}_w / \overline{M}_n$, called polydispersity index, expresses the breadth of the molecular weight distribution ($\overline{M}_w / \overline{M}_n = 1$ for monodisperse polymer species).

The molecular weight distribution (MWD) indicates how broad is the size distribution of the molecules in a sample. It can be represented graphically in integral form as the cumulative weight fraction versus molecular weight. MWD is an intrinsic polymer property, and MWD curves allow comparison and quantitative treatment of HP-SEC data obtained from different instruments.

RESULTS AND DISCUSSION

HP-SEC Calibration

Size exclusion chromatography is a liquid chromatographic technique which sorts molecules according to their size (Yau *et al.*, 1979). The first step in HP-SEC is to build a calibration curve relating the retention volume (V_R) to the molecular weight of the polymer sample. In principle, molecular weight standards should have the same chemical structure and conformation of the unknown sample. Accordingly, a series of globular proteins with molecular weights covering the fractionation range of the column was chosen. Considering that silk fibroin is a fibrous, not a globular

protein, and that in aqueous solution it preferably takes a random coil conformation (Asakura, 1986), two additional series of water-soluble random coil polymers were used as calibration standards, *i.e.* pullulans (natural linear polysaccharides produced by *Aureobasidium pullulans*), and polyethylene oxides.

As it is well known, the aqueous silk fibroin solution is rather unstable. The addition of variable amounts of chaotropes (such as urea) is needed to ensure enough stability to the solution for chromatographic analysis (Freddi and Allara, 1997). The effect of denaturing sample buffer and mobile phase on elution behaviour of the standard polymers was investigated first. Figure 1 shows the results obtained for proteins. The curves of V_R vs. $\log MW$ diverge significantly, especially in the medium-to-high molecular weight range. In the presence of 5M urea, proteins displayed lower retention times, indicating a lower extent of permeation inside the pores of the column packing. This result must be primarily attributed to the destabilizing effect of the chaotrope, which broke the water structure around the proteins, leading to disordering of the native structure by chain unfolding. As a consequence, the solution volume of proteins increased, resulting in shorter retention volumes. The same test was performed with pullulans (Figure 2). No appreciable effects attributable to the presence of urea were observed, the data points fitting the same regression curve. A similar trend was displayed by polyethylene oxide standards (data not shown), confirming the negligible effect of the chaotrope on the degree of coil and solution conformation of the two polymers.

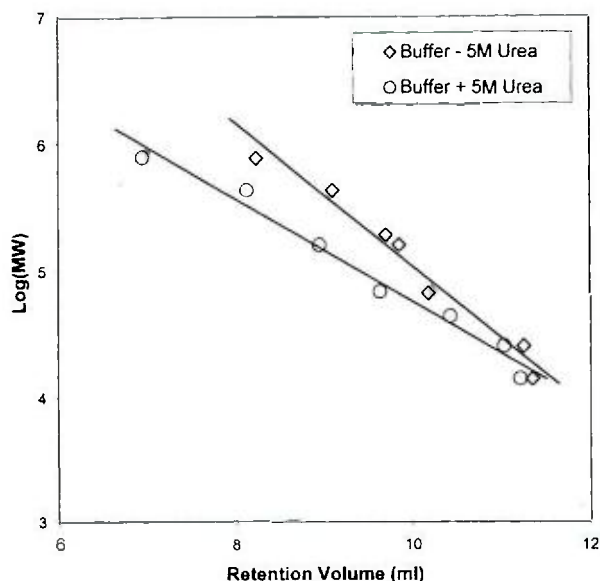


Fig. 1: HP-SEC calibration curves of molecular weight standard proteins eluted in native and denatured conditions.

Fig. 1. Courbes d'étalonnage HP-SEC du poids moléculaire de protéines standards éluées dans des conditions natives et dénaturées.

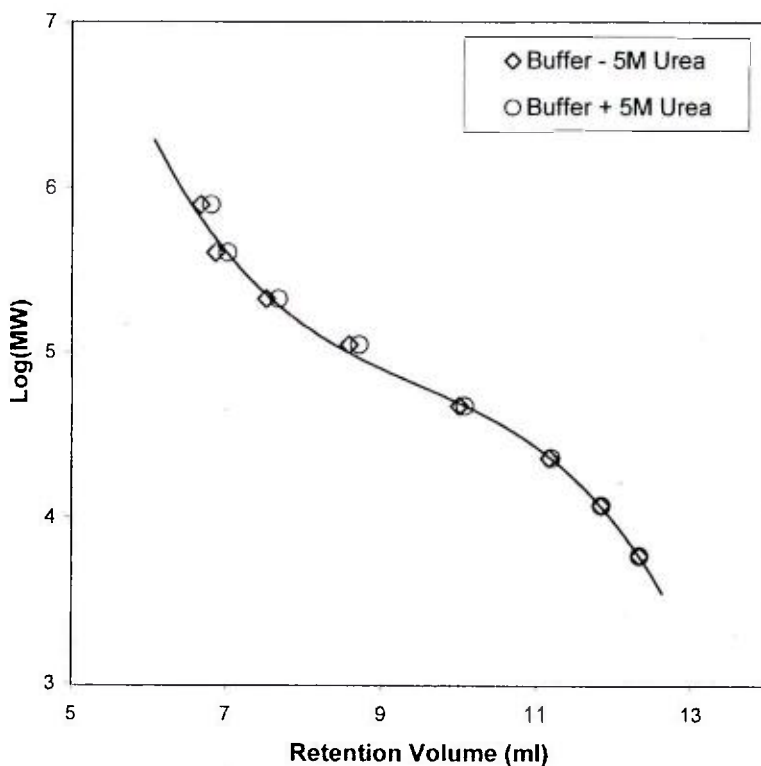


Fig. 2: HP-SEC calibration curves of molecular weight standard pullulans eluted in the absence and presence of 5M urea.

Fig. 2. Courbes d'étalonnage HP-SEC du poids moléculaire de pullulans standards élués en l'absence et en présence d'urée 5M.

Figure 3 shows the calibration curves obtained with proteins, pullulans and polyethylene oxides eluted in the same chromatographic conditions, using a 5M urea buffer as the mobile phase. The best fit of the data points was obtained with third order polynomial curves. The curves overlap in the vicinity of V_0 , tending to diverge in the medium-to-low molecular weight range. In this range, the elution volume of standard polymers with the same nominal molecular weight was in the following order: proteins > pullulans > polyethylene oxides. This behaviour is attributable to their different chemical structure and solution conformation. The occurrence of specific polymer-solvent interactions determines the shape and size of polymers in solution (hydrodynamic volume), which is primarily responsible for their permeation behaviour inside the pores of the stationary phase (Yau *et al.*, 1979). These effects account for the different slope of the molecular weight calibration curves.

HP-SEC of Silk Fibroin :

HP-SEC elution profiles of various silk fibroin samples are shown in Figure 4. Referring to the chromatogram marked *BmF-1*, which indicates the reference silk fibroin sample in this study, it is possible to observe that the peak covers the entire fractionation range of the column, as defined by the exclusion (V_0) and total permeation (V_t) volumes. The peak maximum falls in the medium-to-high molecular weight range. The shoulder appearing in the low molecular weight range (see arrow in Fig. 4) is attributable to the light subunit of silk fibroin (L-chain), which has been separated from the heavy one (H-chain) as a consequence of breaking of the disulphide bridge during alkaline degumming (unpublished results).

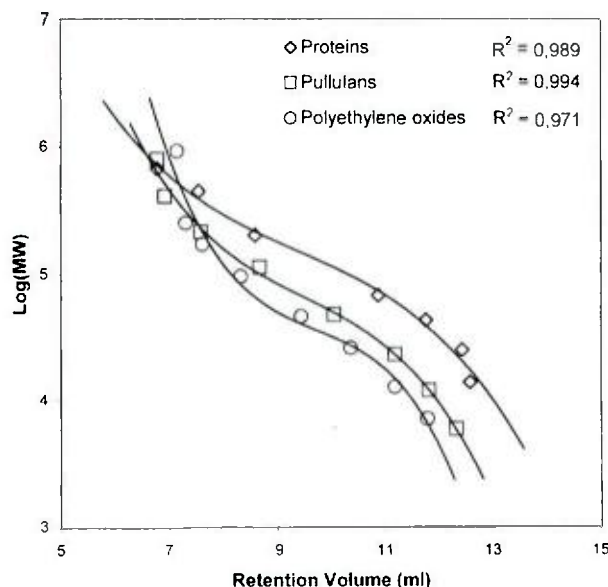


Fig. 3: HP-SEC calibration curves of molecular weight standard proteins, pullulans, and polyethylene oxides. Mobile phase: 50mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.15M KCl, 5M urea. Flow rate: 0.5ml/min. Detector: RI.

Fig. 3. Courbes d'étalonnage HP-SEC du poids moléculaire de protéines, de pullulans et d'oxydes de polyéthylène standards. Phase mobile : tampon de phosphate de sodium de 50mM, pH 7,2, KCl 0,15 M, urée 5M. Vitesse d'éluion : 0,5ml/min. Détecteur : RI.

The broad elution pattern of *BmF-I* can be attributed to the presence of silk fibroin species with variable size, the high molecular weight species prevailing over the others, as indicated by the position of the peak maximum. To understand the mechanism leading to formation of silk fibroin chains of different length, various factors should be taken into account. Sprague *et al.* (1979) observed variation in length of native fibroin polypeptides produced by single larvae, and attributed this finding to multiple allelism of the fibroin gene. On this basis, a certain degree of size heterogeneity in native silk fibroin cannot be excluded. This heterogeneity can be further enhanced during silk processing, due to the degrading action of various physico-mechanical and chemical stresses. Considering that silk fibroin, *i.e.* the II-chain, has a block-copolypeptide structure in which two basic polypeptide sequences alternate regularly (Lotz and Colonna Cesari, 1979), it is reasonable to assume that the same sites potentially sensitive to hydrolytic attack might occur regularly along the fibroin chain. This may lead to further amplification of the degrading effect, whose outcome is the formation of fibroin polypeptides of different length, the average size depending on both strength of the hydrolytic attack and accessibility of sensitive sites.

The other chromatograms shown in Figure 4 refer to silk fibroin samples degraded to variable extents by exposure to various physico-chemical agents (see: Materials and Methods). The width and shape of the elution profiles changed from sample to sample, the peak maximum shifting to higher retention volumes as a function of the extent of sample degradation (known on the basis of other tests, such as tensile and viscosity measurements). The L-chain shoulder is no more visible due to overlapping of other medium-to-low molecular weight polypeptide species. The differences emerging from the inspection of the elution profiles are quantitatively expressed by means of the cumulative weight fraction *MWD* curves shown in Figure 5.

The molecular weight of the different silk fibroin samples can be calculated on the basis of the calibration curves discussed in the previous paragraph. Owing to the broad *MWD* displayed by the samples, the calculation method based on the peak maximum was considered unsuitable for describing the characteristics of the samples, as it accounts only for one polypeptide fraction, the most abundant

in the sample, without considering the molecular weight distribution, *i.e.* the contribution of fibroin polypeptides with higher and lower size. Therefore, the computation method usually adopted for synthetic polymers, based on the integration of the entire elution curve and on the calculation of molecular weight averages, was applied to the silk samples (Yau *et al.*, 1979).

Table I lists the values of $\bar{M}_w$, $\bar{M}_n$ and of the $\bar{M}_w / \bar{M}_n$ ratio. The molecular weight of native silk fibroin extracted from the posterior part of the silk gland is about 350kDa (Shimura, 1988). Lower molecular weights are therefore expected from processed silk materials, as those tested in this study. However, the molecular weight averages calculated from pullulans and polyethylene oxides calibration curves seem to underestimate too much the true molecular size of both reference (Prati *et al.*, 1958) and degraded silk fibroin samples. This result can be attributed to the different chemical composition of unknown and standard samples, which inevitably influenced their permeation behaviour. In fact, as previously observed, the actual size of polymer molecules in solution mostly depends on polymer chemistry and polymer-solvent interactions, rather than on nominal molecular weight (Yau *et al.*, 1979). On this basis it is possible to state that these water-soluble random coil polymers cannot be considered suitable standards for evaluating the molecular weight of silk fibroin.

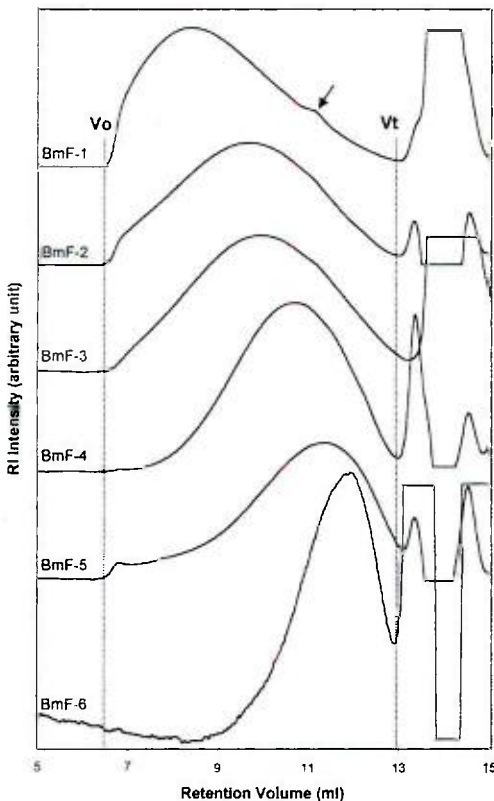


Fig. 4: HP-SEC elution profiles of silk fibroin samples with variable degree of polymerization. Chromatographic conditions as in Figure 3.

Fig. 4 : Profils d'éluion HP-SEC d'échantillons de fibroïne de soie avec un degré variable de polymérisation. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celles de la Fig. 3.

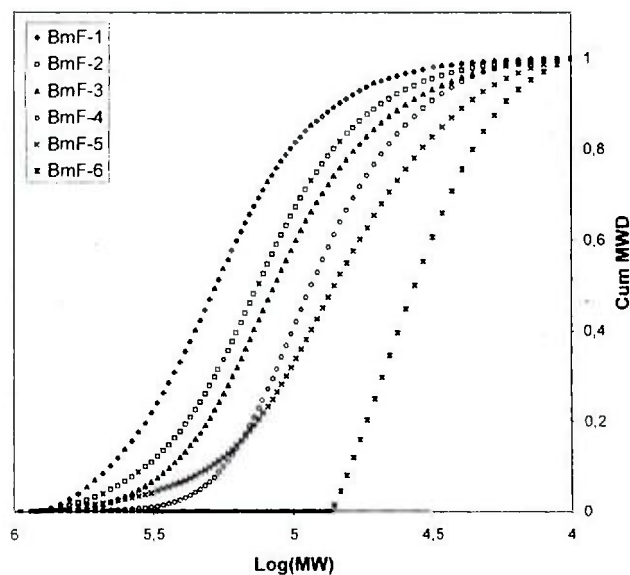


Fig. 5: Cumulative weight fraction MWD curves of silk fibroin samples with variable degree of polymerization.

Fig. 5. Courbes cumulatives MWD de la fraction de masse d'échantillons de fibroïne de soie avec des degrés de polymérisation divers.

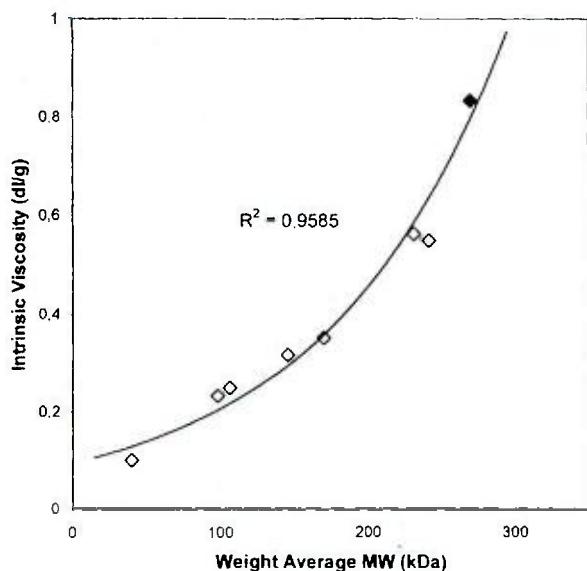


Fig. 6: Relation between intrinsic viscosity and weight-average molecular weight of silk fibroin samples with variable degree of polymerization.

Fig. 6. Relation entre la viscosité intrinsèque et la moyenne pondérée de la masse moléculaire d'échantillons de fibroïne de soie ayant un degré variable de polymérisation.

Table I: Weight- and Number-Average Molecular Weights (kDa) and Polydispersity Indexes of Silk Fibroin Samples with Different Degree of Polymerization.

Tableau I. Masses moléculaires moyennes en nombre et en poids (kDa) et indices de polydispersion d'échantillons de fibroïne de soie ayant un degré différent de polymérisation.

	Proteins Protéines			Pullulans			Polyethylene oxides Oxydes de polyéthylène		
	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
<i>BmF-1</i>	232	139	1.66	135	57	2.38	157	32	4.99
<i>BmF-2</i>	170	96	1.78	94	40	2.37	92	14	6.59
<i>BmF-3</i>	146	84	1.73	73	29	2.52	63	14	4.35
<i>BmF-4</i>	99	63	1.55	44	21	2.12	30	9	3.34
<i>BmF-5</i>	103	50	2.04	52	13	3.91	53	4	11.5
<i>BmF-6</i>	50	35	1.44	19	10	2.05	11	3	3.45

A more accurate estimate of the molecular weight of silk fibroin seems to be given by the calibration curve of proteins. The $\overline{M}_w$ of the reference sample (*BmF-1*) is 232kDa. As expected, this value is lower than that of native silk fibroin, the extent of decrease reflecting the processing history of the sample, from cocoon reeling to fabric degumming (Prati *et al.*, 1958), which resulted in a mixture of fibroin chains of variable size. High molecular weight polypeptides still represent the preponderant fraction in this sample, as indicated by the *MWD* curve of Figure 5 (50% by weight of the fibroin chains have a size > 200kDa). However, low molecular weight polypeptides are present as well, as shown by the peak tail towards the high retention volume region. In this context it is important to remind that the value of $\overline{M}_w$ averages the weight contribution of fibroin chains of different size.

The other silk samples display lower $\overline{M}_w$ values, in agreement with the qualitative observations derived from the inspection of the elution curves. It is worth noting that the values of $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$ and $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ provide a complete description of the characteristics of each sample. For example, samples *BmF-4* and *BmF-5* with almost the same $\overline{M}_w$ are distinguishable by the values of $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ and the trend of the cumulative weight fraction *MWD* curves, which clearly indicate the presence of different populations of fibroin polypeptides. We may speculate that probably they arose from degradation processes that proceeded with different kinetics and mechanism. In fact, sample *BmF-5* underwent natural aging by exposure to environmental agents (light, humidity, temperature, etc.), while the other was degraded by a strong chemical attack.

Relation between $\overline{M}_w$ and $[\eta]$ of Silk Fibroin:

The viscosity of polymer solutions is a subject of both theoretical and practical interest. The latter aspect covers the application of viscosity measurements for the control of manufacturing and

processing conditions of natural and synthetic polymers. Early studies on viscometry of silk (Prati *et al.*, 1958; Prati and Moruzzi, 1959) led to develop a standard method (SNV 195 595) currently applied as a routine method for the determination of the properties of silk, in particular for assessing the effect of chemical treatments able to induce more or less extensive depolymerization of silk fibres. Values of $[\eta] \geq 0.6 \text{ dl/g}$ characterize silks with high level of structural and chemical integrity, such as native silk extracted from silk gland or cocoon silk degummed in very mild conditions. Lower values are usually obtained from processed silk, the extent of decrease depending on the strength of the treatment. It is generally accepted that values of $[\eta] \leq 0.3 \text{ dl/g}$ identify degraded silk materials with poor functional properties in terms of processing, as well as use and maintenance performance.

The intrinsic viscosity $[\eta]$ of the silk samples examined in this study was determined in the usual manner, by measuring the flowing time of a silk fibroin solution against pure solvent (aqueous LiBr). The plot of $[\eta]$ vs. $\bar{M}_w$ is shown in Figure 6. The best fit of the data points was given by an exponential curve, which describes the relation between the two variables. Prati *et al.* (1958), on the basis of sedimentation analyses, reported a molecular weight of 270kDa for silk fibroin with $[\eta] = 0.83 \text{ dl/g}$. It is interesting to note that the literature value fits the same regression curve (see: solid symbol in Figure 6).

Intrinsic viscosity and molecular weight of polymer molecules in dilute solutions are related by the well-known empirical equation of Mark-Houwink: $[\eta] = KM^a$, where M is the molecular weight, and K and a are constants (Van Krevelen, 1990). The values of a and K are dependent on the nature of the polymer-solvent interactions, on polymer conformation, and hydrogen bonding activity of the solvent. Values of a and K have been reported for various polymer-solvent combinations, but not for silk. By applying the Mark-Houwink equation to the experimental data (after logarithmic transformation) values of $a = 0.95$ and $\log K = -2.53$ were obtained. These values are close to literature data reported for synthetic polymers in various organic solvents (in particular: $a \cong 0.8$ for most polymers dissolved in good solvents: $-1 \leq \log K \leq -2.6$). The slightly higher value of a obtained in the present study accounts for the differences between the silk fibroin-LiBr system and the polymer-solvent systems reported in literature, as well as for the strong hydrogen bonding activity of the solvent (Van Krevelen, 1990). These results support the validity of the relation of Figure 6, as well as the suitability of the chromatographic method as a tool for the evaluation of the degree of polymerization of silk. These findings are of great practical interest because they offer an alternative and/or complementary approach to study the degree of polymerization of silk and the mechanism of degradation processes.

CONCLUSIONS

HP-SEC proved to be a suitable technique for measuring the molecular weight of silk fibroin. The high mechanical stability and efficiency of the porous silica-based column packing provided good reproducibility of the chromatographic runs and accuracy of molecular weight measurements, in combination with short analysis time. Molecular weight was calculated by integrating the entire elution curve and expressed as molecular weight averages $\bar{M}_w$, $\bar{M}_n$. The use of proteins as molecular weight standards gave the best estimate of the molecular weight of unknown silk samples. MWD curves and $\bar{M}_w / \bar{M}_n$ ratios provided a comprehensive description of each sample, accounting for the presence and contribution of fibroin polypeptides differing in size.

The observed relation between $\bar{M}_w$ and $[\eta]$ confirms the validity of the chromatographic method, encouraging its application as routine test for determining the degree of polymerization of silk samples of both industrial and research interest. The advantage of HP-SEC with respect to viscometry is that the amount of sample required for an individual analysis is very small (1 mg or less), and that the sample is fully characterized by the combination of various chromatographic parameters, such as

$\overline{M}_w, \overline{M}_n, \overline{M}_w / \overline{M}_n$ and MWD. The knowledge and evaluation of these parameters may help in studying in more detail the kinetics and mechanism of degradation processes induced by aging and by different physico-chemical agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the C.O.E. (Center of Excellence), Special Coordination Funds for promoting Science and Technology, of the Science and Technology Agency, Japan.

The authors also wishes to express their thanks to the European Science Foundation for support given through the ESF Network (Silk: properties and production).

REFERENCES

- ASAKURA T. (1986) Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin in Aqueous Solution, Makromol. Chem., Rapid Commun., 7, 755-759.
- BECKER M.A. & TUROSS N. (1994) Initial Degradative Changes Found in *Bombyx mori* Silk Fibroin, in: Silk Polymers. Materials Science and Biotechnology, Kaplan D., Wade Adams W., Farmer B., and Viney C. Ed., ACS Symposium Series 544, Washington DC.
- CARBONI P. (1952) Silk. Biology, Chemistry, Technology, Chapman and Hall, Ltd., London.
- CENTOLA G., BRAGADIN C., MORUZZI P. (1959) Degradazione della Fibroina e Proprietà Tecnologiche della Seta, Bollettino AICTC, 8, 1-10.
- FREDDI G. & ALLARA G. (1997) Fractionation of Silk Proteins (*Bombyx mori*) by Precipitation Techniques and Hydrophobic Interaction Chromatography, Sericologia 37, 659-673.
- GALLESE G. (1961) Tecnologia della Seta, Stazione Sperimentale per la Seta, Milano.
- GULRAJANI M.L. (1993) Chemical Processing of Silk, Gulrajani M.L., Ed., Indian Institute of Technology, New Delhi.
- KNOTT J., FREDDI G., BELLY M. (1983) Analytical Investigation of Degumming of Silk (*Bombyx mori* L.), Melliand Textilberichte, 64, 481-483.
- LOTZ B. & COLONNA CESARI F. (1979) The Chemical Structure and the Crystalline Structures of *Bombyx mori* Silk Fibroin, Biochimie, 61, 205-214.
- OTTERBURN M.S. (1977) The Chemistry and Reactivity of Silk, in: Chemistry of Natural Protein Fibers, Asquith R.S. Ed., Plenum N.Y., pp. 53-80.
- PRATI G., MORUZZI P., CENTOLA G. (1958) Il Peso Molecolare della Fibroina. La Seta, 19, 37-41.
- PRATI G. & MORUZZI P. (1959) Viscosimetria della Seta. La Seta, 20, 1-7.
- ROCHAS P. & PIERRET M. (1958) Sur la Détermination de la Perte a la Soude de la Soie Selon la Méthode Oku et Shimizu, Bull. I.T.F., 77, 87-92.
- SHIMURA K. (1988) The Structure, Synthesis and Secretion of Fibroin in the Silkworm, *Bombyx mori*, Sericologia, 28, 457-479.
- SPRAGUE K.U., ROTH M.B., MANNING R.F., GAGE L.P. (1979) Alleles of the Fibroin Gene Coding for Proteins of Different Lengths, Cell, 17, 407-413.
- VAN KREVELEN D.W. (1990) Properties of Polymers, Elsevier Science Pub. B.V., Amsterdam, pp. 243-283.
- YAU W.W., KIRKLAND J.J., BLY D.D. (1979) Modern Size Exclusion Liquid Chromatography. Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc.
- ZAHN H. (1993) Silk, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH Publishers, Inc., Vol. A24, 95-106.

UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION HP POUR ETUDIER LE DEGRE DE POLYMERISATION DES FIBRES DE FIBROINE DE SOIE (*B. MORI*)

G. FREDDI^{1*}, A. BERLIN¹, M. TSUKADA² & E. DUBINI PAGLIA³

1. Stazione Sperimentale per la Seta, Via Giuseppe Colombo, 83, 20133, Milano, Italie.

2. National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba City, Ibaraki 305-8634, Japon.

3. Dipartimento di Chimica Fisica ed Elettrochimica, Università degli Studi di Milano, via Golgi 19, 20133 Milano, Italie.

*L'étude présente traite de la détermination chromatographique de la masse moléculaire et du degré de polymérisation de la fibroïne de soie de **Bombyx mori** par chromatographie d'exclusion HP (HP-SEC). La colonne est calibrée avec trois gammes d'étalons de masse moléculaire solubles dans l'eau : des protéines, des pullulans et des oxydes de polyéthylène. Nous avons étudié l'effet de la phase mobile dénaturante, contenant de l'urée 5M, sur le comportement d'éluion des polymères standards. La courbe d'étalonnage des protéines est affectée de manière importante par la présence du chaotrope, tandis que celles des deux autres polymères ne changent pas. Des échantillons de protéine de soie avec un degré de polymérisation différent sont dissous dans une solution saturée de LiSCN et analysés par HP-SEC après une dialyse contre la phase mobile. Les profils chromatographiques permettent de calculer les paramètres suivants pour chaque échantillon : $\overline{M}_w$ (masse moléculaire moyenne en poids), $\overline{M}_n$ (masse moléculaire moyenne en nombre, $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ (indice de polydispersion), MWD (distribution de la masse moléculaire). La viscosité intrinsèque $[\eta]$ des échantillons est mesurée avec la méthode standard SNV195 195 et on établit la relation entre les valeurs de $[\eta]$ et de $\overline{M}_w$. Nous discutons des avantages à utiliser la méthode HP-SEC pour déterminer le degré de polymérisation des fibres de fibroïne de soie.*

INTRODUCTION

La transformation de la soie consiste en une série d'étapes commençant par le séchage, la cuisson, le dévidage des cocons et débouchant sur la production de fils et de tissus de soie grège, qui peuvent être ensuite décreusés, blanchis, teints, imprimés et finis. Une discussion détaillée sur la transformation de la soie n'est pas l'objet de cette étude. Des revues approfondies et des livres ont été publiés sur ce sujet (Carboni, 1952 ; Gallese, 1961 ; Gulrajani, 1993 ; Zalin, 1993). La soie subit une série de traitements physiques et chimiques, du début à la fin de la chaîne de transformation, qui provoquent inévitablement une modification de la structure et des propriétés intrinsèques de la fibre. En fait, la soie peut être exposée à des environnements secs ou humides, à des températures, des pH variés, et pendant des durées variées en fonction du processus à accomplir, en présence de différents types de produits chimiques. De plus, ces conditions de traitement sont souvent accompagnées de stress physico-mécaniques. En dehors de la transformation, les conditions de stockage peuvent aussi

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

affecter les propriétés de la soie, en fonction de la durée, de la température, de l'humidité, de l'exposition à la lumière, etc... (Becker et Tuross, 1994).

En tant que fibre protéique, la soie possède des groupes cibles potentiellement sensibles à l'attaque de produits chimiques variés (Otterburn, 1994). L'effet principal consiste en la rupture de liens covalents (les ponts peptides et disulfures) et d'autres interactions faibles (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques et hydrophobes, forces de van der Waals, etc...). Une liaison entre les groupes réactifs des acides aminés des chaînes latérales peut aussi être induite bien que cela se produise de façon marginale dans le contexte des conditions conventionnelles de transformation. Il résulte de ces opérations une dégradation plus ou moins étendue des macromolécules de fibroïne.

On sait que les changements de la structure chimique de la soie, c'est à dire la rupture des liaisons entraînant la baisse du degré de polymérisation a des effets significatifs sur la performance de la fibre : perte des propriétés d'élasticité, changement dans la prise de teinture, sensibilité plus élevée de la surface au frottement et au jaunissement, maintien, drapé et lustre médiocres etc... (Centola et coll., 1959). La qualité des produits soyeux dépend donc d'une part de la possibilité à limiter autant que possible les conséquences négatives que certains traitements induisent inévitablement et d'autre part, du contrôle systématique des conditions de transformation et de la qualité du tissu. Ce dernier aspect est étudié depuis longtemps et des méthodes d'analyse variées ont été proposées pour le contrôle de la qualité de la soie (Rochas et Pierret, 1958 ; Knott et coll., 1983). La détermination de la viscosité intrinsèque (méthode de test SNV 195 195) conçue spécialement pour évaluer le degré de polymérisation de la soie est l'un des tests les plus utiles que l'on peut faire dans un laboratoire textile dans un but à la fois scientifique et technologique.

Les mesures de la viscosité utilisées ont certaines limites. L'une est liée à la quantité de soie nécessaire pour une seule mesure (de 50 à 250 mg), qui ne représente pas une limite réelle quand on teste des échantillons industriels mais qui pourrait devenir un facteur limitant quand on utilise des petits échantillons provenant de traitements en laboratoire ou provenant de textiles anciens ou à l'intérêt artistique ou historique. De plus, bien que la valeur de viscosité intrinsèque caractérise un échantillon sans aucune ambiguïté, elle ne donne aucune information sur la masse moléculaire et la distribution de la masse moléculaire de la fibroïne de soie, deux paramètres extrêmement utiles pour étudier la cinétique et les mécanismes de dégradation.

Cette étude a donc été entreprise dans le but de mettre au point une méthode chromatographique pour déterminer le degré de polymérisation de la soie. Les résultats rapportés viennent de la mise au point d'une méthode basée sur la technique de chromatographie d'exclusion HP (HP-SEC). La discussion couvre divers aspects : de la procédure d'étalonnage des colonnes à l'analyse de la fibroïne de soie avec un degré variable de polymérisation et au calcul de la masse moléculaire. La corrélation entre la viscosité intrinsèque et la masse moléculaire de la fibroïne de soie est aussi discutée.

MATERIELS ET METHODES

Les échantillons suivants de fibroïne de soie ont été utilisés dans cette étude : *BmF-1* (échantillon de référence ; tissu de twill grège, décreusé avec du savon de Marseille aqueux et bouillant à 0,07 % pendant 30 + 30 min., parfaitement rincé avec de l'eau déionisée, séché à température ambiante, puis dont le Soxhlet est extrait avec de l'éther diéthylique pour enlever les matières grasses résiduelles) ; *BmF-2* (tissu de twill décreusé, dégradé grâce à un décreusage alcalin prolongé) ; *BmF-3* (tissu de twill décreusé, vieilli en laboratoire grâce à une exposition prolongée aux radiations de la lumière du jour) ; *BmF-4* (tissu de twill décreusé, dégradé par un traitement prolongé à l'acide) ; *BmF-5* (fil de soie, provenant d'un tissu fabriqué à la fin du 19^{ème} siècle) ; *BmF-6* (fil de soie provenant d'un tissu fabriqué au 15^{ème} siècle).

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ de la soie est mesurée par le procédé standard de la méthode SNV 195 195 (1968).

Pour les analyses chromatographiques, la fibroïne de soie (1 à 5 mg) est dissoute dans un petit volume de LiSCN aqueux à 50 % (p/v), à température ambiante pendant 30 min. Après dilution avec un tampon de phosphate de sodium 50mM, pH 7,2, 0,15M KCl, urée 5M, la solution est abondamment dialysée contre le même tampon pendant 48 h, dans un tube de cellulose (Spectra/Por 6, Spectrum, $MWCO = 3,5$ Kda). A la fin de la dialyse, la solution est diluée jusqu'à ce qu'elle donne une concentration en fibroïne de soie de 1 mg/ml, filtrée avec des filtres de 0,2 μ m et immédiatement analysée par chromatographie d'exclusion.

Le système chromatographique Waters est composé d'une pompe (mod. 510), d'un injecteur manuel (mod. U6K) et d'un détecteur d'indice de réfraction (mod. 410) équipé avec un module de contrôle de la température. Le système est contrôlé par le logiciel chromatographique Maxima 820 (Waters), comprenant un logiciel de traitement des données GPC. La température de la colonne est fixée à 30° C. La colonne utilisée est une Shodex Protein KW-804 (Waters, 8 $\times$ 300 mm), remplie d'un gel de silice sphérique poreux recouvert avec des groupes hydroxy hydrophiles (pré colonne : Shodex Protein KWX-G, 6 $\times$ 50 mm). L'efficacité de la colonne est mesurée sur la base de la demi largeur du pic d'éthylène glycol ($N = 15000$). Le volume d'injection d'échantillons standards et inconnus varie entre 50 et 100 μ l. La vitesse d'élution est de 0,5 ml/min. De l'eau distillée deux fois, un tampon phosphate de sodium de 50mM, au pH de 7,2, 0,15M KCl, avec et sans urée 5M sont utilisés comme phases mobiles.

Les standards de masse moléculaire utilisés sont les suivants : protéines (Kits d'Étalonnage de Filtration sur Gel HMW et LMW, Pharmacia Biotech contenant du bleu dextran 2000, 2000kDa, de la thyroglobuline 669 kDa, de la ferritine 440kDa, de la catalase 232 kDa, de l'aldolase 158 kDa, de l'albumine de sérum bovin 67 kDa, de l'ovalbumine 43 kDa, du chymotrypsinogène A 25kDa, de la ribonucléase A 13,7 kDa), des pullulans (Shodex Standard P-82 ; Showa Denko, des polysaccharides de maltotriose macromoléculaires linéaires classés selon la masse moléculaire en 8 classes comprises entre 788kDa et 5,9 kDa, avec une distribution de masse moléculaire étroite : $1,23 > \overline{M}_w / \overline{M}_n > 1,06$) ; des oxydes de polyéthylène (TSK Standard, Tsoh, composé de 8 polymères linéaires avec une masse moléculaire comprise entre 913 kDa et 7,1 kDa, avec une distribution de masse moléculaire étroite : $1,20 > \overline{M}_w / \overline{M}_n > 1,04$). Les solutions standards sont préparées selon les indications des fabricants.

La définition des moyennes de masse moléculaire HP-SEC et de distribution de la masse moléculaire (Yau et coll., 1979) sont les suivantes :

$$\text{- masse moléculaire moyenne en nombre : } \overline{M}_n = \sum n_i M_i / \sum n_i = \sum w_i / \sum (w_i / M_i)$$

$$\text{- masse moléculaire moyenne en poids : } \overline{M}_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i = \sum w_i M_i / \sum w_i$$

où n_i et w_i sont le nombre et le poids des molécules de masse moléculaire M_i , respectivement et i est un indice d'augmentation des masses moléculaires présentes. $\overline{M}_n$ et $\overline{M}_w$ donnent une mesure du poids et de la longueur moyens de la chaîne, respectivement, dans un échantillon de polymères. La valeur de $\overline{M}_w$ est toujours plus élevée que $\overline{M}_n$ ($\overline{M}_w = \overline{M}_n$ pour les espèces de polymères monodispersés). Les deux paramètres sont corrélés avec un certain nombre de propriétés physiques des polymères synthétiques (force, résistance, fluidité, densité, etc...)

Le ratio $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ appelé indice de polydispersion, exprime l'étendue de la distribution de la masse moléculaire ($\overline{M}_w / \overline{M}_n = 1$ pour les espèces de polymères monodispersés).

La distribution de la masse moléculaire (MWD) indique la variation de la distribution de la taille des molécules dans un échantillon. Elle peut être représentée graphiquement sous forme intégrale comme la fraction de poids cumulé en fonction de la masse moléculaire. MWD est une propriété intrinsèque du polymère et les courbes MWD permettent la comparaison et le traitement quantitatif des données HP-SEC obtenues avec différents instruments.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etalonnage HP-SEC :

La chromatographie d'exclusion est une technique chromatographique liquide qui fractionne les molécules selon leur taille (Yau et coll., 1979). La première étape de l'HP-SEC consiste à construire une courbe d'étalonnage en liant le volume de rétention (V_R) à la masse moléculaire de l'échantillon de polymères. En principe, les masses moléculaires standards devraient avoir la même structure et conformation chimique que l'échantillon inconnu. En conséquence, une série de protéines globulaires avec des masses moléculaires couvrant l'étendue de fractionnement de la colonne est choisie. Comme la fibroïne de soie est une protéine fibreuse et non pas une protéine globulaire et que dans une solution aqueuse elle prend de préférence une conformation en pelotes statistiques (Asakura, 1986), deux séries supplémentaires de polymères en pelotes statistiques solubles à l'eau sont utilisées comme standards d'étalonnage, c'est à dire les pullulans (des polysaccharides linéaires naturels produits par *Aureobasidium pullulans*) et des oxydes de polyéthylène.

Il est de notoriété que la solution de fibroïne de soie aqueuse est plutôt instable. L'ajout de quantités variables de chaotropes (tels que l'urée) est nécessaire pour assurer assez de stabilité à la solution pour l'analyse chromatographique (Freddi et Allara, 1997). On a d'abord étudié l'effet de dénaturation d'un tampon d'échantillon et de la phase mobile sur le comportement d'élution des polymères standards. La figure 1 montre les résultats obtenus pour les protéines. Les courbes de V_R en fonction de $\log MW$ divergent de manière significative, surtout pour les masses moléculaires moyennes à élevées. En présence d'urée 5M, les protéines ont des temps de rétention plus faibles, ce qui indique un degré plus faible de pénétration à l'intérieur des pores du remplissage de la colonne. Ce résultat doit en premier lieu être attribué à l'effet déstabilisant du chaotrope, qui rompt la structure aqueuse autour des protéines, ce qui entraîne le désordre de la structure native par le déploiement de la chaîne. En conséquence, le volume de la solution de protéines augmente, et entraîne des volumes de rétention plus petits. On fait le même test avec les pullulans (Figure 2). Aucun effet appréciable attribué à la présence d'urée n'est observé, les points des données répondant à la même courbe de régression. Les standards d'oxydes de polyéthylène montrent la même tendance (données non présentées), ce qui confirme l'effet négligeable du chaotrope sur le degré de conformation de la pelote et de la solution pour les deux polymères.

La figure 3 montre les courbes d'étalonnage obtenues avec les protéines, les pullulans et les oxydes de polyéthylène élués dans les mêmes conditions chromatographiques, en utilisant un tampon d'urée 5M comme phase mobile. Le meilleur calage des données en pointillés est obtenu avec des courbes polynomiales de troisième ordre. Les courbes se chevauchent à proximité de V_0 tendant à se situer dans une fourchette de masse moléculaire moyenne à basse. Dans cette fourchette, le volume d'élution des polymères standards avec la même masse moléculaire nominale se classe selon l'ordre suivant : protéines > pullulans > oxydes de polyéthylène. Ce comportement est attribuable à leurs différentes structure chimique et conformation en solution. La présence d'interactions spécifiques polymère-solvant détermine la forme et la taille des polymères dans la solution (volume hydrodynamique), qui est responsable en premier lieu de leur comportement de pénétration à l'intérieur des pores de la phase stationnaire (Yau et coll., 1979). Ces effets expliquent la pente différente des courbes d'étalonnage de la masse moléculaire.

HP-SEC de la fibroïne de soie :

Les profils d'élution HP-SEC d'échantillons de fibroïne de soie variés sont présentés dans la Figure 4. En se reportant au chromatogramme marqué *BmF-I*, qui représente l'échantillon de fibroïne de soie de référence dans cette étude, il est possible d'observer que le pic couvre la gamme totale de fractionnement de la colonne, comme le définissent les volumes d'exclusion (V_0) et de pénétration totale (V_t). Le maximum du pic tombe dans la fourchette de masse moléculaire moyenne à élevée. L'épaulement apparaissant dans la fourchette de faible masse moléculaire (voir flèche dans la Fig. 4)

est attribuable à la sous-unité légère de fibroïne de soie (chaîne L), qui s'est séparée de la lourde (chaîne H) en conséquence de la rupture du pont disulfure pendant le décreusage alcalin (résultats non publiés).

Le large profil d'élution de *BmF-I* peut être attribué à la présence d'espèces de fibroïne de soie de tailles variables, les espèces à la masse moléculaire élevée l'emportant sur les autres, comme l'indique la position maximum du pic. Pour comprendre le mécanisme conduisant à la formation de chaînes de fibroïne de soie de différentes longueurs, des facteurs variés doivent être pris en compte. Sprague et coll., (1979) ont observé une variation de la longueur des polypeptides de fibroïne native produits par une larve et attribué cela à l'allélisme multiple du gène de la fibroïne. Sur cette base, un certain degré d'hétérogénéité de taille dans la fibroïne de soie native ne peut pas être exclu. Cette hétérogénéité peut être encore renforcée pendant la transformation de la soie, à cause de l'action de dégradations dues à divers stress physico-mécaniques et chimiques. Comme la fibroïne de soie, c'est à dire la chaîne H, a une structure en blocs de copolypeptides dans laquelle deux séquences de polypeptides de base alternent régulièrement (Lotz et Colonna Cesari, 1979), il est raisonnable de penser que des attaques hydrolytiques de sites identiques potentiellement sensibles peuvent se produire régulièrement le long de la chaîne de fibroïne. Cela pourrait entraîner une amplification supplémentaire de l'effet de dégradation, dont le résultat est la formation de polypeptides de fibroïne de différentes longueurs, dont la taille moyenne dépend à la fois de la force de l'attaque hydrolytique et de l'accessibilité aux sites sensibles.

Les autres chromatogrammes présentés dans la Figure 4 se réfèrent aux échantillons de fibroïne de soie dégradés à des différents degrés par l'exposition à des agents physico-chimiques variés (voir Matériels et Méthodes). La largeur et la forme des profils d'élution changent d'un échantillon à l'autre, le pic maximum se déplaçant vers des volumes de rétention plus élevés en fonction du degré de dégradation de l'échantillon (connus grâce à d'autres essais, tels que les mesures de résistance et de viscosité). L'épaule de la chaîne L n'est plus visible à cause du chevauchement d'autres espèces de polypeptides dans la fourchette de masse moléculaire moyenne à faible. Les différences émergeant de l'inspection des profils d'élution sont quantitativement exprimées au moyen de courbes *MWD* de fraction cumulative de la masse présentées dans la Figure 5.

La masse moléculaire de différents échantillons de fibroïne de soie peut être calculée sur la base des courbes d'étalonnage présentées dans le paragraphe précédent. Grâce à l'importante *MWD* que présentent les échantillons, on considère que la méthode de calcul basé sur le pic maximum ne convient pas pour décrire les caractéristiques des échantillons, car elle n'explique qu'une fraction de polypeptide, la plus abondante dans l'échantillon, sans prendre en considération la distribution de la masse moléculaire, c'est à dire la contribution des polypeptides de fibroïne de taille plus élevée et plus basse. La méthode de calcul habituellement adoptée pour les polymères synthétiques, basée sur l'intégration de la courbe d'élution entière et sur le calcul des moyennes de masse moléculaire est donc appliquée aux échantillons de soie (Yau et coll., 1979).

Le Tableau I liste les valeurs de $\bar{M}_w$, $\bar{M}_n$ et du ratio $\bar{M}_w/\bar{M}_n$. La masse moléculaire de la fibroïne de soie originaire de la partie postérieure de la glande séricigène est d'environ 350kDa (Shimura, 1988). On s'attend à ce que les masses moléculaires des tissus de soie transformés soient plus faibles que ceux de cette étude. Cependant, les moyennes de masse moléculaire calculées à partir des courbes d'étalonnage des pullulans et des oxydes de polyéthylène semblent trop sous-estimer la vraie taille moléculaire à la fois des échantillons de fibroïne de soie dégradée et de référence (Prati et coll., 1958). Ce résultat peut être attribué à la composition chimique différente des échantillons inconnus et standards, qui influence inévitablement leur comportement de pénétration. En fait, comme on l'a déjà observé, la taille réelle des molécules de polymère dans une solution dépend en grande partie de la chimie du polymère et des interactions polymère-solvant, plutôt que de la masse moléculaire nominale (Yau et coll., 1979). Sur cette base, il est possible d'affirmer que ces polymères aléatoires en pelotes statistiques solubles dans l'eau ne peuvent pas être considérés comme des standards adaptés pour évaluer la masse moléculaire de la fibroïne de soie.

Il semble que la courbe de calibration des protéines donne une estimation plus juste de la masse moléculaire de la fibroïne de soie. La $\overline{M}_n$ de l'échantillon référence (*BmF-1*) est de 232 kDa. Comme on peut s'y attendre, cette valeur est plus faible que celle de la fibroïne de soie native, le degré de baisse reflétant l'histoire de la transformation de l'échantillon, du dévidage du cocon jusqu'au décreusage du tissu (Prati et coll., 1958), qui entraînent le mélange de chaînes de fibroïne de taille variable. Des polypeptides à la masse moléculaire élevée représentent encore la fraction prépondérante dans cet échantillon, comme l'indique la courbe *MWD* de la Figure 5 (en poids 50 % des chaînes de fibroïne ont une taille > 200 kDa). Cependant, les polypeptides de faible masse moléculaire sont aussi présents, comme le montre la queue du pic vers la région de volume de rétention élevé. Dans ce contexte, il est important de se souvenir que la valeur de $\overline{M}_w$ est égale à la contribution de masse des chaînes de fibroïne de différente taille.

Les autres échantillons de soie présentent des valeurs de $\overline{M}_w$ moins élevées, ce qui confirme les observations qualitatives dérivées de l'inspection des courbes d'élution. Cela vaut la peine de noter que les valeurs de $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$ et de $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ donnent une description complète des caractéristiques de chaque échantillon. Par exemple, les échantillons *BmF-4* et *BmF-5* avec presque la même $\overline{M}_w$ peuvent être distingués par les valeurs de $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ et la tendance des courbes *MWD* de la fraction de la masse cumulative, qui indiquent clairement la présence de différentes populations de polypeptides de fibroïne. On peut spéculer qu'elles viennent probablement des processus de dégradation qui ont lieu avec un mécanisme et une cinétique différents. En fait, l'échantillon *BmF-5* subit un vieillissement naturel par l'exposition aux agents environnementaux (lumière, humidité, température, etc...) tandis que l'autre est dégradé par une forte attaque chimique.

Relation entre $\overline{M}_n$ et $[\eta]$ de la fibroïne de soie :

La viscosité des solutions de polymère est un sujet d'intérêt théorique et pratique. Ce dernier aspect couvre l'application de mesures de viscosité pour le contrôle de la fabrication et des conditions de transformation des polymères naturels et synthétiques. Les premières études sur la viscosimétrie de la soie (Prati et coll., 1958 ; Prati et Moruzzi, 1959) ont conduit à la mise au point d'une méthode standard (SNV 195 195) appliquée à présent comme une méthode de routine pour la détermination des propriétés de la soie, en particulier pour évaluer l'effet des traitements chimiques capables d'induire une depolymérisation plus ou moins étendue des fibres de soie. Les valeurs de $[\eta] \geq 0,6$ dl/g caractérisent les soies avec un niveau élevé d'intégrité structurale et chimique, telle que la soie native extraite de la glande séricigène ou la soie de cocon décreusée dans des conditions très douces. Des valeurs plus faibles sont en général obtenues pour la soie transformée, le degré de baisse dépendant de la force du traitement. On accepte généralement que les valeurs de $[\eta] \leq 0,3$ dl/g identifient des tissus de soie dégradée aux propriétés fonctionnelles médiocres en termes de transformation, et aussi en termes de performance d'utilisation et d'entretien.

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ des échantillons de soie examinés dans cette étude est déterminée de la manière habituelle, en mesurant le temps d'écoulement d'une solution de fibroïne de soie contre un solvant pur (LiBr aqueux). Le diagramme de $[\eta]$ contre $\overline{M}_w$ est présenté dans la figure 6. Le meilleur calage des données en pointillés est donné par une courbe exponentielle, qui décrit la relation entre les deux variables. Prati et coll., (1958), sur la base des analyses de sédimentation, ont signalé une masse moléculaire de 270 kDa pour la fibroïne de soie avec $[\eta] = 0,83$ dl/g. Il est intéressant de noter que la valeur de la littérature correspond à la même courbe de régression (voir : symbole plein dans la Figure 6).

La viscosité intrinsèque et la masse moléculaire des molécules de polymères dans des solutions diluées sont liées à l'équation empirique bien connue de Mark-Houwink $[\eta] = K M^a$, où M est la masse moléculaire, et K et a sont des constantes (Van Krevelen, 1990). Les valeurs de a et K sont dépendantes de la nature des interactions polymère-solvant, de la conformation du polymère et de l'activité de

liaisons hydrogène du solvant. On a trouvé les valeurs de a et K pour plusieurs combinaisons polymère-solvant mais pas pour la soie. En appliquant l'équation de Mark-Houwink aux données expérimentales (après transformation logarithmique) on obtient les valeurs de $\alpha = 0,95$ et $\log K = -2,53$. Ces valeurs sont proches des données de la littérature rapportées pour les polymères synthétiques dans des solvants organiques variés en particulier : $\alpha \approx 0,8$ chez la plupart des polymères dissous dans de bons solvants ; $-1 \leq \log K \leq -2,6$. La valeur légèrement plus élevée de α obtenue dans cette étude explique les différences entre le système de fibroïne de soie-LiBr et les systèmes polymère-solvant signalés dans la littérature, et la forte activité de liaison hydrogène du solvant (Van Krevelen, 1990). Ces résultats confirment la validité de la relation de la Figure 6, ainsi que l'adaptation de la méthode chromatographique comme outil d'évaluation du degré de polymérisation de la soie. Ces observations sont d'un grand intérêt pratique parce qu'elles offrent une alternative et/ou une approche complémentaire pour étudier le degré de polymérisation de la soie et le mécanisme des processus de dégradation.

CONCLUSIONS

L'HP-SEC s'avère être une technique adaptée pour mesurer la masse moléculaire de la fibroïne de soie. La stabilité mécanique élevée et l'efficacité de la colonne à base de silice poreux donne une bonne reproduction des opérations chromatographiques et des mesures justes de la masse moléculaire associée à un temps d'analyse court. La masse moléculaire est calculée en intégrant la courbe d'éluion entière et exprimée comme moyennes de masse moléculaire $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$. L'utilisation de protéines comme standards de masse moléculaire donne la meilleure estimation de la masse moléculaire d'échantillons de soie inconnus. Les courbes *MWD* et les ratios $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ donnent une description complète de chaque échantillon, expliquant la présence et la contribution des polypeptides de fibroïne de taille différente.

La relation observée entre $\overline{M}_w$ et $[\eta]$ confirme la validité de la méthode chromatographique, ce qui encourage son utilisation comme test de routine pour déterminer le degré de polymérisation d'échantillons de soie à la fois d'intérêt industriel et pour la recherche. L'avantage de l'HP-SEC par rapport à la viscosimétrie est que la quantité d'échantillon requise pour une analyse individuelle est très petite (1 mg ou moins) et que l'échantillon est complètement caractérisé par la combinaison des paramètres chromatographiques variés, tels que $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$, $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ et *MWD*. La connaissance et l'évaluation de ces paramètres pourraient permettre d'étudier plus en détail la cinétique et les processus du mécanisme de dégradation induits par le vieillissement et par différents agents physico-chimiques.

MANAGEMENT OF MULBERRY ROOT ROT WITH ANTAGONISTIC MICROORGANISMS

R. SRIDAR, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore - 641 003, India.

*Fungal pathogen i.e., **Macrophomina phaseolina** was isolated from the mulberry plants affected by root rot disease. Among the different antagonistic micro-organisms **Bacillus subtilis** showed the highest inhibitory effect on the root rot pathogen under laboratory conditions. **B. subtilis** was found to reduce the pathogen load in the mulberry rhizosphere.*

Keywords: Mulberry-root rot, *Macrophomina phaseolina*, antagonists, *Bacillus subtilis*.

INTRODUCTION

The soil borne diseases bring about a major loss to the mulberry growers. Among the soil borne diseases, the root rot causes serious damage leading to the death of the entire plant. The first report of *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid root rot was made by Butler and Bisby (1960). The incidence and loss due to the fungal diseases in mulberry vary with season, variety and cultivation practices (Sengupta *et al.*, 1990). They also reported that the diseased plants produce leaves with poor protein, sugar and moisture content. Feeding of diseased leaves affected the growth and development of silkworms. The symptoms caused by *M. phaseolina* are the sudden withering of leaves and affected plants failed to sprout after pruning and dried up completely (Tomy Philip *et al.*, 1992). The affected plants could be pulled out easily and roots contain a large number of black sclerotia (Prakasam *et al.*, 1993).

MATERIALS AND METHODS

1. Isolation of the pathogen from infected mulberry root:

Infected root samples showing typical root rot symptoms on mulberry plants of cultivar MR-2 were collected from the farmer's field at Velur (Kangayam Taluk), Erode District of Tamil Nadu. The root was cut into small bits and surface sterilised with 0.1% mercuric chloride for 3 minutes and washed thrice subsequently in sterile water. Then, the root bits were kept on plain agar medium and incubated. After 48 hours of incubation, the edge of a single mycelium was located under a microscope (single hyphal tip technique) and the tip was removed using a corkborer and transferred to a fresh Petri dish containing Potato Dextrose Agar medium. After the growth, the pure culture was transferred on PDA slides and maintained.

2. Effect of different antagonists on the growth of the pathogen:

The fungal antagonist *Trichoderma viride* and the bacterial antagonists i.e., *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* were used in the study. The antagonistic activity of the biocontrol agents to the pathogen was tested by the dual culture technique (Dennis and Webster, 1971) on PDA medium. Five mm diameter mycelial discs of 5 day old culture of *T. viride* were removed using a corkborer

and placed at one end of the Petri dish containing PDA. A disc of the pathogen from 5 day old culture was placed opposite to the antagonists.

In the case of bacterial antagonists, the biocontrol agents were streaked at one end of the Petri dish and the pathogen disc was placed at the opposite end. Five replications were maintained for each treatment. A control plate was also maintained. The plates were incubated at room temperature for 4 days.

3. Effect of different antagonists on the *M. phaseolina* population in mulberry rhizosphere:

The antagonists were applied @25g/plant and the fungicide carbendazim was applied @ 10 ml of 1% concentration per plant on a different plot. A control plot was maintained. The treatments were replicated four times. For enumerating *M. phaseolina*, rhizosphere soil was collected from the antagonists applied plots, carbendazim applied plots and as well as control plots. The samples were serially diluted and plated for enumerating *M. phaseolina* population using selective medium developed by Samiyappan (1988).

RESULTS

1. Isolation:

Based on the colony character and microscopic observation the obtained fungal pathogen has been identified as *Macrophomina phaseolina*. The fungus was able to cause the infection when reinoculated to mulberry and produced the symptoms of root rot.

2. In vitro effect of antagonists on the growth of pathogen:

The dual culture technique revealed that among the antagonists tested, *B. subtilis* registered the highest inhibition zone of 50 mm followed by *T. viride* and *P. fluorescens* registering 20 mm and 15 mm respectively (Table I).

Table I. Effect of antagonists on the growth of *M. phaseolina*.

Tableau I. Effet des antagonistes sur la croissance de *M. phaseolina*.

Treatment	Pathogen growth (mm)	Inhibition zone (mm)	Growth reduction (%)
Traitement	Croissance du pathogène (mm)	Zone d'inhibition (mm)	Réduction de la croissance (%)
Control / Témoin	90	--	--
<i>B. subtilis</i>	30	60	66.7
<i>T. viride</i>	40	50	55.6
<i>P. fluorescens</i>	60	30	33.3

Table II. Effect of antagonists on the *M. phaseolina* population in mulberry rhizosphere.

Tableau II. Effet des antagonistes sur la population de *M. phaseolina* dans la rhizosphère du mûrier.

Treatment	<i>M. phaseolina</i> population ($\times 10^4$ CFU/g of rhizosphere soil) Days after inoculation		
Traitement	Population de <i>M. phaseolina</i> ($\times 10^4$ CFU/g de sol de la rhizosphère) Jours après l'inoculation		
	30	70	105
<i>B. subtilis</i>	15.75 ^a	12.50 ^a	11.00 ^a
<i>T. viride</i>	16.50 ^b	13.25 ^b	13.00 ^b
<i>P. fluorescens</i>	16.75 ^b	14.75 ^c	14.00 ^b
Carbendazim	16.75 ^b	19.75 ^d	19.00 ^c
Control / Témoin	19.25 ^c	22.25 ^c	23.00 ^d

Data followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$ / Les données suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $p = 0,05$.

3. Effect of antagonists on the *M. phaseolina* population:

B. subtilis treated crop significantly reduced the *M. phaseolina* population to 11×10^4 CFU/g of soil from 23×10^4 CFU/g of soil in control plot on 105th day after inoculation. *P. fluorescens* and *T. viride* registered 14×10^4 and 13×10^4 CFU/g of soil which were on par with each other (Table II).

DISCUSSION

Since root rot disease is soil borne in nature, soil fungicide carbendazim is being recommended as a drench (Anitha *et al.*, 1989). But the use of hazardous chemical has led to the accumulation of fungicide residues in soil (Singh, 1984) and the development of an acquired resistance (Anitha *et al.*, 1989). The present investigation shows that *B. subtilis* was capable of suppressing *M. phaseolina* in mulberry rhizosphere. Similar effect of *B. subtilis* against soil borne pathogens has been reported by Weller (1988) and Sridar *et al.*, (1993) in annual crops. The inhibition capacity of *B. subtilis* has been attributed to the antibiotics produced by *B. subtilis* (Podile *et al.*, 1988). Turner and Backman (1991) reported that *B. subtilis* has been used to control plant pathogens and to increase plant growth. Since mulberry leaves are used for rearing silkworm, hazardous chemical may be replaced with antagonist like *B. subtilis* which is effective and has no residual toxicity.

REFERENCES

- ANITHA R., REDDY M. S., RAO K. C. (1989) Studies on acquired fungicide tolerance in *Macrophomina phaseolina* to mancozeb and captan and their cross tolerance to other fungicides. Indian J. Plant Prot. 17: 155-158.
- BUTLER E. J., BISKY G. R. (1960) The fungi of India, Vasudeva (Eds.) Indian Council of Agrl. Research. New Delhi., 552 pp.
- DENNIS C., WEBSTER J. (1971) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 25-39.
- PODILE A. R., DILEEPKUMAR B. S., DUBE H. C. (1988) Antibiotics of Rhizobacteria against some plant pathogens. Ind. J. Microbiol., 26. 106-11.
- PRAKASAM V., VALLUVAPARIDASAN V., JEYARAJAN R. (1993) A handbook on field crop diseases. AE publications Coimbatore. 68-75 pp.
- SAMIYAPPAN R. (1988) Biological control of blackgram root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Ph.D Thesis, TNAU, Coimbatore, India p. 169.
- SENGUPTA K., PRADEEP KUMAR, BAIG M., GOVINDAIAH (1990) Handbook on Pest and Disease control for Mulberry and silkworm. United Nations. Thailand p. 3.
- SINGH R. S. (1984) Introduction to Principles of Plant Pathology. Oxford and IBH Publishings Co. Pvt. Ltd., New Delhi 534 pp.
- SRIDAR R., RAMAKRISHNAN G., JEYARAJAN R. (1993) Studies on the compatibility of Rhizobium with biocontrol agent *Bacillus subtilis* in urdbean. J. Biol. Control., 7: 51-52.
- TOMY PHILIP, LATHA, GOVINDAIAH J. (1992) Studies on the root rot disease of mulberry and their control. Annual report CSRTI., Mysore (1992-93) pp. 43-45.
- TURNER J.T., BACKMAN P.A. (1991) Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. Plant Dis., 75: 347-353.
- WELLER D. M. (1988) Biological control of soilborne pathogens with rhizosphere bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 26: 379-407.

LUTTE CONTRE LE POURRISSEMENT DE LA RACINE CHEZ LE MURIER A L'AIDE DE MICRO-ORGANISMES ANTAGONISTES

R. SRIDAR, A. SUBRAMANIAN & N. CHANDRAMOHAN

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003, Inde.

*Nous avons isolé un pathogène fongique, **Macrophomina phaseolina** sur des plants de mûrier affectés par la maladie du pourrissement de la racine. Parmi les différents micro-organismes observés en laboratoire, **Bacillus subtilis** a l'effet inhibiteur le plus important sur le pathogène du pourrissement de la racine. On observe que **B. subtilis** diminue la présence des pathogènes dans la rhizosphère du mûrier.*

INTRODUCTION

Les maladies originaires du sol sont responsables de pertes importantes pour les cultivateurs de mûriers. Parmi ces maladies, le pourrissement de la racine cause des dégâts importants qui entraînent la mort de la plante. Le premier rapport sur le pourrissement de la racine par *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid a été publié par Butler et Bisby (1960). L'incidence des maladies fongiques et les pertes qu'elles entraînent chez le mûrier varient en fonction de la saison, de la variété et des pratiques de culture (Sengupta et coll., 1990). Ils ont aussi signalé que les plants malades donnent des feuilles avec de mauvaises teneurs en protéines, en sucres et en humidité. L'alimentation avec des feuilles de plants malades a des effets sur la croissance et le développement des vers à soie. Les symptômes provoqués par *M. phaseolina* sont le flétrissement soudain des feuilles ; de plus les plantes atteintes n'arrivent pas à débourrer après la taille et se dessèchent complètement (Tomy Philip et coll., 1992). On peut facilement déraciner les plants atteints et on constate que les racines contiennent un nombre important de sclérotés noirs (Prakasam et coll., 1993).

MATERIELS ET METHODES

1. Isolement du pathogène de la racine de mûrier infestée :

Des échantillons de racine infestée provenant de plants de mûrier du cultivar MR-2 et présentant les symptômes typiques du pourrissement de la racine sont recueillis dans une plantation de fermier à Velur (Kangayam Taluk), dans la région d'Erode du Tamil Nadu. La racine est coupée en petits morceaux dont la surface est stérilisée avec 0,1% de chlorure mercurique pendant 3 minutes et qui sont lavés trois fois de suite dans de l'eau stérilisée. Puis, les morceaux de racines sont conservés sur un milieu agar et incubés. Après 48 h d'incubation, le bord d'un mycelium unique est placé sous un microscope (technique de l'extrémité hyphale unique) et l'extrémité est retirée en utilisant un emporte pièce et transférée dans une boîte de Petri contenant un milieu gélosé de dextrose de pomme de terre (PDA). Après la croissance, la culture pure est transférée et maintenue sur des lames de verre de PDA.

2. Effet des différents antagonistes sur la croissance du pathogène :

L'antagoniste fongique *Trichoderma viride* et les antagonistes bactériens *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* sont utilisés dans l'étude. L'activité antagoniste des agents biologiques envers le pathogène est testée avec la méthode de culture double (Dennis et Webster, 1971) sur un

milieu gélosé de dextrose de pomme de terre. Des disques mycéliens de 5 mm de diamètre d'une culture de *T. viride* âgée de 5 jours sont prélevés en utilisant un emporte pièce et placés à l'une des extrémités d'une boîte de Petri contenant du PDA. Un disque du pathogène d'une culture de 5 jours est placé en face des antagonistes.

Avec les antagonistes bactériens, les agents biologiques sont étalés à un bout de la boîte de Petri et le disque pathogène est placé à l'extrémité opposée. Cinq répétitions sont maintenues pour chaque traitement. Une plaque témoin est aussi maintenue. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 4 jours.

3. Effet des différents antagonistes sur la population de *M. phaseolina* dans la rhizosphère du mûrier :

Les antagonistes sont appliqués à raison de 25 g / plante et le fongicide carbendazime est appliqué à raison de 10 ml à une concentration de 1 % par plante sur une parcelle différente. Une parcelle témoin est maintenue. Les traitements sont répétés quatre fois. Pour dénombrer *M. phaseolina*, le sol de la rhizosphère est recueilli dans les parcelles où les antagonistes ont été placés, dans les parcelles où du carbendazime a été appliqué et dans les parcelles témoins. Les échantillons sont dilués en série et placés sur une plaque pour dénombrer la population de *M. phaseolina* en utilisant un milieu sélectif mis au point par Samiyappan (1988).

RESULTATS

1. Isolement :

D'après le caractère de la colonie et l'observation microscopique, le pathogène fongique obtenu a été identifié comme *Macrophomina phaseolina*. Le champignon a pu provoquer une infestation quand il est réinoculé sur le mûrier et il produit les symptômes du pourrissement de la racine.

2. Effet des antagonistes *in vitro* sur la croissance du pathogène :

La technique de culture double révèle qu'avec les antagonistes testés, *B. subtilis* donne une zone d'inhibition de 50mm suivi par *T. viride* et *P. fluorescens* donnant respectivement 20 mm et 15 mm (Tableau I).

3. Effet des antagonistes sur la population de *M. phaseolina* :

Chez les plantes traitées avec *B. subtilis* la population de *M. phaseolina* baisse de manière importante (11×10^4 CFU/g de sol), contre 23×10^4 CFU/g de sol dans la parcelle témoin le 105^{ème} jour après l'inoculation. *P. fluorescens* et *T. viride* donnent 14×10^4 et 13×10^4 CFU/g de sol et sont donc égaux entre eux (Tableau II).

DISCUSSION

Comme la maladie du pourrissement de la racine survient dans le sol, le fongicide du sol, le carbendazime est recommandé comme remède (Anitha et coll., 1989). Mais l'utilisation de produits chimiques à risques a entraîné l'accumulation de résidus provenant de fongicides dans le sol (Singh, 1984) et le développement d'une résistance acquise (Anitha et coll., 1989). Cette étude montre que *B. subtilis* est capable de supprimer *M. phaseolina* dans la rhizosphère du mûrier. Weller (1988) et Sridar et coll., (1993) ont signalé un effet similaire de *B. subtilis* contre des pathogènes du sol sur des cultures annuelles. La capacité d'inhibition de *B. subtilis* a été attribuée aux antibiotiques produits par *B. subtilis* (Podile et coll., 1988). Turner et Backman (1991) ont rapporté que *B. subtilis* est utilisé pour lutter contre les pathogènes des plantes et pour augmenter la croissance de la plante. Comme les feuilles de mûrier sont utilisées pour l'élevage du ver à soie, les produits chimiques à risque pourraient être remplacés par un antagoniste comme *B. subtilis* qui est efficace et n'a pas de toxicité résiduelle.

ARTIFICIAL HATCHING OF DIAPAUSING SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) EGGS AT DIFFERENT HOURS OF OVIPOSITION THROUGH ALTERNATIVE CHEMICALS

A. Q. RATHER & M. AIJAZ*

Division of Entomology, S. K. University of Agricultural Sciences and Technology, Shalimar, Srinagar – 191 121 (J&K), India.

The uni and bi-voltine silkworm races lay kurodane eggs during spring in Kashmir. To overcome this, the egg layings belonging to six races in the age range of 3 to 27 hours were subjected to artificial treatment of six different chemicals i.e. acetic acid, cholic acid, phenol, sodium dodecyl sulphate, ariel soap and HCl as control at room temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) for 70 minutes. In summer ariel soap at 1.50% concentration induced 92.64% hatching in 23h egg age of race SK1, 97.56% at 17h in SK6 and 95.32% at 9h in Haulak. Same soap solution at 0.50% concentration induced hatching to the extent of 73.18% of 3h old eggs in Yakwei in this season. But in autumn it was effective only at 1.50% in Yakwei with 91.66% hatching in 17h aged eggs. Acetic acid at 9, 7.5 and 6% could not stimulate hatching during summer. However, in autumn its 9% induced 94.30% hatching of 13h old eggs in J112, 93.52% of 11h in Yakwei while 7.5% concentration resulted 99.10% hatching in Yakwei of 15h eggs and 6% caused 97.94% in 27h aged eggs of Haulak. 98.36% in 13h eggs of Yakwei, 62.82% of 21h old of J112. Phenol produced no effect at all but sodium dodecyl sulphate at 0.50% concentration yielded 98.51% and at 0.75% a hatching of 96.25% of 15 and 17h old eggs, respectively of Yakwei, only in autumn. Cholic acid proved ineffective in summer but during autumn at 0.50% concentration fetched 91.26% hatchability in 3 and 13h aged eggs in case of Yakwei. In the rest of the ages alternative chemicals were ineffective. Hcl (1.110 sp. gr.) induced best hatchability of 90.45% to 96.31% in all races at some ages during summer as well as in autumn. The peak rate of hatching in treated eggs was greater than diapaused eggs, which came in the range of 73.18 to 97.56% during summer and 90.30 to 99.10% during autumn. Alternative chemicals tested proved comparatively less fatal to eggs than Hcl, brought about an efficient hatching in some races and may yield better results than hydrochloric acid subject to further investigations.

Keywords: *Bombyx mori* kurodane eggs, artificial treatment, alternative chemicals, egg age, hatchability, dfl.

INTRODUCTION

Bombyx mori L. (a sericigenous insect) is utilised for commercial production of silk in many countries like Japan, China, Korea, India etc., since immemorial times. In the State of Jammu and Kashmir the uni/bivoltine silkworm races are nurtured and raised to produce quality silk fabrics. These races though producing quality silk have an inherent character of laying kurodane eggs in spring and continue to be in diapause during winter till next spring. To overcome this, eggs laid by such silkworm races require some kind of artificial treatment capable to intervene in the initiation of diapause. This will ensure consecutive rearings in a year thereby enhancing silk production. It is established that

* Division of Sericulture

hydrochloric acid or some other chemicals during treatment diffuse into the egg, inactivate the diapausing hormone secreted by the sub-oesophageal ganglion (Park and Yashitakae, 1970) and stimulate the diapausing embryo to resume further embryogenesis.

Few attempts have been made to improve techniques of artificial hatching through the use of alternative chemicals so that the growth of worms and the exploitation of silk could be increased. Considering the lacunae, investigations were oriented to test five different chemicals against kurodane eggs of six races of *B. mori* under temperate conditions of Kashmir Valley.

MATERIALS AND METHODS

Six diapausing races namely J112, J122 (Japanese), Haulak and Yakwei (Chinese) traditional races, while SKUAST-1 and SKUAST-6 (Japanese origin), newly evolved lines (Trag *et al.*, 1992) having superior economic characters over the existing Germplasm Bank of the Division of Sericulture, Mirgund (SKUAST) were selected for chemical treatments. During spring 20 dfhs of each race were incubated at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ under 80-85% relative humidity. The rearing of the worms was conducted as recommended by Krishnaswami *et al.*, (1993) for bivoltine sericulture. Each moth was allowed to oviposit on a separate card of 8×6 cm size in 3 replications from 3 to 27h, with an interval of 2h to fetch eggs of respective ages separately on each card in triplicate. Since the embryo of the silkworm starts development after 2.5h of oviposition, accordingly the zero hour for counting the age of the eggs was taken just after 2.5h. Thus eggs of 13 age groups from 3-27h of 6 strains (702 dfhs/season) in 3 replicates obtained were treated with 6.0, 7.5 and 9% acetic acid (99.7% assay); 0.5, 1.0 and 1.5% ariel soap (superior grade detergent); 2.8, 3.8 and 5.7% phenol (99.5% assay), 0.50%, 0.75% and 1.0% sodium dodecyl sulphate (85% assay) and 0.5, 1.0 and 1.5% cholic acid (98-100% assay), at room temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) for 70 minutes in glass beakers separately. The chemicals and these concentrations were selected after perusal of relevant literature and suggestions made by biochemists of the state. For hydrochloric acid (1.11 sp. gr.) treatment period (60-70 minutes) and temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) used presently was followed during the present studies.

After chemical treatment, eggs were incubated for hatching alongwith diapaused batches, of all the races for comparison purposes. Worms which hatched out on 1st and 2nd day were taken for assessing the effect of treatment at each age. To determine hatching rate and dead eggs, counting of egg shells and unhatched eggs was done manually.

RESULTS

The data presented in Table (I & II) compare the effects of alternative chemical treatments with that of diapaused eggs and hydrochloric acid as control. Only ariel soap was effective in intervening the diapause in summer season and fetched hatching percentage of 92.65 in 23h aged eggs of SK1; 95.32 in 9h old eggs of Haulak, 97.56 of 17h eggs in SK6 and 73.18 of 3h eggs in Yakwei. However, all the tested chemicals except phenol at some concentrations induced good hatchability in autumn. Acetic acid at 6% induced best hatchability of 97.94% in Haulak in 27h, 7.5% concentration induced 99.10% in 15h old eggs of Yakwei while at 9% caused 94.30% in 13h aged eggs of J112. Sodium dodecyl sulphate (0.5%) was effective on 3 and 15h old eggs of Yakwei and fetched 85.57% and 98.51% hatching, respectively. While 0.75% concentration was effective on 17h egg age in the same race and hatched 96.25% worms. Cholic acid (0.50%) was effective on 3h and 13h old eggs of Yakwei to get 91.26% hatchability in both the ages. Only one commercial race J122 did not respond to these chemicals in both the seasons. Hydrochloric acid was effective on all the 13 ages/races and induced above 90% hatching at some ages during summer as well as autumn.

During summer diapaused eggs recorded hatchability of 92.14 to 94.39% and in autumn 91.33 to 93.92% which was at par or lower than the treated eggs.

Table I. Comparative hatchability of different silkworm races through alternative chemicals and hydro-chloric acid at various ages in different seasons.

Tableau I. Ecllosion comparative de différentes races de vers à soie avec des produits chimiques alternatifs et de l'acide chlorhydrique à différents âges et différentes saisons.

Chemical	Season	Concentration (%)	Race	Age of the egg (h)*	Hatching (%)**	Dead eggs (%)**
<i>Produit chimique</i>	<i>Saison</i>			<i>Age de l'œuf (h)*</i>	<i>Ecllosion (%)**</i>	<i>Taux de mortalité des œufs (%)**</i>
Ariel soap <i>Savon</i>	Summer <i>Été</i>	0.50	Yakwei	3	73.18	10.15
			SK6	17	97.56	1.12
	Autumn <i>Automne</i>	1.50	Haulak	9	95.32	2.00
			SK1	23	92.64	1.20
			Yakwei	17	91.66	2.10
Acetic acid <i>Acide acétique</i>	Autumn <i>Automne</i>	6.00	Haulak	27	97.94	1.10
			Yakwei	13	98.36	1.00
			J112	21	62.82	2.00
		7.50	Yakwei	15	99.10	0.50
			J112	13	94.30	1.25
			Yakwei	11	93.52	3.85
Sodium Dodecyl sulphate <i>Dodécylsulfate de sodium</i>	Autumn <i>Automne</i>	0.50	Yakwei	3	85.57	7.33
			Yakwei	15	98.51	1.50
		0.75	Yakwei	17	96.25	1.15
Cholic acid <i>Acide cholique</i>	Autumn <i>Automne</i>	0.50	Yakwei	3	91.26	5.00
			Yakwei	13	91.26	2.25
Phenol						
Hydrochloric acid <i>Acide chlorhydrique</i>	Summer <i>Été</i>	1.110 sp. gr. <i>densité 1,110</i>	Yakwei	3	79.73	15.27
			-do-	21	95.36	1.00
			SK6	17	95.79	3.12
			-do-	21	97.21	1.10
			Haulak	9	73.15	7.85
			-do-	21	95.03	1.80
			SK1	23	93.16	1.95
			-do-	21	95.03	1.50
			J112	21	95.06	2.27
			J122	21	92.07	1.70
	Autumn <i>automne</i>	1.110 sp. gr. <i>densité 1,110</i>	Yakwei	17	95.46	3.12
			Yakwei	13	85.71	1.00
			Yakwei	15	90.45	6.15
			Yakwei	11	75.17	9.10
			Yakwei	3	29.98	22.15
			Yakwei	21	97.87	1.50
			Haulak	21	96.71	1.95

Table I. (Continued).

Tableau I. (Suite).

Chemical	Season	Concentration (%)	Race	Age of the egg (h)*	Hatching (%)**	Dead eggs (%)**
<i>Produit chimique</i>	<i>Saison</i>			<i>Age de l'œuf (h)*</i>	<i>Éclosion (%)**</i>	<i>Taux de mortalité des œufs (%)**</i>
Hydrochloric acid <i>Acide chlorhydrique</i>	Autumn <i>automne</i>	1.110 sp. gr. <i>densité 1,110</i>	J112 SK1 SK6 J112	21 19 19 19	96.31 96.37 97.38 96.64	2.95 3.27 2.17 4.70

* Zero hour counted after 2.5 hours of egg age / L'heure zero est prise en compte quand l'œuf est âgé de 2,5 heures.

** Values are actual % values / Les valeurs sont des valeurs de pourcentage réel.

Note: In case of alternative chemicals only those ages indicated where hatching was recorded / Dans le cas de produits chimiques alternatifs, l'éclosion n'a été enregistrée que quand l'âge est indiqué.

Table II. Percentage hatchability and dead eggs of different silkworm races in different seasons after diapause.

Tableau II. Pourcentage d'éclosion et de mortalité des œufs de différentes races après la diapause pendant différentes saisons.

Race	Hatching (%)		Dead eggs (%)	
	Summer	Autumn	Summer	Autumn
	<i>Été</i>	<i>Automne</i>	<i>Été</i>	<i>Automne</i>
<i>Race</i>	<i>Éclosion (%)</i>		<i>Mortalité des œufs (%)</i>	
SK1	92.14	93.25	3.00	2.15
SK6	93.25	93.90	2.25	2.20
Haulak	94.13	91.33	2.99	3.10
Yakwei	94.39	91.67	2.85	2.85
J112	94.32	93.92	2.45	2.90
J122	93.14	93.96	2.85	3.00

The percentage of dead eggs was higher at lower ages both in alternative chemicals and hydrochloric acid batches, but comparatively in case of latter treatment percentage of dead eggs came much higher at all ages. Under ariel soap treatment dead eggs of different races came in the range of 1.12 to 10.15% during summer and 2.10% in case of Yakwei, during autumn. Acetic acid treated batches recorded 0.50 to 3.85% dead eggs in different races during autumn. In Yakwei dead eggs were in the range of 1.15 to 7.33% and 2.25 to 5% under sodium dodecyl sulphate and cholic acid treatments, respectively. The diapaused batches recorded 2.25 to 3% dead eggs during summer and 2.15 to 3.10% during autumn among the six races studied.

DISCUSSION

During the autumn season cold acid treatment with acetic acid induced best hatchability in Haulak, Yakwei and J112 while cholic acid induced good hatchability in Yakwei, but in summer they produced no stimulus. The differential response of races to some acids in preventing the diapause in different environment has also been reported earlier (Anonymous, 1975). The possible reason seems that the chorion of bivoltine eggs in tropical areas is much thinner than that of uni/bivoltine races of Chinese and Japanese origin having tolerance towards the higher concentration of acid and long treatment duration. The concentration applied during the present studies could not probably break the oxygen barrier and enhance water permeability of chorion to induce hatchability as found by Singh and Shukla, 1992. Kumaraswamy (1987) after treating the eggs of NB18 race with nitric acid, sulphuric acid (1.07 sp. gr) and glacial acetic acid (1.05 sp. Gr) at 46.1° C for 4 minutes recorded 96.8-98.8% hatching in this race. However, in the present study 62.82 to 99.10% hatchability was induced by acetic acid treatment in some races at some ages during autumn at room temperature. Swamy *et al.*, (1990) also applied acetic acid (100%) to diapausing eggs at 46.1° C for 5 minutes and observed no anti-diapausing effect, it obviously killed the eggs.

Ariel soap induced 73.18, 95.32, 97.56 and 92.64% hatchability in 3, 9, 17 and 23h aged eggs of Yakwei, Haulak, SK6 and SK1 races in summer season, respectively and 91.66% in 17h age of Yakwei during autumn season. Detergent soap (1g/ 100 ml) and surf (5g/100ml) have been tried before but these did not yield any result while, bleaching powder displayed approximately equal hatching of 41.80% as that of eggs diapaused (48.64%) in bivoltine eggs (Swamy *et al.*, 1990). In the present studies ariel soap was effective against some races and yielded efficient hatchability in summer but was effective against only one race in autumn thereby indicating that racial factors lay profound influence on the action of various chemicals in intervening the diapause.

Sodium dodecyl sulphate showed no anti diapausing activity in summer, however, in autumn 0.50 and 0.75% concentration caused 96.25 and 98.52% hatchability in 17 and 15h ages of Yakwei, respectively. The higher concentration of this chemical may provide the satisfactory hatching under cold treatment in different races as 2% sodium dodecyl sulphate has yielded more than 90% hatching at 46.1° C as reported by Swamy *et al.*, (1990). Moreover, it seems that chorion of eggs in Yakwei is quite thinner than other races, because its eggs hatched out at number of ages and concentrations of various chemicals.

The results demonstrated that treatment with chemicals other than hydrochloric acid can prevent the onset of diapause in eggs of *Bombyx mori* as they induced efficient hatchability in some races and recorded mortality within tolerable limits. There are other advantages also in their use as they are not corrosive or injurious to the persons handling them besides being costwise cheaper than hydrochloric acid and less toxic to eggs. Acetic acid and ariel soap especially showed promising results and can replace hydrochloric acid subject to further studies.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors express gratitude to the Head Divisions of Entomology and sericulture, SKUAST for providing the facilities. Sincere thanks also offered to Dr R. M. Dullo, Biochemistry Section, F.V. Sc. Shuhama, SKUAST and Scientists of Post Graduate Dept. Of Biochemistry, University of Kashmir for guidance in the selection of alternate chemicals / concentrations for the present studies.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Text Book of Tropical Sericulture, Japan Overseas Co-operation Volunteers, Japan.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M. N., SURAYANARAYAN S. K., KUMARAJ S. (1973) Sericultural manual 2-silkworm Rearing, FAO of the United Nations, Rome.
- KUMARASWAMY H. T. (1987) Investigations on some methods of artificial hatching of silkworm *B. mori* L. eggs. Thesis accepted for P. G. Degree in the University of Agricultural Sciences, Bangalore.
- PARK F., YASHITAKAE N. (1970) Function of embryo and silkworm egg *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol., 16: 2223-2230.
- SINGH K., SHUKLA G. S. (1992) Ready reckoner for hydrochloric acid treatment of silkworm eggs of weak diapause characters. Sericologia, 32(1): 51-56.
- SWAMY M. T., URS K. C. D., KRISHNAMOORTHY R. U. (1990) Alternative Chemicals for the acid treatment of bivoltine silkworm (*B. mori* L.) eggs. Sericologia, 30(2): 189-195.
- TRAG A. R., KAMILI A. S., MALIK G. N., KOKILOO F. A. (1992) Evolution of high yielding bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotype. Sericologia, 32(2): 321-324.

ECLOSION ARTIFICIELLE D'ŒUFS DE VERS A SOIE DIAPAUSANTS (*BOMBYX MORI* L.) PLUSIEURS HEURES APRES LA PONTE PAR UTILISATION DE PRODUITS CHIMIQUES ALTERNATIFS

A.Q. RATHER & M. AIJAZ*

Division of Entomology, S. K. University of Agricultural Sciences and Technology, Shalimar,
Srinagar – 191 121 (J & K), Inde.

Au Cachemire les races de vers à soie mono et bivoltines pondent des œufs diapausants au printemps. Pour faire face à cela, des pontes de six races âgées de 3 à 27 heures ont reçu un traitement artificiel à température ambiante ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) pendant 70 minutes avec six produits chimiques différents : l'acide acétique, l'acide cholique, le phénol, le dodécylsulfate de sodium, le savon et de l'HCl comme témoin. En été, le savon à une concentration de 1,50 % induit 92,64 % d'éclosion chez les œufs de 23 h de la race SK1, 97,56 % chez les œufs de 17 h de SK6 et 95,32 % chez les œufs Haulak de 9 h. La même solution de savon à une concentration de 0,50 % induit une éclosion de 73,18 % chez des œufs de 3h de la race Yakwei pendant cette saison. Mais en automne, il est efficace seulement à 1,50 % chez Yakwei avec 91,66 % d'éclosion d'œufs âgés de 17h. L'acide acétique à 9, 7,5 et 6 % ne peut pas stimuler l'éclosion pendant l'été. Cependant, en automne à 9 %, il induit 94,30 % d'éclosion chez les œufs de 13 h de J112, 93,52 % chez les œufs de 11 h de Yakwei, tandis qu'une concentration à 7,5 % donne 99,10 % d'éclosion chez les œufs de Yakwei de 15 h et à 6 % elle donne 97,94 % chez les œufs Haulak de 27h, 98,36 % chez les œufs Yakwei de 13h, 62,82 % chez les œufs de J112 de 21h. Le phénol n'a aucun effet mais le dodécylsulfate de sodium à une concentration de 0,50 % donne 98,51 % d'éclosion et à 0,75 % une éclosion de 96,25 % chez les œufs de Yakwei respectivement de 15 et 17 h mais seulement en automne. L'acide cholique s'avère inefficace en été mais pendant l'automne, à une concentration de 0,50 %, il donne 91,26 % d'éclosion chez les œufs de Yakwei de 3 et 13 h. Les produits chimiques alternatifs sont inefficaces à d'autres âges. L'HCl (densité 1,110 sp. gr) donne une éclosion record entre 90,45 % à 96,31 % chez toutes les races pour certains âges pendant l'été et aussi en automne. Le pic d'éclosion chez les œufs traités est plus élevé que chez les œufs diapausants, il est compris entre 73,18 et 97,56 % pendant l'été et entre 90,30 et 99,10 % pendant l'automne. Les produits chimiques alternatifs testés s'avèrent comparativement moins néfastes que l'HCl, donnent une éclosion efficace chez certaines races et pourraient donner de meilleurs résultats que l'acide chlorhydrique, si tant est que des recherches supplémentaires soient entreprises.

INTRODUCTION

Bombyx mori L. (insecte séricigène) est utilisé pour la production commerciale de soie dans de nombreux pays comme le Japon, la Chine, la Corée, l'Inde depuis des temps immémoriaux. Dans l'état du Jammu et Cachemire, les races de vers à soie mono/bivoltines sont nourries et élevées pour donner des tissus de soie de qualité. Bien que ces races produisent de la soie de qualité elles ont comme caractère inhérent la ponte d'œufs diapausants au printemps et elles continuent à être en diapause

* Département Séricicole

pendant l'hiver jusqu'au printemps suivant. Pour faire face à cela, les œufs pondus par ces races de vers à soie doivent recevoir un traitement artificiel pouvant intervenir au début de la diapause. Cela permet d'assurer des élevages consécutifs dans l'année, ce qui augmente la production de soie. On sait que l'acide chlorhydrique et d'autres produits chimiques diffusent dans l'œuf pendant le traitement, inactivent l'hormone de diapause sécrétée par le ganglion suboesophagien (Park et Yashitakac, 1970) et stimulent l'embryon en diapause pour qu'il reprenne son embryogenèse.

Peu d'essais ont été faits pour améliorer les techniques d'éclosion artificielle en utilisant des produits chimiques alternatifs pour que la croissance des vers à soie et l'exploitation de soie augmentent. Compte tenu de ces lacunes, nos recherches ont consisté à tester cinq produits chimiques différents sur six races de *B. mori* dans les conditions tempérées de la vallée du Cachemire.

MATERIELS ET METHODES

Six races à diapause, en l'occurrence les races traditionnelles J112, J122 (japonaises), Haulak et Yakwei (chinoises) et les races nouvellement mises au point SKUAST-1 et SKUAST-6, origine japonaise (Trag et coll., 1992) ayant des caractères économiques supérieurs à celles existant au Centre de Germoplasmes du Département Séricicole de Mirgund (SKUAST) ont été choisies pour les traitements chimiques. Au printemps, 20 pontes saines de chaque race ont été incubées à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et 80 à 85 % d'humidité relative. L'élevage des vers a été réalisé d'après les recommandations de Krishnaswami et coll., (1993) pour la sériciculture bivoltine. On a laissé chaque papillon pondre sur un carton séparé de 8×6 cm avec 3 répétitions de 3 à 27 h, avec un intervalle de 2 h pour obtenir des œufs aux âges respectifs séparément sur chaque carton en triple exemplaire. Comme l'embryon du ver à soie commence son développement 2,5 h après la ponte, en conséquence l'heure zéro pour calculer l'âge de l'œuf a été prise juste après 2,5 h. Ainsi, les œufs de 13 groupes d'âge entre 3 et 27 h provenant de 6 souches (702 pontes saines/saison) en 3 répétitions ont été traités avec de l'acide acétique à 6, 7,5 et 9 % (dosage à 99,5 %), avec du savon (détergent de grade supérieur) à 0,5, 1 et 1,5 % ; avec du phénol à 2,8, 3,8 et 5,7 % (dosage à 99,7 %) ; avec du dodécylsulfate de sodium à 0,5 %, 0,75 % et 1 % (dosage à 85 %) et avec de l'acide cholique à 0,5, 1 et 1,5 % (dosage entre 98 et 100 %) séparément dans des fioles en verre à température ambiante ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) pendant 70 minutes. Les produits chimiques et ces concentrations ont été choisis après avoir consulté la littérature appropriée et recueilli les suggestions faites par les biochimistes de l'état. Pour l'acide chlorhydrique (densité 1,11) la durée de traitement (60 à 70 minutes) et la température ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) utilisées à l'heure actuelle ont été conservées pour les études.

Après le traitement chimique, les œufs de toutes les races sont incubés et comparés avec les lots à diapause. Les vers qui éclosent les 1^{er} et 2^{ème} jours ont été pris pour évaluer l'effet du traitement à chaque âge. Pour déterminer le taux d'éclosion et de mortalité des œufs, on a compté manuellement le nombre de coques d'œufs et d'œufs n'ayant pas éclos.

RESULTATS

Les données présentées dans les Tableaux I & II comparent les effets des traitements chimiques alternatifs avec les œufs à diapause et avec le traitement à l'acide chlorhydrique qui sert de témoin. Seul le savon est efficace sur la diapause en été et donne un taux d'éclosion de 92,65 % chez des œufs de SK1 âgés de 23h ; de 95,32 % chez des œufs Haulak de 9h, de 97,56 % chez des œufs SK6 de 17 h et de 73,18 % chez les œufs Yakwei de 3h. En automne, cependant, tous les produits chimiques testés, à l'exception du phénol à certaines concentrations, induisent une bonne éclosion. L'acide acétique à 6 % induit une éclosion record de 97,94 % chez Haulak à 27 h, une concentration à 7,5 % induit 99,10 % chez les œufs de Yakwei de 15 h tandis qu'à 9 %, il donne 94,30 % chez les œufs de J112 de 13 h. Le dodécylsulfate de sodium (à 0,5 %) est efficace chez les œufs de Yakwei de 3 et 15 h et donne 85,57 % et 98,51 % d'éclosion respectivement. Une concentration à 0,75 % est efficace sur les

œufs de 17 h de la même race et donne 96,26 % d'éclosion. L'acide cholique (à 0,50 %) est efficace sur les œufs de Yakwei de 3h et 13h et donne 91,26 % d'éclosion aux deux âges. Seule une race commerciale J122 ne répond pas à ces produits chimiques pendant les deux saisons. L'acide chlorhydrique est efficace sur les 13 âges/races et induit plus de 90 % d'éclosion à certains âges l'été et l'automne.

Pendant l'été, les œufs diapausants donnent une éclosion entre 92,14 et 94,39 % et en automne de 91,33 à 93,92 % ; leur taux d'éclosion est égal ou inférieur à celui des œufs traités. Le pourcentage de mortalité est plus élevé chez les œufs les plus jeunes à la fois chez les lots traités aux produits chimiques alternatifs et chez ceux traités à l'acide chlorhydrique, mais comparativement dans le dernier cas le pourcentage de mortalité des œufs est beaucoup plus élevé à tous les âges. Avec le traitement au savon, la mortalité des œufs des différentes races est comprise entre 1,12 et 10,15 % pendant l'été et s'élève à 2,10 % pour Yakwei en automne. En automne les lots traités à l'acide acétique ont une mortalité entre 0,50 et 3,85 % chez les différentes races. Chez Yakwei, la mortalité des œufs est comprise respectivement entre 1,15 et 7,33 % et entre 2,25 et 5 % avec le dodécylsulfate de sodium et l'acide cholique. Les lots à diapause enregistrent entre 2,25 et 3 % de mortalité pendant l'été et entre 2,15 et 3,30 % pendant l'automne chez les six races étudiées.

DISCUSSION

Pendant l'automne, le traitement froid à l'acide avec de l'acide acétique donne la meilleure éclosion chez Haulak, Yakwei et J112 et l'acide cholique induit une bonne éclosion chez Yakwei, mais en été ils ne produisent pas de stimulation. On a déjà observé que, dans un environnement donné, la réponse des races à certains acides empêchant la diapause est différente (Anonyme, 1975). Une des raisons possibles semble être que le chorion des œufs bivoltins dans les zones tropicales est beaucoup plus fin que celui des races mono/bivoltines d'origine chinoise et japonaise, qui tolèrent une concentration plus importante en acide et une durée de traitement plus longue. La concentration appliquée dans cette étude n'a probablement pas pu rompre la barrière d'oxygène et renforcer la perméabilité à l'eau du chorion pour induire l'éclosion comme l'ont observé Singh et Shukla, 1992. Kumaraswamy (1987) après avoir traité les œufs de la race NB18 avec de l'acide nitrique, de l'acide sulfurique (densité 1,07) et de l'acide acétique glacée (densité 1,05) à 46,1° C pendant 4 minutes a enregistré de 96,8 à 98,8 % d'éclosion chez cette race. Cependant, dans notre étude une éclosion de 62,82 à 99,10 % a été induite pendant l'automne avec le traitement à l'acide acétique à température ambiante chez certaines races et pour certains âges. Swamy et coll., (1990) ont aussi appliqué de l'acide acétique (à 100 %) à des œufs diapausants à 46,1° C pendant 5 minutes et n'ont observé aucun effet anti-diapause, cela avait évidemment tué les œufs.

Le savon induit 73,18 ; 95,32 ; 97,56 et 92,64 % d'éclosion chez les œufs âgés respectivement de 3, 9, 17 et 23 h des races Yakwei, Haulak, SK6 et SK1 pendant l'été et 91,66 % chez Yakwei âgé de 17 h pendant l'automne. On a déjà essayé le savon (1g/ 100 ml) et la mousse détergente (5g/100ml) auparavant mais ceci n'avait pas donné de résultats tandis que la poudre de chlore a donné une éclosion d'environ 41,80 % égale à celle des œufs diapausants (48,64 %) chez des œufs bivoltins (Swamy et coll., 1990). Dans nos études, le savon est efficace chez certaines races et donne une bonne éclosion en été mais il n'est efficace que chez une race en automne, ce qui indique que les facteurs de race ont une profonde influence sur l'action des produits chimiques intervenant sur la diapause.

Le dodécylsulfate de sodium n'a pas d'action anti-diapause en été, cependant, en automne une concentration à 0,50 et 0,75 % donne respectivement une éclosion de 96,25 et de 98,52 % chez Yakwei à l'âge de 17 h et 15 h. Une concentration plus élevée de ce produit chimique pourrait donner une éclosion satisfaisante avec un traitement à froid chez plusieurs races puisque du dodécylsulfate de sodium à 2 % donne plus de 90 % d'éclosion à 46,1° C, comme l'ont observé Swamy et coll., (1990). De plus, il semble que le chorion des œufs de Yakwei soit bien plus fin que celui des autres races

parce que ses œufs éclosent à de nombreux âges et avec des concentrations diverses de plusieurs produits chimiques.

Les résultats prouvent que le traitement avec les produits chimiques autres que l'acide chlorhydrique peut empêcher le déclenchement de la diapause chez les œufs de *Bombyx mori* puisqu'ils induisent une éclosion efficace chez certaines races et que les taux de mortalité restent dans des limites tolérables. Leur utilisation présente d'autres avantages puisqu'ils ne sont pas corrosifs ou nuisibles aux personnes qui les manipulent, sont moins chers que l'acide chlorhydrique et moins toxiques pour les œufs. L'acide acétique et le savon surtout, donnent des résultats prometteurs et pourraient remplacer l'acide chlorhydrique sous réserve d'études supplémentaires.

STUDIES ON THE LIGHT AND WATER CONTENT OF ARTIFICIAL DIET FOR SILKWORM, *BOMBYX MORI* REARING

MIAO YUNGEN

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

We studied the effects of the light and water content of artificial diet rearing on the growth and development of silkworm, *Bombyx mori* L. The results showed: Treatment with 16h light and 8h dark in rearing period was suitable to the silkworm growth; 68-72% of water content in artificial diet is suitable.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., artificial diet rearing, light, water content of diet.

INTRODUCTION

The artificial diet rearing of silkworm, *Bombyx mori* was started from 1960s, it was an important breakthrough in sericultural techniques and provides a new path to keep up with the sericultural development. It has taken a long time to use artificial diet rearing in rural sericultural practice because this technique needs strict rearing conditions. In this report, we studied the light in the rearing room and the water content of artificial diet, in order to provide the basic requirements for formulating the rearing standards suitable to production demands.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm races:

We used the hybrid silkworm: Qingsong × Haoyue, supplied by the Sericultural Department of Zhejiang Agricultural Bureau.

Artificial diet making-up:

One day before collecting the newly hatched larvae, the diet was prepared by mixing completely the diet ingredients according to the composition with 30% of mulberry leaf powder and 6% of carragenan as coagulating agent. Three times the amount of water was added to the diet powder and mixed homogeneously. The amount of water was varied suitably according to the water content of diet when the water content was varied. The mixed wet diet was spread on the rearing dish and the diet was cooked for 35 min. in 100° C, then the dish with diet was cooled at room temperature.

Rearing methods:

The new hatched larvae were kept on the spread artificial diet directly, and the diet was given once to every instar. Silkworms were mass reared by following rearing standards upto the third instar. Each test group consisted of three replications, each of 150 larvae for each treatment.

Rearing conditions:

The artificial diet rearing was conducted for 1~2 instars : 28-29° C, 85-90% RH for the first instar; 28° C, 80-85% RH for the 2nd instar. After the 3rd instar, the silkworm was reared with standard mulberry leaf rearing.

The light test was made during artificial diet rearing in 1~2 instars. The circadian rhythm was divided A: full light, B: full dark, C:16h light 8h dark, D:8h light 16h dark, E:12h light 12h dark with light intensity of 2000~2500lux.

Silkworm eggs disinfection:

The eggs were treated with 4% formaldehyde for 15 minutes and then with 95% alcohol for 1 minute at 1 day before hatching.

Investigation items:

Setae dispersion of silkworm, 24h or 48h after hatching; survival rate; rate of newly molted silkworm; body weight of 1st or 2nd molting silkworm; development speed: the target instar silkworm ratio in decided time. The formula was:

Development speed =

$$\frac{\text{Target instar worm number} \times 50 + \text{target instar molting worm number} \times 100 + \text{next instar worm number} \times 150}{\text{Total worm number in decided time}}$$

RESULTS

The effects of different light circadian rhythm on the growth and development of young silkworm:

The test was divided A: full light, B: full darkness, C:16h light 8h dark, D:8h light 16h dark, E:12h light 12h dark. The results were showed in Table I.

As seen in Table I (A), long light treatment was better in the setae dispersion and the body weight of molting silkworm larvae. Among them the 16h light and 8h dark was best; survival rate of the 2nd instar or the 3rd instar was better in C treatment; on the other hand, the development speed and the rate of newly molted larvae were better with the dark rearing. The results showed the light is beneficial to body weight growth and healthiness, whereas, the rearing in the dark was beneficial to the silkworm development.

The effects of diet water content on the growth and development:

The artificial diet has commonly a water content of about 75% that is in accordance with the water content of mulberry leaf. In this test, we made the artificial diet with different water contents and the rearing dish was covered with a polyethylene film for avoiding water evaporation. The test showed the water content of artificial diet has significant effects on the growth and development of silkworm. If the water content is too low, it will cause the diet to dry, and harden and it will affect the feeding of silkworm; if the water is too high, the diet will be humid and soft, the silkworm can easily drown and die.

Table 1. The effects of light on the growth and development of young silkworm.

Tableau 1. Effets de la lumière sur la croissance et le développement du jeune ver à soie.

Treatment	Setae (%) dispersion		Weight of molting larvae (g/larva)		Survival rate (%)		Rate of new molted larvae (%)		Developing speed	
	24h	48h	1 st instar	2 nd instar	102h	216h	2 nd instar (102h)	3 rd instar (216h)	1 st instar (102h)	2 nd instar (216h)
Traitement	Dispersion des soies (%)		Poids des larves muées (g/larve)		Taux de survie (%)		Taux de larves nouvellement muées (%)		Vitesse de développement	
	24h	48h	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge	102 h	216 h	2 ^{ème} âge (102 h)	3 ^{ème} âge (216 h)	1 ^{er} âge (102 h)	2 ^{ème} âge (216 h)
A	69.80	84.70	0.0055	0.0192	87.10	79.82	5.90	0	68.50	57.21
B	54.30	83.50	0.0050	0.0150	94.56	70.90	49.42	44.22	105.41	102.76
C	81.61	90.85	0.0053	0.0173	96.06	84.62	14.30	32.14	89.06	96.06
D	65.58	85.78	0.0048	0.0142	90.56	68.75	43.77	42.05	100.37	101.26
E	65.98	78.92	0.0049	0.0155	82.35	93.80	43.65	27.70	100.18	97.82

The above test was conducted under the condition of dark rearing, as seen in the Table II, the body weight of molting larvae, survival, rate of newly molted larvae and the development speed were best when the diet water content was 68-72%; above 72%, the growth of young silkworm was worse.

DISCUSSION

The light condition affected the growth and development of young silkworm. 16 h light-8 h dark rearing was best. The light is essential to biosynthesise the red fluorescence protein (RFP) that is a substance to resist virus infections, but on the other hand, the light will cause the deoxidizing of lipid in artificial diet and will lower the diet efficiency; the silkworms will not be even in the rearing bed and it will affect the feeding and the development uniformity. Considering the above factors, dark rearing is suitable in the practical artificial diet rearing.

A diet water content of 68-72% was good in this test. But it should be changed according to the rearing conditions, different shaping materials and its quantity, content of mulberry leaf powder, soybean powder and corn meal etc.

The artificial diet rearing of silkworm is a new path for the sericultural industry in the future. It will be essential to study the polyphagous silkworm strains breeding, low cost diet ingredients and a suitable practical rearing technique.

Table II. The effects of diet water content on the growth and development.

Tableau II. Effets de la teneur en eau du milieu sur la croissance et le développement.

Water content (%)	Setae dispersion (%)	Weight of molting larvae (g/larva)		Survival (%)		Rate of newly molted larvae (%)		Development speed	
		1 st instar	2 nd instar	96 h	192 h	2 nd instar	3 rd instar	1 st instar	2 nd instar
		Poids des larves muantes (g/larve)		Survie (%)		Taux de larves nouvellement muées		Vitesse de développement	
Teneur en eau (%)	Dispersion des soies	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge	96 h	192 h	2 ^{ème} âge	3 ^{ème} âge	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge
60	89.87	0.0040	0.0163	94.87	61.58	35.71	5.14	97.53	64.73
62	90.51	0.0045	0.0167	95.19	78.52	37.31	5.30	99.18	63.76
64	94.47	0.0048	0.0180	95.56	78.47	55.47	7.83	114.20	71.53
66	92.76	0.0050	0.0185	96.97	80.35	58.35	9.29	117.23	69.45
68	96.79	0.0060	0.0195	98.33	80.72	66.03	18.43	127.26	85.91
70	97.65	0.0055	0.0192	99.40	82.66	74.00	16.03	132.54	84.36
72	98.07	0.0055	0.0187	98.70	81.23	66.60	15.87	129.03	80.95
74	96.72	0.0055	0.0186	97.41	68.72	59.14	14.77	119.30	80.49
76	98.61	0.0050	0.0183	95.31	55.44	61.94	11.03	122.20	82.34
78	92.63	0.0047	0.0179	92.16	35.69	31.69	6.00	93.87	75.69

REFERENCES

- MIAO YUNGEN, XU JUNLIANG, WU XIAOFENG (1994): practical studies of artificial diet rearing of silkworm, *Bombyx mori* L. Bulletin of sericulture Zhejiang, 25(2): 12-14
- CAI YOUJING, WANG HONGLING LI SUZHEN (1980): Studies on the artificial diet rearing. Sericultural Science China:6(2)(3)
- LI XIUYAN et al. (1995) Studies on the effects of light period to the artificial diet rearing of young silkworm. Bulletin of Sericulture Zhejiang, 26 (2): 32-34
- MIAO YUNGEN (1998) Artificial diet rearing of silkworm in China. Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol.2 (2): 48-49
- MIAO YUNGEN, J. Lijun and S. Kumar (1999) Studies on the ingredient of artificial diet for silkworm, *Bombyx mori* L. Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol.3 (1): 63-66

ETUDES DE L'EFFET DE LA LUMIERE ET DE LA TENEUR EN EAU DE L'ALIMENT ARTIFICIEL SUR L'ELEVAGE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI*

MIAO YUNGEN

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

*Nous avons étudié les effets de la lumière et de la teneur en eau de l'alimentation artificielle sur la croissance et le développement du ver à soie, **Bombyx mori** L. Les résultats montrent que 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et une teneur en eau du milieu artificiel de 68 à 72 % pendant la période d'élevage conviennent à la croissance du ver à soie.*

INTRODUCTION

L'élevage du ver à soie, *Bombyx mori* sur milieu artificiel a commencé à partir des années soixante, c'était une découverte importante pour la sériciculture qui a offert de nouvelles possibilités pour son développement. Cela a pris beaucoup de temps pour utiliser l'aliment artificiel dans les exploitations séricicoles rurales parce que la technique nécessite des conditions d'élevage strictes. Dans ce rapport, nous avons étudié les conditions de lumière dans la pièce d'élevage et la teneur en eau du milieu artificiel de manière à formuler des normes d'élevage convenant aux demandes de la production.

MATERIELS ET METHODES

Races de vers à soie :

Nous avons utilisé le ver à soie hybride Qingsong × Hoyue fourni par le Département Séricicole du Bureau Agricole de Zhejiang.

Composition du milieu artificiel :

Le milieu est préparé en mélangeant bien les ingrédients composant le milieu avec 30 % de poudre de feuilles de mûrier et 6 % de carraghénine comme agent de coagulation un jour avant d'obtenir des larves nouvellement écloses. On a ajouté trois fois le volume d'eau à la poudre et on l'a mélangée de manière homogène. Le volume d'eau est modifié en fonction de la teneur en eau désirée dans le milieu. Le milieu mélangé et mouillé est étalé sur un plateau d'élevage et cuit pendant 35 minutes à 100° C, puis le milieu est refroidi à température ambiante.

Méthodes d'élevage :

Les larves nouvellement écloses sont déposées directement sur le milieu artificiel étalé, et on leur donne du milieu une fois à chaque âge. Les vers à soie sont élevés en masse en suivant les normes d'élevage jusqu'au troisième âge. Chaque groupe comprend trois répétitions de 150 larves pour chaque traitement.

Conditions d'élevage :

On a recours à l'élevage sur milieu artificiel aux 1^{er} et 2^{ème} âges : 28-29° C, 85-90 % HR pour le premier âge ; 28° C, 80-85 % H. R. pour le 2^{ème} âge. Après le 3^{ème} âge, le ver à soie est élevé avec des feuilles de mûrier.

Le test de lumière est réalisé pendant l'élevage sur milieu artificiel aux premier et 2^{ème} âges. Le rythme circadien est divisé comme suit : A : lumière totale, B : obscurité totale, C : 16 h de lumière 8 h d'obscurité, D : 8 h de lumière 16 h d'obscurité, E : 12h de lumière 12 h d'obscurité avec une intensité de lumière de 2000 –2500 lux.

Désinfection des œufs de ver à soie :

Les œufs sont traités avec 4 % de formaldéhyde pendant 15 minutes et puis avec 95 % d'alcool pendant 1 minute 1 jour avant l'éclosion.

Paramètres étudiés :

La dispersion des soies sur les larves 24 h ou 48 h après l'éclosion ; le taux de survie ; le taux de mue ; le poids de la larve après la 1^{ère} ou la 2^{ème} mue ; la vitesse de développement ; le ratio de vers à soie pour l'âge ciblé au moment choisi. La formule est :

Vitesse de développement =

$$\frac{\text{Nombre de vers pour l'âge visé} \times 50 + \text{nombre de vers en mue pour l'âge ciblé} \times 100 + \text{nombre de vers pour l'âge suivant} \times 150}{\text{Nombre total de vers au moment choisi}}$$

RESULTATS

Effets des différents rythmes circadiens sur la croissance et le développement des jeunes vers à soie :

Le test est divisé comme suit A : lumière totale, B : obscurité totale, C : 16 h de lumière 8 h d'obscurité, D : 8h de lumière 16 h d'obscurité, E : 12 h de lumière 12 h d'obscurité. Les résultats sont présentés dans le Tableau I.

Comme le montre le Tableau I (A), le traitement avec le plus de lumière est le meilleur pour la dispersion des soies et le poids des larves à la mue. Les meilleurs résultats sont obtenus avec 16h de lumière et 8h d'obscurité; le taux de survie du 2^{ème} âge ou du 3^{ème} âge est meilleur avec le traitement C ; d'autre part, la vitesse de développement et le taux de larves nouvellement muées sont meilleurs avec l'élevage à l'obscurité. Les résultats montrent que la lumière est bénéfique pour la croissance du poids et la robustesse tandis que l'élevage à l'obscurité est meilleur pour le développement du ver à soie.

Effets de la teneur en eau du milieu sur la croissance et le développement :

Le milieu artificiel a en général une teneur en eau d'environ 75 % comme la feuille de mûrier. Dans ce test, nous avons composé un milieu artificiel avec différentes teneurs en eau et le plateau d'élevage a été recouvert avec un film de polyéthylène pour éviter l'évaporation de l'eau. Le test montre que la teneur en eau du milieu artificiel a des effets significatifs sur la croissance et le développement du ver à soie. Si la teneur en eau est trop faible, cela dessèche et durcit le milieu et cela a un effet sur l'alimentation du ver à soie ; s'il y a trop d'eau, le milieu est humide et mou et le ver à soie peut facilement se noyer.

Le test ci-dessus a été réalisé dans les conditions d'obscurité présentées dans le Tableau II, le poids du corps des larves muées, le taux de survie, le taux de larves nouvellement muées et le taux de développement sont meilleurs quand la teneur en eau du milieu est de 68 à 72 % ; au-delà de 72 %, la croissance des vers à soie est moins bonne.

DISCUSSION

Les conditions de lumière ont un effet sur la croissance et le développement du jeune ver à soie. L'élevage avec 16h de lumière et 8h d'obscurité donne les meilleurs résultats. La lumière est essentielle pour biosynthétiser la protéine fluorescente rouge (RFP) qui est une substance permettant de résister aux infections des virus, mais d'autre part, la lumière entraîne la désoxydation des lipides du milieu artificiel et diminue l'efficacité du milieu ; les vers à soie dans la litière sont inégaux et cela a des effets sur l'uniformité du développement. Compte tenu de ces éléments, de manière pratique, l'élevage dans l'obscurité convient au ver à soie.

Un milieu avec une teneur en eau de 68 à 72 % est bon. Mais, la teneur en eau doit être changée en fonction des conditions d'élevage, des différents types de matériau, de la quantité, et de la teneur en poudre de feuilles de mûrier, en poudre de soja et en poudre de maïs etc.

L'élevage des vers à soie sur milieu artificiel offre une nouvelle voie pour l'avenir de l'industrie séricicole. Il sera essentiel d'étudier l'élevage de souches de vers à soie polyphages et de trouver des ingrédients bon marché pour le milieu et une technique d'élevage pratique et adaptée.

EVOLUTION OF NEW PRODUCTIVE BIVOLTINE HYBRID, CSR3 × CSR6

R. K. DATTA, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR,
M. M. AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU

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

Earlier breeding experiments (1970's) have yielded productive hybrids with a cocoon shell ratio of 18% at commercial level. These hybrids have not made much impact in the field. There is a need to shift production to superior quality and quantity of silk. The experience with bivoltine silk production, on the whole is not very encouraging. Farmers have not realized bivoltine hybrid rearing as very remunerative and rewarding. Keeping this in view, reorientation in breeding approaches has been envisaged. Of late, the adoption of bivoltine sericulture in India gathered momentum being armed with the evolution of a good number of robust and productive bivoltine breeds/hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. for tropical conditions.

The breeding work was initiated in this Institute by utilising two Japanese hybrids namely BN18 × BCS25 and Shunrei × Shogetsu along with Indian evolved breed, CC1. The breed CSR3 which is characterised with sex-limited larval marking and white oval cocoons was evolved from the Japanese hybrid BN18 × BCS25 by crossing with CC1, while the breed CSR6 which is characterised with normal marking (marked larvae) and white dumbbell cocoons was extracted from the Japanese commercial hybrid Shunrei × Shogetsu through continuous inbreeding coupled with selection. After fixation, these breeds along with other newly evolved breeds were subjected for hybrid study under optimum environmental conditions in the laboratory for expression of full potential of the genotypes. These hybrids were evaluated by the Evaluation Index Method (Mano et al., 1993). Seven productive hybrids were short-listed and the hybrid CSR3 × CSR6 is one among them. The hybrid CSR3 × CSR6 recorded a survival of 94.1%, a shell weight of 50.2 cg, a shell ratio of 24.5%, a raw silk percentage of 19.8, a filament length of 1295 m and a renditta of 5.1. On the other hand, the control hybrid (KA × NB4D2) has recorded a survival of 90.6%, a shell weight of 42.1 cg, a shell ratio of 20.4%, a raw silk percentage of 15.9, a filament length of 999 m and a renditta of 6.3. The hybrid CSR3 × CSR6 was authorised by the Central Silk Board in the year 1999 for commercial exploitation during favourable months.

Keywords: *Bombyx mori* L., breeding, productive hybrid.

INTRODUCTION

A systematic hybridisation coupled with appropriate selection procedures have contributed to amalgamate the major economic traits of choice from selected breeds and to synthesise genotypes of desirable constitution and expression in silkworm (Hirobe, 1968; Mano et al., 1982; Sreerama Reddy et al., 1992; Tanaka and Ohi, 1944). Chinese and Japanese breeders have already achieved a remarkable progress in the improvement of several quantitative and qualitative traits of economic value in silkworm, *Bombyx mori* (Mano et al., 1991; Chen He rui et al., 1994).

The concept of breeding bivoltine breeds in India was initiated by Harada (cf. Anonymous, 1955) at Kalimpong who isolated Chinese type strain Kalimpong A (KA) which is used as one of the components for commercial hybrid production. Similarly, extraction of breeds was initiated during

1970s from commercial hybrids obtained from Japan. This has resulted in isolation of three bivoltine strains namely, NB4D2, NB7 and NB18 (Narasimhanna *et al.*, 1976; Krishnaswami, 1983). Similarly, CC1 and CA2 were also bred at the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore (Datta, 1984). Later on many bivoltine breeds were evolved by various breeders in India (Trag *et al.*, 1992; Raju and Krishnamurthy, 1993). However, for the last 15 years the cocoon shell ratio in bivoltine hybrids remained constant at 20% and the realisation of cocoon shell ratio in commercial cocoon market is around 18%. This has made bivoltine crops unattractive to the farmers and reelers especially when they get similar silk content for multivoltine × bivoltine hybrids. More recently, two productive hybrids i.e., CSR2 × CSR4 and CSR2 × CSR5 were evolved and authorised for commercial exploitation (Datta *et al.*, 2000).

Despite a quantum jump in mulberry silk production since the last three decades in India, the quality of silk remained short of international standards since the bulk silk production comes from multivoltine × bivoltine hybrids. Therefore, it is essential that breeding strategies are directed towards the evolution of bivoltine strains/hybrids with high survival, shell ratio and raw silk recovery with good quality silk for commercial exploitation. Keeping this in view, attempts have been made to evolve productive bivoltine breeds/hybrids with high silk recovery and quality.

MATERIALS AND METHODS

In the present study, two Japanese bivoltine hybrids i.e., BN18 × BCS25, Shunrei × Shogetsu and an Indian evolved breed CC1 were utilised as breeding resource materials. The former hybrid was crossed with CC1 and the latter one utilised for line separation breeding. The rearing was conducted "en masse". The larvae were reared as per standard techniques recommended by Krishnaswami (1978) and Datta (1992).

Selection and breeding methods

CSR3 (oval line):

The line CSR3 was evolved from Japanese hybrid BN18 × BCS25 crossing with CC1. The larvae of this line was sex-limited for larval markings and spun white cocoons. On the basis of size and compactness, selection of cocoons was carried out for continuation of further generation. Mass rearing was conducted from F1 to F4 and from F5 onwards cellular rearing was resorted to. During the course of breeding, viability, cocoon yield and high cocoon shell ratio with high quality silk were mainly considered and mating was performed between the females and males from the cocoons of above average cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio. The breeding process of CSR3 is depicted in Fig 1.

Characteristics of CSR3:

The larvae are sex-limited for larval markings. Cocoons are white and oval with medium grains. Larval duration is around 23 days.

CSR6 (Dumbbell line):

The line CSR6 was evolved from Japanese commercial hybrid Shunrei × Shogetsu. At F2 (transgressive segregants) the segregants of marked larvae with dumbbell cocoons were separated from the breeding line of plain larvae and dumbbell cocoon. The selected cocoons based on their individual merit were pooled and mated "en masse". From F6 onwards cellular rearing was resorted to. The batch showing best performance for cocoon shape, survival, cocoon yield, cocoon characters and reeling characters related to breeding were selected. The individuals which were above the batch mean were selected for continuation of subsequent generation. During the course of breeding, robustness (high survival), cocoon yield and high cocoon shell ratio with high silk quality were mainly considered. The breeding process of CSR6 is depicted in Fig. 2.

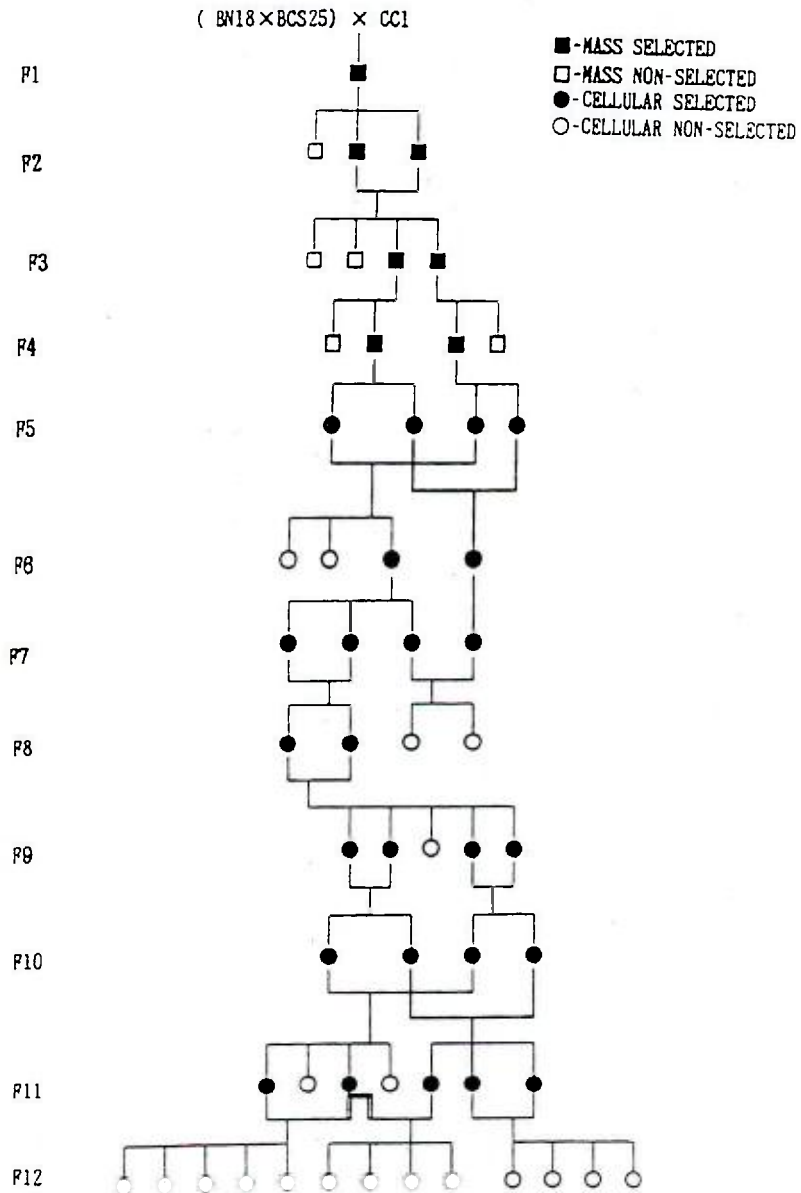


Fig. 1. Breeding plan of CSR3 (sex-limited, oval).
 Fig. 1. Plan de breeding de CSR3 (limité au sexe, ovale).

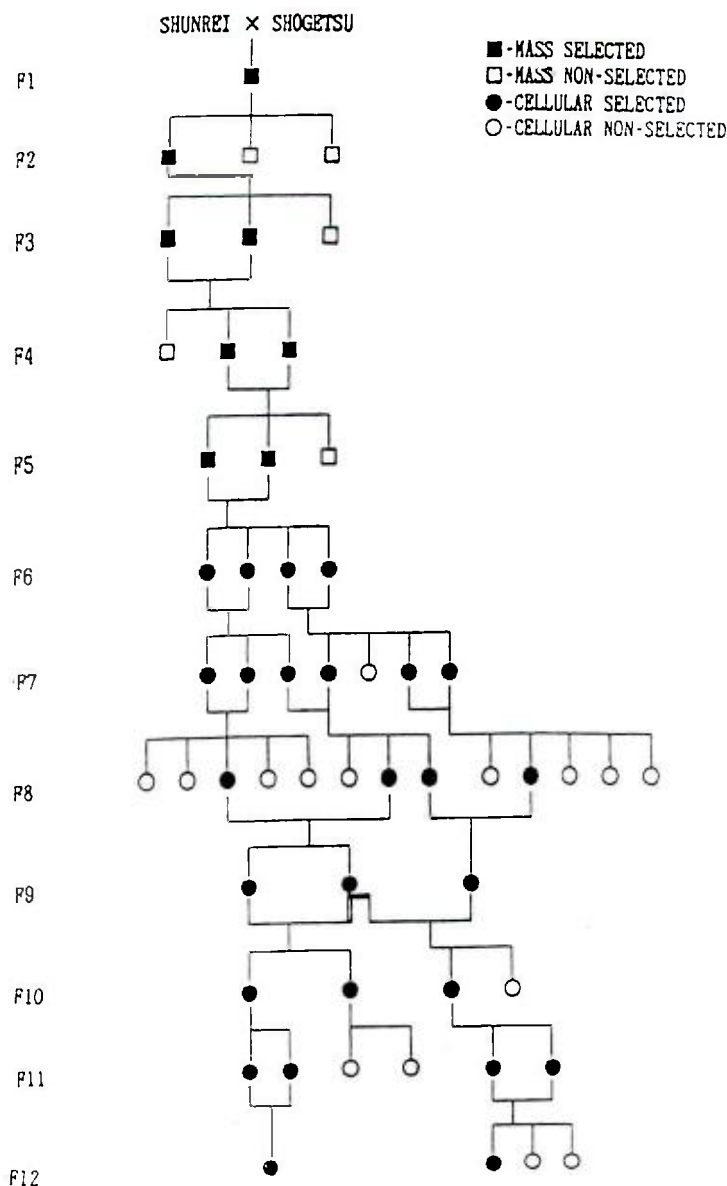


Fig 2. Breeding plan of CSR6 (marked: dumbbell).

Fig. 2. Plan de breeding de CSR6 (marqué cintre).

Characteristics of CSR6:

The larvae are marked, cocoons are white and dumbbell with medium grains. Larval duration is around 24 days.

After fixation (F9), these lines were subjected for hybrid study and evaluated in the laboratory by the Multiple Trait Evaluation Index developed by Mano *et al.*, 1993 by providing optimum environmental conditions to silkworm to bring out the full potential of the genotypes. By utilising these two lines i.e., CSR3 and CSR6 and breeds developed earlier. 161 hybrids were tested. Based on survival, cocoon and reeling characters, seven productive hybrids were short-listed. Out of which, the productive hybrid CSR3 × CSR6 was selected.

Characteristics of CSR3 × CSR6:

The larvae are marked cocoons are white and have an intermediate shape between oval and dumbbell. The larval period is around 23 days. The most prominent characters of these hybrids are high survival, high cocoon shell ratio, longer filament length and yielding of high quality raw silk.

Table I. Generation-wise mean performance of CSR3.

Tableau I. Performance de CSR3 au cours des générations.

Generation	Survival	Cocoon Yield/ 10000 larvae	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Raw silk	Filament length	Denier	Reclability	Neatness
	<i>Survie</i>	<i>Rendement en cocons / 10 000 larves</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Soie grège</i>	<i>Longueur du filament</i>	<i>Titre</i>	<i>Dévidabilité</i>	<i>Netteté</i>
	(%)	(kg)	(g)	(cg)	(%)	(%)	(m)	(d)	(%)	(p)
F1	94.7	21.00	2.21	52.7	23.9	18.9	1372	2.74	81	92.0
F2	90.7	20.50	2.19	51.7	23.6	17.0	1249	2.74	79	92.8
F3	76.8	14.20	1.85	44.3	23.1	18.4	1371	2.66	61	87.8
F4	80.7	15.43	1.93	46.8	24.3	16.8	1065	2.84	66	93.0
F5	87.3	15.73	1.79	43.2	23.1	17.9	1121	2.70	78	90.0
F6	75.9	14.03	1.85	46.3	25.0	17.4	1107	2.23	68	91.4
F7	80.9	14.11	1.83	43.0	23.5	18.6	1069	2.60	65	90.1
F8	80.1	14.33	1.79	43.7	24.4	17.5	1116	2.49	77	89.8
F9	80.7	15.43	1.93	46.8	24.3	20.4	1236	3.06	81	93.0
F10	75.9	13.36	1.86	46.3	24.3	19.8	1198	2.86	78	94.0
F11	82.3	15.38	1.92	45.2	23.5	18.9	1148	2.68	69	93.0
F12	86.6	15.20	1.87	45.3	24.2	19.8	1116	2.49	77	94.0
Mean	82.7	15.73	1.92	46.3	23.9	18.5	1181	2.67	73	91.7
<i>Moyenne</i> Sd	4.6	1.80	0.1	2.3	0.6	1.2	88	0.2	6.6	1.9

Table II. Generation-wise mean performance of CSR6.

Tableau II. Performance de CSR6 au cours des générations.

Generation	Survival	Cocoon Yield/ 10000 larvae	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Raw silk	Filament length	Denier	Reelability	Neatness
	<i>Survie</i>	<i>Rendement En cocons / 10 000 larves</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Soie grège</i>	<i>Longueur du filament</i>	<i>Titre</i>	<i>Dévidabilité</i>	<i>Netteté</i>
	(%)	(kg)	(g)	(cg)	(%)	(%)	(m)	(d)	(%)	(p)
F1	84.0	15.1	1.79	40.7	24.7	19.0	1007	2.95	84	92.0
F2	88.3	15.9	1.80	44.7	24.9	19.5	1047	2.87	76	95.0
F3	85.0	15.6	1.81	41.3	22.8	20.0	1105	3.11	74	92.0
F4	80.9	16.1	1.99	48.2	24.2	21.1	1116	3.07	84	90.0
F5	78.3	14.7	1.92	45.5	23.6	19.4	1058	2.98	79	93.5
F6	80.8	14.9	1.81	43.9	24.3	20.4	1004	3.05	84	95.0
F7	90.3	14.2	1.67	40.1	24.1	19.6	1124	2.98	85	92.0
F8	81.1	14.7	1.80	43.8	24.3	20.0	1157	2.91	78	93.2
F9	77.0	15.9	1.94	44.4	23.9	20.5	1308	2.78	71	93.8
F10	92.1	18.2	1.98	47.6	24.0	19.5	1124	2.98	81	92.0
F11	86.8	16.1	1.85	44.8	24.2	19.7	1224	2.68	82	90.0
F12	80.3	14.8	1.82	43.5	23.9	18.9	1069	2.98	83	93.0
Mean Moyenne	83.7	15.5	1.85	44.0	24.1	19.8	1112	2.95	80	92.6
Sd	4.6	1.0	0.09	2.4	0.5	0.6	84	0.12	4.3	1.6

Observations were made on various silk governing parameters like survival, cocoon yield/10,000 larvae, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio, raw silk percentage, filament length, denier, neatness, reelability and renditta.

RESULTS

The generation-wise mean values of ten economic traits of the breeding lines CSR3 and CSR6 are presented in Tables I and II respectively. The mean values and the percentage of improvement over control breeds KA and NB4D2 are tabulated in Table III. The perusal of data for the trait survival shows that the maximum survival was recorded at F1 in CSR3 (94.7%) and F10 in CSR6 (92.1%). The maximum cocoon yield/10000 larvae was observed at F1 in CSR3 (21.0 kg) and at F10 in CSR6 (18.2 kg). The maximum cocoon weight was recorded at F1 in CSR3 (2.21 g) and F4 in CSR6 (1.99 g). The data indicate that the highest cocoon shell weight was recorded at F1 in CSR3 (52.7 cg) and F4 in CSR6 (48.2 cg). The percentage improvement of 23.0 was noticed for cocoon shell weight in CSR3 over control breed KA whereas in CSR6 the percentage improvement over NB4D2 was 14.0. The highest cocoon shell ratio of 25.0 at F6 in CSR3 and 24.9% at F2 in CSR6 was recorded. The percentage improvement for the shell ratio trait was 24.0 in CSR3 and 14.2 in CSR6 over control breeds.

Table III. Performance of CSR3 and CSR6 in the laboratory (Mean of 5 trials).

Tableau III. Performance de CSR3 et de CSR6 en laboratoire (Moyenne de 5 essais).

Breed	Survival	Cocoon Yield/ 10000 larvae	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Raw silk	Filament length	Denier	Reclability	Neatness
Lignée	Survie	Rendement en cocons / 10 000 larves	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Soie grège	Longueur du filament	Titre	Dévidabilité	Netteté
	(%)	(kg)	(g)	(cg)	(%)	(%)	(m)	(d)	(%)	(p)
CSR3	83.6	14.807	1.833	45.5	24.3	18.6	1214	2.93	77	92.8
KA	83.3	15.777	1.904	37.0	19.6	14.0	885	3.00	77	90.9
*	0.4	-6.1	-3.7	23.0	24.0	33.2	37.2	-	0	2.1
CSR6	86.3	15.498	1.832	44.1	24.2	19.1	1105	3.00	82	93.3
NB4D2	90.3	16.478	1.827	38.7	21.2	14.8	934	3.10	79	90.5
**	-4.4	-5.9	0.3	14.0	14.2	29.1	18.3	-	3.8	3.1

* Percent improvement over KA / Amélioration en pourcentage par rapport à KA.

** Percent improvement over NB4D2 / Amélioration en pourcentage par rapport à NB4D2.

Table IV. Performance of CSR3 × CSR6 in the laboratory. (Mean of 5 trials)

Tableau IV. Performance de CSR3 × CSR6 en laboratoire (Moyenne de 5 essais).

Hybrid	Survival	Cocoon Yield/ 10000 larvae	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Raw silk	Filament length	Denier	Reelability	Neatness	Renditta
Hybride	Survie (%)	Rendement en cocons / 10 000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur du filament (m)	Titre (d)	Dévidabilité (%)	Netteté (p)	Rendement à la bassine
CSR3 × CSR6	94.1	19.37	2.05	50.2	24.5	19.8	1295	2.84	85	95.5	5.1
Sd	2.4	0.7	0.04	1.1	0.3	0.7	41	0.1	4.4	0.8	
KA × NB4D2	90.6	18.86	2.04	42.2	20.4	15.9	999	3.09	81	93.1	6.3
Sd	2.6	2.1	0.20	3.0	0.8	0.8	101	0.2	4.7	1.4	
*	4.3	2.7	0.3	19.0	20.1	24.5	29.5	-	2.5	0.4	19.0

* Percent improvement over KA × NB4D2 / * Amélioration en pourcentage par rapport à KA × NB4D2.

The highest raw silk percentage was recorded at F9 in CSR3 (20.4%) and F4 in CSR6 (21.1%). The percentage improvement over control breeds was 33.2 in CSR3 and 29.1 in CSR6. The maximum filament length was recorded at F1 in CSR3 (1372 m) and F9 in CSR6 (1308 m). The improvement was 37.2% in CSR3 and 18.3% in CSR6. The filament size (denier) varied from 2.49d to 3.06d in CSR3 and 2.68 to 3.05 d in CSR6. The reelability was ranging from 65 to 81% and 74 to 85% in CSR3 and CSR6 respectively. Maximum neatness was recorded at F12 in CSR3 (94 p) and at F2 and F6 in CSR6 (95 p).

The laboratory performance of new hybrids is presented in Table IV. The hybrid CSR3 × CSR6 recorded a survival of 94.1%, shell weight of 50.2 cg, shell ratio of 24.5%, raw silk percentage of 19.8, filament length of 1295 m and renditta of 5.1. On the other hand the control hybrid (KA × NB4D2) has recorded a survival of 90.6%, a shell weight of 42.1 cg, shell ratio of 20.4%, a raw silk percentage of 15.9%, a filament length of 999 m and renditta of 6.3. A maximum percentage improvement was noticed for filament length (29.5) followed by raw silk percentage (24.5), shell ratio (20.1) and shell weight (19.0) over control hybrid KA × NB4D2. The percentage improvement for other characters like survival, cocoon yield, cocoon weight, reelability and neatness was marginal.

DISCUSSION

The existing bivoltine hybrids are few in the field and silk recovery is less since the parents involved i.e., KA, NB4D2, CC1 and CA2 are characterised by the cocoon shell ratio of 20% (Narasimhanna *et al.*, 1976; Krishnaswami, 1983; Datta, 1984). More emphasis is required to develop

productive hybrids with high raw silk recovery and quality silk for commercial exploitation. Accordingly for improving the characters such as raw silk recovery and silk quality, breeding work was initiated and succeeded in evolving productive bivoltine hybrids namely CSR2 × CSR4 and CSR2 × CSR5 (Datta *et al.*, 2000). In addition, similar experiments in this line resulted in the evolution of productive breeds namely CSR3 and CSR6.

The data presented in Table III indicate that the breeds CSR3 (Oval) and CSR6 (dumbbell) surpass the control breeds KA (oval) and NB4D2 (dumbbell) in characters like shell weight, shell ratio, raw silk percentage and filament length. Like parental breeds the new hybrids also surpass the control hybrid in many quantitative and qualitative characters which can be attributed to the involvement of Japanese hybrids known for high productivity and silk quality (Mano *et al.*, 1994) at the time of initiation of the breeding process. Though the new hybrid CSR3 × CSR6 has shown a marginal improvement in survival and cocoon yield over control KA × NB4D2, significant improvement was noticed in shell weight, shell ratio, raw silk recovery, filament length and renditta.

In silkworm, the selection for one character is found to result in correlated changes in other quantitative characters of economic importance (Kobari and Fujimoto, 1966). For example, survival and productivity traits which are of high economic value are negatively correlated with each other. As seen in the present breeding study keeping the cocoon yield on par with control hybrid, the productive traits (shell weight, shell ratio, raw silk and filament length) and qualitative trait (neatness) were improved. The hybrid CSR3 × CSR6 was authorised by the Central Silk Board in the year 1999 for commercial exploitation during favourable months.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1955) Annual Report of CSRTI, Berhampore.
- CHEN, HE-RUI, JIN YUN-YU HUANG ZI-XIU, RUAN, GUAN-HUA & YAO, LU-SONG (1994) Breeding of new silkworm variety *Fanhua chunmei* for spring rearing. *Canye Kexue*, 20(1): 26-29.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races in India. *Sericologia*, 24(3): 393-415.
- DATTA R. K. (1992) Guidelines for bivoltine rearing. Central silk Board.
- DATTA R. K., BASAVARAJA H. K., MAL REDDY N., NIRMAL KUMAR S., ASHAN M. M., SURESH KUMAR N. & RAMESH BABU R. (2000) Evolution of new productive bivoltine hybrids CSR2 × CSR4 and CSR2 × CSR5, *Sericologia* (accepted).
- HIROBE T. (1968) Evolution, differentiation and breeding of the silkworm – the silk road, past and present. *Genetics in Asian countries XII. Int. Cong. Genet.*, p. 25-36.
- KOBARI K. & FUJIMOTO N. (1966) Studies on the selection of cocoon filament length and cocoon filament size in *Bombyx mori*. *Nissenzatsu.*, 35 (6) 427-434.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSR & TI, Bull. no. 2, Central Silk Board, 1-23.
- KRISHNASWAMI S. (1983) Evolution of new bivoltine races for traditionally multivoltine areas of south India. *Indian Silk*, 22(1): 3-11.
- MANO Y., TANIGUCHI M. & KATO M. (1982) On the breeding of autosexing silkworm races, N140, C140. *Bull. Seric. Expt. Stn.*, 18(5):667-690.
- MANO Y., ASAOKA K., IHARA O., NAKAGAWA H., & HIRABAYASHI T. (1991) Breeding and evaluation of adaptability of the silkworm *Bombyx mori* to the new low cost artificial diet, LPY lacking of mulberry leaf powder. *Bull. Nat. Inst. Seric. Ent.* 3: 31-56.
- MANO Y., NIRMAL KUMAR S., BASAVARAJA H. K., MAL REDDY S. & DATTA R. K. (1993) A new method to select promising silkworm hybrid combination. *Indian Silk*, 30 (10): 53.
- MANO Y., DATTA R. K., MAL REDDY N., BASAVARAJA H. K., NIRMAL KUMAR S. & SURESH KUMAR N. (1994) Potentiality of Indian and Japanese hybrids. *Indian Silk.*, 33 (2) 5-7.

- NARASIMHANNA M. N., CHANDRASEKARAI AH, GEETHADEVI R. G. & PRABHA G. (1976) Ecogenetic attributes of the newly evolved bivoltine hybrid "Nandi" in *Bombyx mori* L. Proc. Dunn-Dobzhansky Symp. Genet., 379-386.
- RAJU P. J. & KRISHNAMURTHY N. B. (1993) Breeding of two bivoltine MG511 and MG512 for silkworm *Bombyx mori* L. for high viability and silk productivity. Sericologia, 33(4): 577-587.
- SREERAMA REDDY G., RAJU P. J. & MARIBASHETTY V. G. (1992) Heterosis and its application in silkworm *Bombyx mori* L. Indian Soc. Life Sci., Manas Pub., Kanpur UP, India. 205-222.
- TRAG A. R., KANILI A. S., MALIK G. N. & KUKILOOFA (1992) Evolution of high yielding bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes, Sericologia, 32(2): 321-324.
- TANAKA Y. & OHI H. (1994) On the breeding and characteristics of a polyphagous silkworm race "Hitachi Nishiki" for summer and autumn rearing. Rep. Silk. Sci. Res. Inst., No. 42, 27-40.

MISE AU POINT D'UN NOUVEL HYBRIDE BIVOLTIN PRODUCTIF CSR3 × CSR6

R. K. DATTA, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR,
M. M. AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU

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

*Les premières expériences de lignage (années 1970) avaient permis d'obtenir des hybrides productifs avec une richesse soyeuse de 18 % chez les producteurs. Ces hybrides n'ont pas eu beaucoup d'impact sur le terrain. Il est nécessaire d'obtenir des quantités plus importantes de soie de qualité supérieure. L'expérience avec la production de soie bivoltine n'est pas très encourageante dans l'ensemble. Les fermiers ne trouvent pas que l'élevage d'hybrides bivoltins soit très rémunérateur et valorisant. Compte tenu de cela, une réorientation des approches de lignage a été envisagée. Dernièrement, l'adoption de la sériciculture bivoltine en Inde a gagné du terrain grâce à la mise au point d'un certain nombre de lignées/hybrides bivoltins productifs et robustes du ver à soie *Bombyx mori* L. pour les conditions tropicales.*

Le travail de lignage a commencé à l'Institut en utilisant deux hybrides japonais à savoir BN18 × BCS25 et Shunrei × Shogetsu ainsi qu'une lignée indienne élaborée, CC1. La lignée CSR3 qui se caractérise par un marquage latéral limité au sexe et des cocons ovales blancs a été mise au point à partir de l'hybride japonais BN18 × BCS25 en le croisant avec CC1, tandis que la lignée CSR6, qui se caractérise par un marquage normal (larves marquées) et des cocons cintrés blancs a été extraite de l'hybride commercial japonais Shunrei × Shogetsu grâce à un inbreeding continu associé à une sélection. Après fixation, ces lignées ainsi que d'autres lignées nouvellement mises au point ont été soumises à une étude hybride dans des conditions environnementales optimums en laboratoire pour l'expression du plein potentiel des génotypes. Ces hybrides sont évalués par la Méthode de l'Indice d'Évaluation (Mano et coll., 1993). Sept hybrides productifs ont été sélectionnés et l'hybride CSR3 × CSR6 est l'un d'eux. L'hybride CSR3 × CSR6 a un taux de survie de 94,1 %, un poids de coque de 50,2 cg, une richesse soyeuse de 24,5 %, un pourcentage de soie grège de 19,8 %, une longueur de filament de 1295 m et un rendement à la bassine de 5,1. D'autre part, l'hybride témoin (KA × NB4D2) se caractérise par un taux de survie de 90,6 %, un poids de coque de 42,1 cg, une richesse soyeuse de 20,4 %, un pourcentage de soie grège de 15,9 %, une longueur de filament de 999 m et un rendement à la bassine de 6,3. L'hybride CSR3 × CSR6 a reçu le visa du Central Silk Board en 1999 pour l'exploitation commerciale pendant les mois favorables.

INTRODUCTION

Une hybridation systématique associée à des procédures de sélection appropriées ont permis de fusionner les principaux traits économiques de choix de lignées sélectionnées et de mettre au point des génotypes de ver à soie de constitution et d'expression souhaitées (Hirobe, 1968 ; Mano et coll., 1982 ; Sreerama Reddy et coll., 1992 ; Tanaka et Ohi, 1944). Des sélectionneurs chinois et japonais ont déjà réussi à améliorer avec succès plusieurs traits quantitatifs et qualitatifs ayant une valeur économique chez le ver à soie *Bombyx mori* (Mano et coll., 1991 ; Chen He rui et coll., 1994).

Le concept de breeding de lignées bivoltines en Inde a été initié par Harada (cf. Anonymc, 1955) à Kalimpong ; il a isolé une souche de type chinois Kalimpong A (KA) qui est utilisée comme l'un

des composants pour la production commerciale d'hybrides. De même, l'extraction de lignées à partir d'hybrides commerciaux provenant du Japon a commencé dans les années soixante dix. Cela a permis l'isolement de trois lignées bivoltines, en l'occurrence NB4D2, NB7 et NB18 (Narasimhanna et coll., 1976 ; Krishnaswami, 1983). De même, CC1 et CA2 ont été isolés à l'Institut Central de Recherche et de Formation Sérícicoles de Mysore (Datta, 1984). Plus tard de nombreuses lignées bivoltines ont été mises au point par plusieurs chercheurs en Inde (Trag et coll., 1992 ; Raju et Krishnamurthy, 1993). Cependant, pendant les 15 dernières années la richesse soyeuse du cocon chez les hybrides bivoltins est demeurée constante à 20 % et la richesse soyeuse des cocons obtenus en exploitation est d'environ 18 %. Cela rend les récoltes bivoltines peu attirantes pour les fermiers et surtout pour les filateurs quand ils obtiennent une teneur similaire en soie avec des hybrides polyvoltin × bivoltin. Plus récemment, deux hybrides productifs CSR2 × CSR4 et CSR2 × CSR5 ont été mis au point et ont reçu le visa d'exploitation commerciale (Datta et coll., 2000).

Malgré un bond en avant de la production de soie mûrier en Inde depuis les trois dernières décennies, la qualité de la soie demeure en deçà des normes internationales parce que la plus grande partie de la production de soie vient d'hybrides polyvoltin × bivoltin. Il est donc essentiel que les stratégies de lignage soient dirigées vers la mise au point de souches/hybrides bivoltins au taux de survie, à la richesse soyeuse, au taux de soie grège élevés avec une soie de bonne qualité pour l'exploitation commerciale. Compte tenu de cela, des essais ont été réalisés pour mettre au point des hybrides/lignées bivoltins avec une qualité et un rendement de soie élevés.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, deux hybrides bivoltins japonais BN18 × BCS25, Shunrei × Shogetsu et une lignée indienne CC1 sont utilisés comme matériels de ressource pour le lignage. Le premier hybride est croisé avec CC1 et le second est utilisé pour l'obtention de lignées. L'élevage est réalisé en masse. Les larves sont élevées d'après les techniques standards recommandées par Krishnaswami (1978) et Datta (1992).

Méthodes de sélection et de lignage :

CSR3 (lignée ovale) :

La lignée CSR3 a été obtenue à partir du croisement entre l'hybride japonais BN18 × BCS25 et CC1. Cette lignée est limitée au sexe pour les marquages larvaires et file des cocons blancs. On procède à la sélection des cocons sur la base de la taille et de leur aspect compact pour la continuation des générations. On procède à l'élevage en masse des F1 aux F4 et à partir de F5 on a recours à l'élevage cellulaire. Au cours de l'élevage, on prend surtout en compte la viabilité, le rendement en cocons, une richesse soyeuse élevée et une qualité de soie élevée et on procède à l'accouplement entre femelles et mâles provenant de cocons dont le poids, le poids de la coque et la richesse soyeuse sont au-dessus de la moyenne. Le processus de lignage est présenté dans la Fig. 1.

Caractéristiques de CSR3 :

Les larves sont limitées au sexe pour les marquages larvaires. Les cocons sont blancs et ovales avec des grains moyens. La durée larvaire est d'environ 23 jours.

CSR6 (Lignée cintrée) :

La lignée CSR6 a été obtenue à partir de l'hybride commercial japonais Shunrei × Shogetsu. En F2 (ségréants transgressifs) les ségréants des larves marquées avec des cocons cintrés sont séparés des larves unies à cocons cintrés. Les cocons sélectionnés sur la base de leur mérite individuel sont regroupés et accouplés en masse. A partir de F6, on a recours à l'élevage cellulaire. Les lots présentant la meilleure performance pour la forme du cocon, le taux de survie, le rendement en cocons, les caractères du cocon, et les caractères de dévidage sont sélectionnés. Les individus au-dessus de la

moyenne du lot sont sélectionnés pour la continuation des générations. Au cours du lignage, on prend surtout en compte la robustesse (taux de survie élevé), le rendement en cocons et une richesse soyeuse élevée avec une qualité de soie élevée. Le processus de lignage de CSR6 est présenté dans la Fig. 2.

Caractéristiques de CSR6 :

Les larves sont marquées, les cocons sont blancs et cintrés avec des grains moyens. La durée larvaire est d'environ 24 jours.

Après fixation (F9), ces lignées sont soumises à une étude hybride et évaluées en laboratoire grâce à l'Indice d'Evaluation des Traits Multiples mis au point par Mano et coll., 1993 en faisant bénéficier les vers à soie de conditions environnementales optimums pour faire ressortir le plein potentiel des génotypes. En utilisant ces deux lignées, CSR3 et CSR6 et les lignées mises au point auparavant, 161 hybrides sont testés. Sept hybrides productifs sont sélectionnés sur la base du taux de survie, et des caractères du cocon et de dévidage. L'hybride productif CSR3 × CSR6 est l'un d'eux.

Caractéristiques de CSR3 × CSR6 :

Les larves sont marquées, les cocons sont blancs et ont une forme intermédiaire entre ovale et cintrée. La durée larvaire est d'environ 23 jours. Les caractères les plus importants de ces hybrides sont un taux de survie élevé, une richesse soyeuse élevée, un filament plus long et une soie grège de qualité supérieure.

Des observations sont faites sur les divers paramètres qui gouvernent la production de soie, comme la survie, le rendement en cocons pour 10 000 larves, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament, le titre, la netteté, la dévidabilité et le rendement à la bassine.

RESULTATS

Les valeurs moyennes en fonction des générations pour dix traits économiques chez les lignées CSR3 et CSR6 sont présentées dans les Tableaux I et II respectivement. Les valeurs moyennes et le pourcentage d'amélioration par rapport aux lignées témoins KA et NB4D2 sont rapportés dans le Tableau III. L'observation des données pour la survie montre que la survie maximum est enregistrée en F1 pour CSR3 (94,7 %) et en F10 pour CSR6 (92,1 %). Le rendement maximum en cocons pour 10 000 larves est observé en F1 pour CSR3 (21 kg) et en F10 pour CSR6 (18,2 kg). Le poids maximum du cocon est enregistré en F1 pour CSR3 (2,21 g) et en F4 pour CSR6 (1,99 g). Le poids de coque le plus élevé est enregistré en F1 pour CSR3 (52,7 cg) et en F4 chez CSR6 (48,2 cg). On remarque une amélioration de 23 % pour le poids de la coque chez CSR3 par rapport à la lignée témoin KA tandis que chez CSR6, l'amélioration par rapport à NB4D2 est de 14 %. La richesse soyeuse la plus élevée est enregistrée en F6 (25 %) chez CSR3 et en F2 (24,9 %) chez CSR6. On constate une amélioration de la richesse soyeuse de 24 % chez CSR3 et de 14,2 % chez CSR6 par rapport aux lignées témoins.

Le taux de soie grège le plus élevé est enregistré en F9 chez CSR3 (20,4 %) et en F4 chez CSR6 (21,1 %). L'amélioration par rapport aux lignées témoins est de 33,2 % chez CSR3 et de 29,1 % chez CSR6. La longueur maximum de filament est enregistrée en F1 chez CSR3 (1372 m) et en F9 chez CSR6 (1308 m). L'amélioration est de 37,2 % chez CSR3 et de 18,3 % chez CSR6. Le titre de la bave varie entre 2,49d et 3,06 chez CSR3 et entre 2,68 et 3,05d chez CSR6. La dévidabilité est comprise entre 65 et 81 % et entre 74 et 85 % respectivement chez CSR3 et CSR6. On enregistre une netteté maximum en F12 pour CSR3 (94 p) et en F2 et en F6 chez CSR6 (95 p).

La performance en laboratoire des nouveaux hybrides est présentée dans le Tableau IV. L'hybride CSR3 × CSR6 présente une survie de 94,1 %, un poids de coque de 50,2 cg, une richesse soyeuse de 24,5 %, un pourcentage de soie grège de 19,8 %, une longueur de filament de 1295 m et un rendement à la bassine de 5,1. D'autre part, l'hybride témoin (KA × NB4D2), a une survie de 90,6 %, un poids de coque de 42,1 cg, une richesse soyeuse de 20,4 %, un pourcentage de soie grège de 15,9 %, une

longueur de filament de 999 m et un rendement à la bassine de 6,3. On remarque une amélioration maximum en pourcentage par rapport à l'hybride témoin KA × NB4D2 pour la longueur du filament (29,5 %), suivie par le pourcentage de soie grège (24,5), la richesse soyeuse (20,1) et le poids de la coque (19). Le pourcentage d'amélioration pour d'autres caractères comme la survie, le rendement en cocons, le poids du cocon, la dévidabilité et la netteté est marginal.

DISCUSSION

Les hybrides bivoltins existants sont peu nombreux sur le terrain et l'obtention de soie est moindre étant donné que les parents impliqués KA, NB4D2, CC1 et CA2 sont caractérisés par une richesse soyeuse de 20 % (Narasimhanna et coll., 1976 ; Krishnaswami, 1983 ; Datta, 1984). Il faut accorder plus d'importance à la mise au point d'hybrides productifs avec un rendement en soie grège et une qualité de soie élevés pour l'exploitation commerciale. En conséquence pour améliorer les caractères tels que le rendement de soie grège et la qualité de la soie, on a commencé un travail de lignage, qui a conduit à la mise au point réussie d'hybrides bivoltins productifs en l'occurrence CSR2 × CSR4 et CSR2 × CSR5 (Datta et coll., 2000). De plus, des expériences similaires ont débouché sur la mise au point de lignées productives : CSR3 et CSR6.

Les données présentées dans le Tableau III indiquent que les lignées CSR3 (ovale) et CSR6 (cintrée) surpassent les lignées témoins KA (ovale) et NB4D2 (cintrée) pour les caractères comme le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège et la longueur du filament. Comme les lignées parentales, les nouveaux hybrides surpassent aussi les hybrides témoins pour de nombreux caractères quantitatifs et qualitatifs, ce qui peut être attribué à l'implication d'hybrides japonais connus pour leur productivité et leur qualité de soie élevées (Mano et coll., 1994) au début du processus de lignage. Bien que le nouvel hybride CSR3 × CSR6 ne montre qu'une amélioration marginale pour la survie et le rendement en cocons par rapport au témoin KA × NB4D2, on remarque une amélioration significative du poids de la coque, de la richesse soyeuse, du rendement de soie grège, de la longueur du filament et du rendement à la bassine.

Chez le ver à soie, on observe que la sélection d'un caractère entraîne des changements corrélés pour d'autres caractères quantitatifs d'importance économique (Kobari et Fujimoto 1966). Par exemple, la survie et la productivité qui ont une valeur économique importante sont corrélés négativement l'un avec l'autre. Comme on peut le voir dans cette étude de lignage, où le rendement en cocons est égal à celui de l'hybride témoin, les traits de productivité (poids de la coque, richesse soyeuse, soie grège et longueur du filament) et les traits qualitatifs (netteté) ont été améliorés. L'hybride CSR3 × CSR6 a reçu un visa du Central Silk Board en 1999 pour l'exploitation commerciale pendant les mois favorables.

STUDIES ON DEVELOPMENT OF AN ORAL "VACCINE" AGAINST NUCLEAR POLYHEDROSIS IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

B. NATARAJU, V. SIVAPRASAD* & R. K. DATTA

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

Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) was attenuated and tested for its potential as oral vaccine in silkworm against challenge inoculation with BmNPV Polyhedral inclusion bodies. The attenuated BmNPV as oral vaccine protect silkworms against BmNPV infection for a short period (6-8 days). It was effective at high dosage ($> 20 \mu\text{g/ml}$) and the effectiveness was manifested from 12-24h post-vaccination inoculations. Triple vaccination could protect silkworms for comparatively a longer period and decreased the mortality due to nuclear polyhedrosis by 85.21%.

Keywords: Nuclear polyhedrosis virus, attenuated virus, vaccination.

INTRODUCTION

Among the diseases in silkworm, nuclear polyhedrosis is common and prevails all through the year in all sericultural countries. In India, among the diseased larvae, nuclear polyhedrosis prevails to an extent of 33-50% and is most common during the summer season (Christi and Sahaf, 1990; Nataraju *et al.*, 1998). At present, the disease is managed, by rearing the silkworms on nutritious mulberry in healthy environment. The disease is caused by a baculovirus, the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) and the susceptibility to the infection in silkworm is controlled by polygenes. The tolerance to the disease among the silkworm breeds is variable. In biological field, in the event of non-availability of resistance in the host to a particular virus infection, vaccination of the host is one of the most sought after approach to prevent the infection. This paper presents the results of investigation to develop an oral vaccine against the nuclear polyhedrosis in silkworm.

MATERIAL AND METHODS

BmNPV polyhedral inclusion bodies (BmNPV PIB) were harvested from experimentally inoculated diseased silkworms. The BmNPV were released from the BmNPV PIB by alkali treatment, sedimented, purified by sucrose gradient centrifugation (30-60%, 25,000 rpm, 4° C) and quantified (Sugimori *et al.*, 1990). The polyhedrin protein was precipitated from the alkali treated BmNPV PIB, purified and quantified. BmNPV was attenuated by suspending the virions in aqueous solution containing 0.02% formaldehyde for a period of 36h. at $26 \pm 1^\circ \text{C}$. The virions were pelleted, washed in physiological saline by repeated centrifugation (30,000 rpm. 120 min. at 4° C) and suspended in the saline. The purified polyhedrin and the attenuated virions were tested by bioassay, to confirm their non-infectivity to silkworm.

* Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute, Hindupur – 515 211, Andhra Pradesh, India.

Attenuated BmNPV and polyhedrin in different dosage (5, 10, 20 and 40 µg/ml) were tested individually for their efficacy as vaccine by oral vaccination to silkworm inoculated (challenge inoculation) with different dosage of BmNPV PIB (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 and 1×10^4 PIB/ml), 24 hr prior to vaccination or 24 h post-vaccination. The BmNPV PIB/attenuated virions were smeared onto the mulberry leaves and fed to NB18 breed silkworms. To determine the effective time for vaccination, the attenuated BmNPV (20 µg/ml) were fed to the silkworms and challenged with 1×10^2 BmNPV polyhedra/ml, after an interval of 6, 12, 18 and 24h. The silkworms were inoculated with BmNPV PIB/Vaccine on second day of first instar. To determine the effectiveness of multiple vaccination, one time challenge inoculation was performed on second day of first instar and single, double and triple post-inoculation vaccination were tested by vaccination 24h post-inoculation during first instar (single vaccination), 24h post-inoculation and again immediately after I moult (double vaccination) and 24h post-inoculation and again immediately after I moult and II moult (triple vaccination). The effectiveness and the functional dosage were determined by bioassay for BmNPV infection and mortality due to the disease. The treated and control larvae were reared for a period of 14-18 days and the infection/cumulative mortality due to BmNPV was recorded, everyday by visual/and microscopic examination. Each treatment had three replications of 50 larvae each.

RESULTS AND DISCUSSION

It is observed from the results, that the attenuated BmNPV provides protection against the development of the disease in silkworm. The attenuated BmNPV was observed to provide protection against post-vaccination BmNPV PIB inoculations in silkworms for a period of 6-8 days. The cumulative mortality due to single vaccination after inoculation (0.00% 6th day, 1.33% 8th day, 6.33% 12th day and 14.67% 14th day) was reduced significantly as compared to non vaccinated-inoculated control (8.33% 6th day, 19.67% 8th day, 32.67% 12th day and 43.67% 14th day). The vaccine was observed to be comparatively ineffective against pre-vaccination BmNPV PIB inoculation with the cumulative mortality on par with non vaccinated-inoculated control (10.33% 6th day, 15.67% 8th day, 23.00% 12th day and 40.33% 14th day). The polyhedrin protein derived from the polyhedra tested as vaccine, was ineffective against BmNPV PIB inoculation (Table I).

The attenuated BmNPV was effective at dosage of 20-40 µg/ml and at lower doses (5-10 µg/ml), the potential to provide protection was significantly reduced. The cumulative mortality with 5-10 µg/ml was 36.33 – 40.67% by 14th day, while with 20-40 µg/ml, it was 14.67 – 15.33% (Table II).

The vaccination was effective optimally from 12-24h after inoculation. The mortality ranged from 11.67 – 12.67%. The effectiveness of vaccination was reduced if vaccination took place 6h after inoculation and 48h after inoculation. The vaccination 6h after inoculation resulted in a mortality of 24.33% while the vaccination 48h after resulted in mortality of 28.33% (Table III).

The vaccine was most effective at low doses (1×10^1 and 1×10^2 BmNPV PIB/ml) of inoculum and at higher dosage (1×10^3 and 1×10^4 BmNPV PIB/ml) its effectiveness was reduced (Table IV).

Single vaccination during 1st instar 24h after inoculation, double vaccination, once 24h after inoculation during 1st instar and again during 2nd instar and triple vaccination, once 24h after inoculation during 1st instar again once during 2nd and 3rd instar, delayed the development of the disease. With a single vaccination, mortality was observed from 8th day after inoculation while in double and triple vaccination the mortality was observed from 10th day after inoculation. In case of single vaccination the mortality by 18th day was 24.33% while in double and triple vaccination it was 12.33 and 7.00% respectively. Triple vaccination lowered the infection by 85.21% as compared to 73.94% for double vaccination 18 days after inoculation. Single vaccination lowered the infection level by 48.59% (Table V).

It is clear that attenuated BmNPV delayed the development of the nuclear polyhedrosis by 6-8 days with single vaccination. The delay was for a brief period. Triple vaccination further delayed the

development of the disease. The polyhedrin as well as pre-vaccination inoculation did not delay the development of the disease. The response to vaccine develops 12h post vaccination and it reduces by 48h. The response also reduces with increased inoculum dosage.

There are several reports of antiviral activity resulting from vaccination of an insect with inactivated virus preparations (Raheja and Brooks, 1971). Aizawa (1954) vaccinated the silkworm pupae, 1-3 times at interval of 24h and challenged with active virus, 32h after the inoculation. The vaccination was effective in preventing some of the pupae from dying due to viral infection. Attenuated cytoplasmic polyhedrosis virus is also known to protect silkworm against cytoplasmic polyhedrosis (Liu Shi Xian and Zhong, 1988). Antiviral immunity was also reported in greater wax moth against densovirus (Odier and Vago, 1973).

Table I. Effect of vaccination in the development of nuclear polyhedrosis in silkworm *Bombyx mori* L.

Tableau I. Effet de la vaccination sur le développement de la polyédrose nucléaire chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

Treatment	% cumulative mortality due to BmNPV infection (DACI)				
	6	8	10	12	14
Traitement	% cumulé de mortalité due à l'infestation BmNPV (DACI)				
	6	8	10	12	14
Vaccination after inoculation <i>Vaccination après l'inoculation</i>	0.00	1.33	2.67	6.33	14.67 (22.50)
Pre-vaccination inoculation <i>Vaccination avant l'inoculation</i>	10.33	15.67	19.67	23.00	40.33 (39.42)
Inoculated control / <i>Témoin inoculé</i>	8.33	19.67	20.67	32.67	43.67 (41.35)
Vaccinated control / <i>Témoin vacciné</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00(0.00)
Normal control / <i>Témoin normal</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 (0.00)
				SE ±	0.36
				CD at 5%	1.18

DACI: Days after challenge inoculation / *Jours après l'inoculation d'attaque.*

Vaccine dose: 20µg/ml / *Dose de vaccin : 20 µg/ml.*

Inoculum dose: 1×10^7 BmNPV polyhedra/ml. / *Dose d'inoculum : 1×10^7 polyèdres BmNPV / ml.*

Time lag between vaccination and inoculation and vice-versa 24h / *Laps de temps entre le vaccin et l'inoculation et vice-versa 24h.*

The data represent an average of three replications. / *Les données représentent une moyenne de trois répétitions.*
Figures in parentheses are angular transformed values / *Les chiffres entre parenthèses sont des valeurs angulaires transformées.*

These notes apply to all the following tables / *Ces notes s'appliquent à tous les tableaux suivants.*

Table II. Effect of vaccine dosage in the development of defence response against nuclear polyhedrosis.

Tableau II. Effet de la dose de vaccin sur le développement de la réponse défensive contre la polyédrose nucléaire.

Vaccine dosage (µg/ml)	% cumulative mortality due to BmNPV infection (DACI)				
<i>Dose de vaccin (µg/ml)</i>	% cumulé de mortalité due à l'infestation BmNPV (DACI)				
	6	8	10	12	14
5	1.67	4.33	10.33	17.33	40.67 (39.62)
10	1.33	2.33	4.33	14.67	36.33 (37.06)
20	0.00	1.67	4.33	4.33	14.67 (22.50)
40	0.00	1.33	3.33	3.33	15.33(23.04)
Inoculated control / <i>Témoin inoculé</i>	12.67	23.33	32.67	32.67	42.67 (40.78)
Vaccinated control / <i>Témoin vacciné</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00(0.00)
Normal control / <i>Témoin normal</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00(0.00)
				SE ± :	0.39
				C. D. at 5%	1.22

Table III. Determination of effective time of vaccination in the development defence response in silkworm against nuclear polyhedrosis.

Tableau III. Détermination du moment efficace de la vaccination pour le développement d'une réponse défensive chez le ver à soie contre la polyédrose nucléaire.

Challenge inoculation (hours after vaccination)	% cumulative mortality due to BmNPV infection (DACI)				
<i>Inoculation d'attaque (heures après la vaccination)</i>	% de mortalité cumulée due à l'infestation BmNPV (DACI)				
	6	8	10	12	14
6	8.33	12.67	15.67	17.67	24.33 (29.55)
12	3.33	5.33	7.33	10.67	11.67(19.97)
18	0.00	1.33	4.00	7.33	10.33(18.74)
24	0.00	1.33	2.33	4.00	12.67(20.83)
48	3.33	7.67	9.67	13.67	28.33(32.16)
Vaccinated control / <i>Témoin vacciné</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00(0.00)
Inoculated control / <i>Témoin inoculé</i>	15.67	20.67	24.67	34.67	42.33(40.59)
				SE± :	0.24
				C. D. at 5%	0.74

Table IV. Effect of vaccination against different dosages of BmNPV inoculum in the development of defence response against nuclear polyhedrosis in silkworm.

Tableau IV. Effet de la vaccination avec différentes doses d'inoculum de BmNPV sur le développement d'une réponse défensive contre la polyédrose nucléaire chez le ver à soie.

BmNPV:PIB Inoculum (dose/ml)		% cumulative mortality due to BmNPV infection (DACI)				
Inoculum BmNPV PIB (dose/ml)		% cumulé de mortalité due à l'infestation BmNPV (DACI)				
		6	8	10	12	14
1×10^1	Treatment / Traitement	0.00	1.33	2.33	5.33	12.67 (20.83)
	Control / Témoin	13.67	18.67	20.67	23.33	33.67 (35.46)
1×10^2	Treatment / Traitement	0.00	2.33	4.33	6.33	16.67 (24.09)
	Control / Témoin	17.33	20.67	22.67	34.33	43.67 (41.35)
1×10^3	Treatment / Traitement	2.33	6.67	8.33	14.67	22.33 (27.52)
	Control / Témoin	20.67	25.00	30.33	31.67	43.67 (41.35)
1×10^4	Treatment / Traitement	3.33	8.33	16.67	21.00	28.67 (32.37)
	Control / Témoin	21.33	26.00	34.67	38.33	47.00 (43.27)
Source		SE $\pm$ / Ecart type		C.D. at 5%		
Treatments / Traitements		0.22		0.68		
Controls / Témoin		0.16		0.48		
Treatments and Control / Traitements et témoin		0.32		0.96		

The vaccines have proved to be a boon in the prevention of human disability, mortality and economic loss in agriculture, forestry and livestock rearing (Kurstak and Marusyk, 1984) caused by specific viral infections. In insects, in general the induced immunity is rapidly acquired with single inoculation of killed antigen and the immunity is enhanced with repeated inoculations. Such acquired immunity generally remains for a brief period which may last upto 2 weeks (Tanada and Kaya, 1993). The present study also points to the development of induced immunity. In insects, the immune factor responsible for immunity is not well understood. Interferon is widely recognised as an effective antiviral agent that is produced in vertebrate, especially mammals and birds. Several attempts have been made to detect interferon in insects, but most of them have been unsuccessful. Garzon and Kurstak (1969) have reported, in greater wax moth larva infected with a NPV, a substance with biological functions similar to those of interferon. Interferon inducers such as poly-IC and 2.5A have been known to increase antiviral responses against cytoplasmic polyhedrosis (Zong W., Huang Ziran and Liu Shi Xian 1988).

Table V. Effect of multiple vaccination in the prevention of BmNPV infection in silkworm.

Tableau V. Effet de vaccinations multiples sur la prévention de l'infestation par le BmNPV chez le ver à soie.

Vaccination stage (Instar)	% cumulative mortality due to BmNPV infection (DACI)							% reduction in mortality by 18 th day
Stade de vaccination (Age larvaire)	% cumulé de mortalité due à l'infestation par BmNPV (DACI)							% de baisse de la mortalité au 18 ^{ème} jour
	6	8	10	12	14	16	18	
I	0.00	1.33	4.67	5.33	16.33	18.33	24.33 (29.55)	48.59
I + II	0.00	0.00	0.00	6.67	7.67	8.33	12.33 (20.50)	73.94
I + II + III	0.00	0.00	0.00	4.67	5.00	6.33	7.00 (15.34)	85.21
Vaccinated control <i>Témoin vacciné</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 (0.00)	-
Inoculated control <i>Témoin inoculé</i>	10.67	23.33	33.33	38.67	44.67	45.33	47.33 (43.46)	
SE $\pm$:							0.19	
C. D. at 5 % :							0.64	

A virus inactivation principle was detected in the haemolymph of the silkworm infected with NPV (Aizawa 1954; 1970). The defence responses reported in *B. mori* are in the form of resistance (Aizawa, 1970; Watanabe and Maeda, 1981; Eguchi, 1986), production of anti-viral substance in the gut (Aizawa, 1962; Hayashiya *et al.*, 1968) and/or viral inhibitory factors in the haemolymph (Aizawa, 1970). It was also possible to employ the attenuated virus to protect the silkworm against cytoplasmic polyhedrosis (Aruga *et al.*, 1963; Aruga and Hashimoto 1965). Liu Shi Xian and Zhong (1988) have also reported a reduction of loss due to cytoplasmic polyhedrosis by 30-60% and 40-60% by oral vaccination with attenuated BmCPV at the laboratory and farmer's level respectively. The protection offered by attenuated BmNPV, at laboratory level is encouraging with reduction in development of disease by 48.59% with single vaccination, 73.94% with double and 85.21% with triple vaccination. However, the active principle responsible for protection is still not clear. It is also essential to understand the mechanism behind the protection of silkworm on vaccination with attenuated viruses.

ACNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the facilities provided by the Central Silk Board, Bangalore and the Research Council and Research Advisory Committee of C.S.R.T.I., Mysore for the encouragement and guidance.

REFERENCES

- AIZAWA K. (1954) Immunological studies of the silkworm jaundice virus. III. Experiments on the defence of infection in the silkworm jaundice. *Virus* 4, 245-248.
- AIZAWA K. (1962) Antiviral substance in the gut of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect. Pathol.* 4, 72-76.
- AIZAWA K. (1970) Defence reactions of the silkworm, *Bombyx mori* against the nuclear polyhedrosis. Proc. of IV Intl. Colloquium on Insect Pathology, College Park, Maryland, USA. Pp. 352-356.
- ARUGA H., WATANABE H., NAGANO H. (1963) Interference by the heat inactivated virus on the cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Serie. Sci. Jpn* 342, 51-57.
- ARUGA H., HASHIMOTO Y. (1965) Interference between UV-inactivated and active cytoplasmic polyhedrosis viruses in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Serie. Sci. Jpn.* 34, 351-355.
- CHISHTI M. Z., SOHAF K. A. (1990) Studies on the polyhedral diseases of silkworm, *Bombyx mori* L. in Jammu and Kashmir state. *Indian J. Serie.* 29, 155-157.
- EGUCHI R., FURUTA Y., NINAKI O. (1986) Dominant non-susceptibility to DNV in the silkworm *Bombyx mori* L. *J. Serie. Sci. Jpn.* 55, 177-178.
- GARZON S., KURSTAK E. (1969) Interférence sélective au niveau de tissus entre le virus de la polyédrose nucléaire (VPN) et le virus de la densovirus (VDN) et présence d'une substance de type interféron chez un arthropode. *Rev. Can. Biol.* 28, 89-94.
- HAYASHIYA K., NISHIDA J., MATSUBARA F. (1968) Inactivation of nuclear polyhedrosis virus in the digestive juice of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. I. Comparison of anti-viral activities in the digestive juice of larvae reared on natural and artificial diets. *Japan J. Appl. Ent. Zool.* 12, 189-193.
- KURSTAK E., MARUSYK R. G. (1984) Control of virus diseases. Dekker, New York, USA.
- LIU SHI XIAN, ZHONG W. B. (1988) The research channels in the prevention and control of silkworm diseases. *Sericologia* 29, 287-295.
- NATARAJU B., DATTA R. K., BAIG M., BALAVENKATASUBBAIAH M., SAMSON M. V., SIVAPRASAD V. (1998) Studies on the prevalence of nuclear polyhedrosis in sericultural areas of Karnataka. *Indian J. Serie.* 37, 154-158.
- ODIER F., VAGO C. (1973) Mise en évidence d'une immunité antivirale chez les insectes. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser.* D277, 1257-1260.
- RAHAJA A. K., BROOKS M. A. (1971) Inability of the forest test caterpillar *Malacosoma disstria*, to acquire resistance to viral infection. *J. Invertebrate. Pathol.* 17, 136-137.
- SUGIMORI H., NAGAMINE T., KOBAYASHI M. (1990) Analysis of structural polypeptides of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Entomol. Zool.* 25, 67-77.
- TANADA Y., KAYA H. K. (1993) Insect Pathology. Academic Press, Inc. California, USA.
- WATANABE, MAEDA (1981) Genetically determined non-susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* to infection with a densovirus (densovirus). *J. Invertebr. Pathol.* 38, 370-373.
- ZHONG WENBIAO, HUANG ZIRAN, LIU SHI XIAN (1988) Poly I:C, 2', 5'- OligO(A) and their application in the antiviral experiment of silkworm *Bombyx mori* L. Review. *Sericologia* 8, 361-373.

ETUDES SUR LA MISE AU POINT D'UN VACCIN ORAL CONTRE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

B. NATARAJU, V. SIVAPRASAD* & R. K. DATTA

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

*Le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) a été atténué et testé pour son potentiel comme vaccin oral chez le ver à soie contre une inoculation avec des corps d'inclusion polyédriques de BmNPV. Le BmNPV atténué comme vaccin oral protège les vers à soie contre l'infection BmNPV pendant une courte période (6 à 8 jours). Il est efficace à une dose élevée (20 µg/ml) et l'efficacité se manifeste quand les inoculations ont lieu 12 à 24 h après le vaccin. Une triple vaccination pourrait protéger les vers à soie pendant une période comparativement plus longue et faire baisser la mortalité due à la polyédrose nucléaire de 85,21 %.*

INTRODUCTION

Parmi les maladies du ver à soie, la polyédrose nucléaire est courante et domine toute l'année dans les pays séricicoles. En Inde, la polyédrose nucléaire concerne 33 à 50 % des larves malades et est très courante en été (Christi et Sahaf, 1990 ; Nataraju et coll., 1998). A présent on lutte contre la maladie en élevant les vers à soie sur du mûrier nutritif dans un environnement sain. La maladie est provoquée par un baculovirus, le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) et la sensibilité à l'infection chez le ver à soie est sous le contrôle de plusieurs gènes. La tolérance à la maladie varie selon les lignées de vers à soie. Dans le domaine biologique, si l'hôte n'a pas de résistance à une infection virale particulière, la vaccination de l'hôte est l'une des approches les plus recherchées pour prévenir l'infection. Cet article présente les résultats de l'étude sur la mise au point d'un vaccin oral contre la polyédrose nucléaire chez le ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Des corps d'inclusion polyédriques BmNPV (BmNPV PIB) ont été recueillis sur des vers à soie inoculés avec la maladie de manière expérimentale. Les BmNPV sont libérés des corps d'inclusion grâce à un traitement alcalin, sédimentés, purifiés par centrifugation sur gradient de saccharose (30 à 60 %, 25 000 tpm, 4° C) et quantifiés (Sugimori et coll., 1990). La protéine de la polyédrine est précipitée à partir des BmNPV BIP traités à l'alcali, purifiée et quantifiée. Le BmNPV est atténué en suspendant les virions dans une solution aqueuse contenant 0,02 % de formaldéhyde pendant une période de 36 h à 26 ± 1°C. Les virions sont sédimentés, nettoyés dans du sérum physiologique stérile grâce à des centrifugations répétées (30 000 tpm, 120 min. A 4° C) et suspendus dans du sérum physiologique. On procède à une évaluation biologique pour vérifier que la polyédrine purifiée et les virions atténués ne sont pas infectieux pour le ver à soie.

* Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute, Hindupur - 515 211, Andhra Pradesh, Inde.

Le BmNPV atténué et la polyédricine à différentes doses (5, 10, 20 et 40 µg/ml) sont testés individuellement pour leur efficacité comme vaccin grâce à une vaccination orale des vers à soie inoculés (inoculation d'attaque) avec différentes doses de BmNPV PIB (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 et 1×10^4 PIB/ml) 24 heures avant ou 24 h après le vaccin. Les virions atténués de BmNPV PIB sont répandus sur les feuilles de mûrier, qui sont données en nourriture à des vers à soie de la lignée NB18. Pour déterminer le moment efficace de la vaccination, les BmNPV atténués (20 µg/ml) sont donnés en nourriture aux vers à soie et évalués contre des polyèdres de BmNPV à 1×10^2 /ml, après un intervalle de 6, 12, 18 et 24h. Les vers à soie sont inoculés avec le vaccin BmNPV PIB le deuxième jour du cinquième âge. Pour déterminer l'efficacité de la vaccination multiple, on procède à une inoculation d'attaque le deuxième jour du premier âge, et on teste une vaccination unique, double et triple 24 h après l'inoculation pendant le premier âge (vaccination unique), 24 h après l'inoculation et à nouveau immédiatement après la première mue (double vaccination), et 24 h après l'inoculation, à nouveau immédiatement après la première mue et après la deuxième mue (vaccination triple). L'efficacité et la dose fonctionnelle sont déterminées grâce à une l'évaluation biologique de l'infection par le BmNPV et en évaluant la mortalité due à la maladie. Les larves traitées et témoins sont élevées pendant une période de 14 à 18 jours et l'infection et la mortalité cumulatives dues à BmNPV sont enregistrées tous les jours grâce à un examen visuel et microscopique. Chaque traitement comprend trois répétitions de 50 larves chacune.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe d'après les résultats, que le BmNPV atténué donne une protection contre le développement de la maladie chez le ver à soie. On observe que le BmNPV atténué donne une protection contre des inoculations de BmNPV PIB après la vaccination des vers à soie pendant une période de 6 à 8 jours. La mortalité cumulative suite à une seule vaccination après l'inoculation (0 % le 6^{ème} jour, 1,33 % le 8^{ème} jour, 6,33 % le 12^{ème} jour et 14,67 % le 14^{ème} jour) est significativement plus faible que celle du témoin inoculé non vacciné (8,33 % le 6^{ème} jour, 19,67 % le 8^{ème} jour, 32,67 % le 12^{ème} jour et 43,67 % le 14^{ème} jour). On observe que le vaccin est comparativement inefficace contre une inoculation BmNPV avant la vaccination avec une mortalité cumulative égale à celle du témoin inoculé non vacciné (10,33 % le 6^{ème} jour, 15,67 % le 8^{ème} jour, 23 % le 12^{ème} jour et 40,33 % le 14^{ème} jour). La protéine de polyédricine dérivée des polyèdres testés comme vaccin n'est pas efficace contre l'inoculation BmNPV PIB (Tableau I).

Le BmNPV atténué est efficace à la dose de 20-40 µg/ml ; à des doses plus faibles (5 à 10 µg/ml) le potentiel de protection baisse beaucoup. La mortalité cumulative avec 5 à 10 µg/ml est de 36,33 à 40,67 % au 14^{ème} jour, tandis qu'avec 20 à 40 µg/ml, elle est de 14,67 à 15,33 % (Tableau II).

Le vaccin est le plus efficace 12 à 24 h après l'inoculation. La mortalité est comprise entre 11,67 et 12,67 %. L'efficacité de la vaccination diminue si la vaccination a lieu 6 h après l'inoculation et 48 h après l'inoculation. La vaccination 6 h après l'inoculation entraîne 24,33 % de mortalité tandis que la vaccination 48 h après entraîne une mortalité de 28,33 % (Tableau III).

Le vaccin est le plus efficace à des doses faibles (1×10^1 et 1×10^2 BIP BmNPV/ml) d'inoculum ; à une dose plus élevée (1×10^3 et 1×10^4 BmNPV PIB/ml) son efficacité baisse (Tableau IV).

Une vaccination unique au 1^{er} âge 24 h après l'inoculation, une double vaccination, une fois 24 h après l'inoculation pendant le 1^{er} âge et encore pendant le 2^{ème} âge et une vaccination triple, une fois 24 h après l'inoculation pendant le 1^{er} âge, une fois pendant le 2^{ème} et le 3^{ème} âge retarde le développement de la maladie. Avec une vaccination unique, on observe une mortalité 8 jours après l'inoculation tandis qu'avec une vaccination double et triple on observe une mortalité 10 jours après l'inoculation. Dans le cas d'une vaccination unique, la mortalité au 18^{ème} jour est de 24,33 % tandis qu'avec une vaccination double et triple elle est de 12,33 % et 7 % respectivement. La vaccination triple diminue l'infection de 85,21 % contre 73,94 % pour la vaccination double 18 jours après l'inoculation. La vaccination unique diminue le niveau d'infection de 48,59 % (Tableau V).

Il est clair que le BmNPV atténué retarde le développement de la polyédrose nucléaire de 6 à 8 jours avec une vaccination unique. La maladie est retardée pendant une courte durée. Une vaccination triple retarde encore plus le développement de la maladie. La polyédrine tout comme l'inoculation avant la vaccination ne retardent pas le développement de la maladie. La réponse au vaccin se développe 12 h après la vaccination et elle diminue au bout de 48 h. La réponse diminue aussi avec l'augmentation de la dose d'inoculum.

Il existe plusieurs rapports sur l'activité antivirale à la suite de la vaccination d'un insecte avec des préparations de virus inactivés (Raheja et Brooks, 1971). Aizawa (1954) a vacciné des chrysalides de vers à soie 1 à 3 fois, avec un intervalle de 24 h et les a attaquées avec un virus actif, 32 h après l'inoculation. Le vaccin empêche la mort de certaines chrysalides due à l'infection virale. On sait aussi que le virus de la polyédrose cytoplasmique atténué protège le ver à soie contre la polyédrose cytoplasmique (Liu Shi Xian et Zhong, 1988). On a aussi signalé une immunité antivirale chez la teigne des ruches contre le virus de la densonuelose (Odier et Vago, 1973).

Les vaccins se sont révélés une bénédiction pour prévenir l'invalidité, la mortalité humaines et les pertes économiques pour l'agriculture, la forêt et l'élevage du bétail (Kurstak et Marusyk, 1984), provoquées par des infections virales spécifiques. En général chez les insectes, l'immunité induite s'acquiert rapidement avec une seule inoculation d'un antigène tué et l'immunité est renforcée avec des inoculations répétées. En général, une immunité acquise de la sorte dure pendant une courte période, jusqu'à 2 semaines (Tanada et Kaya, 1993). L'étude présente indique aussi le développement d'une immunité induite. Chez les insectes, on ne comprend pas bien le facteur immunitaire responsable de l'immunité. L'interféron est largement reconnu comme un agent antiviral efficace qui est produit chez les vertébrés, surtout chez les mammifères et les oiseaux. Plusieurs tentatives ont été engagées pour détecter l'interféron chez les insectes, mais la plupart d'entre elles n'ont pas réussi. Garzon et Kurstak (1969) ont observé chez des larves de la teigne des ruches infestées par NPV, une substance ayant des fonctions biologiques similaires à celles de l'interféron. On sait que les inducteurs d'interféron comme le poly-IC et le 2.5A augmentent les réponses antivirales contre la polyédrose cytoplasmique (Zong W., Huang Ziran et Liu Shi Xian 1988).

Un principe inactivateur de virus a été détecté dans l'hémolymphe du ver à soie infesté par le NPV (Aizawa 1954 ; 1970). Les réponses de défense observées chez *B. mori* se présentent sous la forme d'une résistance (Aizawa, 1970 ; Watanabe et Maeda, 1981 ; Eguchi, 1986), de la production d'une substance anti-virale dans l'intestin (Aizawa, 1962 ; Hayashiya et coll., 1968) et/ou de facteurs inhibiteurs viraux dans l'hémolymphe (Aizawa, 1970). Il a aussi été possible d'employer un virus atténué pour protéger le ver à soie contre la polyédrose cytoplasmique (Aruga et coll., 1963 ; Aruga et Hashimoto 1965). Liu Shi Xian et Zhong (1988) ont aussi signalé une baisse des pertes due à la polyédrose cytoplasmique de 30 à 60 % et de 40 à 60 % respectivement en laboratoire et dans les exploitations grâce à la vaccination orale avec du BmCPV atténué. La protection qu'offre le BmNPV atténué en laboratoire est encourageante ; on observe une baisse du développement de la maladie de 48,59 % avec une seule vaccination, de 73,94 % avec une double vaccination et de 85,21 % avec une triple vaccination. Cependant le principe actif responsable de la protection n'est toujours pas établi. Il est essentiel de comprendre le mécanisme de protection du ver à soie suite à la vaccination avec des virus atténués.

SEASONAL BIOASSAY MOULTING RESPONSE OF SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) TO THE NUTRITIVE QUALITY OF PRESERVED MULBERRY (*MORUS* SPP.) LEAF

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

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

Tender top (1-4th) mulberry leaves harvested from irrigated mulberry garden were studied under 11 different methods of preservation for 12 hours and the data on moisture content, total protein, non-protein nitrogen (npN), starch and sugar contents recorded. Bioassay studies were simultaneously conducted by moulting test. Observations revealed significant differences between the methods of preservation. The poor moulting ratio, larval weight and growth rates were recorded in dry treatments associated with lower leaf moisture, protein and sugar contents. Lower npN, higher protein and sugar content of leaf preserved under wet treatments were recorded in general and buried pot in particular favoured higher moulting ratio, larval weight and growth rate.

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

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.) leaf quality and silkworm growth are directly correlated to the larval development and moulting (Benjamin and Anantharaman, 1990) influencing the cocoon yields (Purohit and Pavankumar, 1996). Biochemical degradations during post harvest preservation in addition to the variety, season and agronomical input influence the feed value of leaf. Leaf preservation upto 12 hours (some times upto 20 hours) is inevitable and during this period the leaves loose moisture and undergo biochemical changes (Govidan *et al.*, 1988) which are also influenced by the environment of preservation (Krishnaswami *et al.*, 1971) resulting in altered growth of silkworm larvae (Muniraju, 1995). 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 in respect of seasonal variations and environmental influence is extremely scanty, particularly under the tropics. Studies were carried out on these aspects for optimising the requirements of young age silkworm (Muniraju, 1995). 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 (Choudhury and Giridhar, 1987) with 5 harvests/annum and a pruning for every harvest. Tender leaf at 1-4 terminal positions on healthy shoots, as recommended for young age (up to the 2nd 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 covered with wet gunny cloth (farmer's 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 × 76.2 cm with wooden strips 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 desired level. Temperature and humidity were recorded once in 3 hours for 24 hours with parallel sets of treatments maintained in the same vicinity without the leaf. Leaf moisture loss, total nitrogen (Jackson, 1973), soluble protein (Lowry *et al.*, 1951), starch (Mc Cready *et al.*, 1950) and soluble sugar (Dubios *et al.*, 1956), contents were estimated using the leaf from each treatment after preservation for 12 hours. The non-protein nitrogen (npN) content was calculated from total nitrogen and protein nitrogen values. Bioassay moulting trials (Iwanari and Ohno, 1969; Hamano *et al.*, 1985) were simultaneously conducted 3 times in each season with three replicate batches of larvae from a diseased free laying (dfl) each (approximately 400 larvae) of NB4D2 silkworm bivoltine race. Larvae were fed with 12 hr preserved leaf separately for each treatment and for each moult. Isolation chamber (Sekharappa *et al.*, 1995) was used to maintain the recommended temperature (27-28° C) and humidity (85-90%). The moulted larvae were separated from the rearing and counted once in every 3 hours up to the completion of each moult. Observations on the moulting ratio, larval weight, larval duration were recorded and growth rates calculated separately for the first and second moults. 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.

RESULTS

Environmental variations:

During summer the lowest temperature (25° C) was recorded in T9 with fluctuations of 1.4° C followed by T2, T8, T4 and T6 (26 to 26.8° C). Similar trend of temperature maintenance was recorded for rainy and winter seasons also (Table I). Maximum humidity (96 to 99%) with least fluctuations (up to 3%) was recorded in T9 followed by T8, T6, T4 and T2 (92 to 94.8, 86.5 to 90.21, 86.5 to 93.5, 82.8 to 96% respectively) (Table II). 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.

Leaf moisture and biochemical parameters:

The lowest values of leaf moisture loss during summer (2.17%) in T9 were followed by T6 (2.95%) and T8 (3.8%) which differed significantly from all other treatments, the highest values being in T1 and T3 (16.79 and 14.92% respectively). Lowest values of moisture loss (1.69 and 2.68, 1.49 and 2.83, 1.65 and 2.63% during summer, rainy and winter seasons respectively) recorded in T10 and T11 during the three seasons were, however, owing to moisture accumulation on leaf surface. A

similar trend was recorded for rainy and winter seasons also (Table III). The highest values of total nitrogen contents were recorded in T9 in both summer and winter season, while in T4 in the rainy season (3.55%). Higher values of protein contents were recorded in T9 in all the three seasons, which differed significantly ($P > 0.01$) from all other treatments during the three seasons except with T4 in summer and rainy seasons. Lowest values of soluble proteins were recorded in T5, T10 and T1 during summer, rainy and winter seasons respectively. In contrast, higher values of npN contents were recorded in T11 (0.80%) followed by T1, T10, T3 and T7 (0.55-0.36%) during summer and similar trend was recorded for rainy and winter seasons. Maximum values of starch were recorded in T1 (4.36%) followed by T7, T11, T8, T3 and T5 (4.22 to 4.05%) during summer and the similar trend was maintained during other seasons. Similarly, sugar contents were higher in T9 (13.67, 13.76 and 14.28%) during all the seasons, compared to T5 and T1 during summer and rainy seasons and T1 and T3 during winter season (Table III).

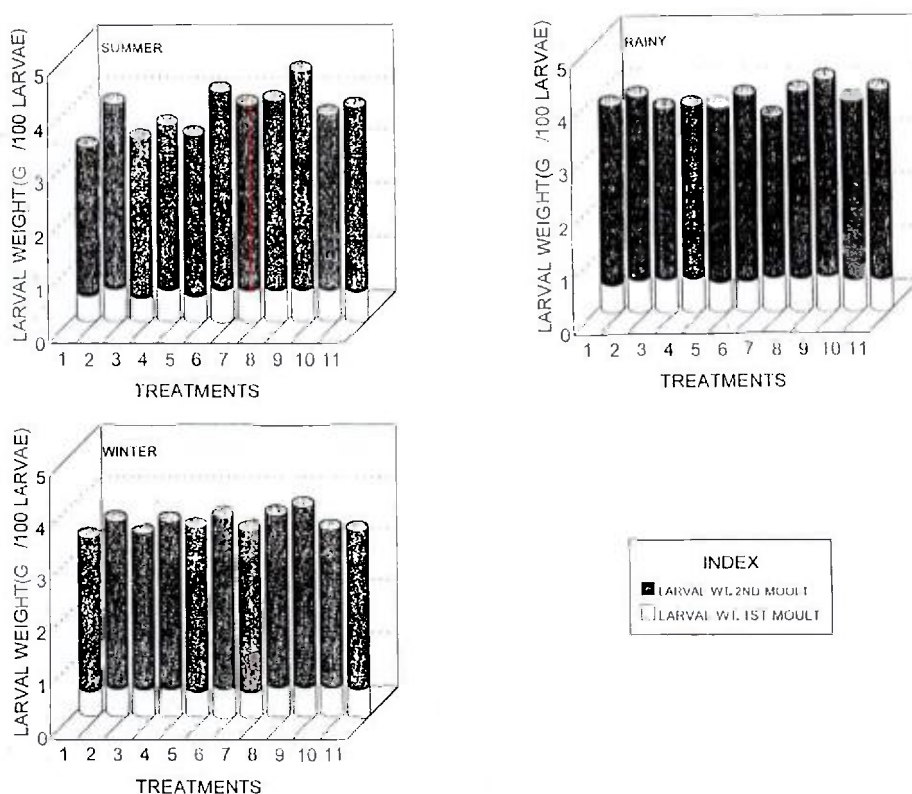


Fig. 1. Preservation of leaf on larval weight of silkworm *Bombyx mori* L.

Fig. 1. Effets de la conservation de la feuille sur le poids larvaire du ver à soie *Bombyx mori* L.

Table 1. Leaf preservation: temperature (° C) variations over seasons (Mean of 3 trials with 3 replicates each).*Tableau 1. Conservation de la feuille : variations de température (° C) pendant les saisons. (Moyenne de 3 essais de 3 répétitions).*

Treatments	Summer / Eté				Rainy / Pluvieux				Winter / Hiver			
Traitements	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne
T1	27.6	30.0	2.4	28.6	24.0	25.0	1.0	24.3	23.5	25.0	1.5	24.3
T2	26.0	28.6	2.6	27.3	23.5	24.3	0.8	23.84	23.0	24.0	1.0	23.4
T3	27.3	30.0	2.7	28.5	23.1	24	0.9	23.82	24.0	24.9	0.9	24.4
T4	25.8	26.3	0.5	25.2	22.4	23.9	1.5	23.38	23.0	24.0	1.0	23.4
T5	28.3	31.3	2.5	30.2	24.6	25.0	0.4	24.93	24.0	26.3	2.3	25.5
T6	26.0	28.8	2.8	27.8	24.1	25.0	0.9	24.43	23.0	24.4	1.4	23.5
T7	28.3	29.1	0.8	28.7	23.0	24.0	1.0	23.48	23.3	24.0	0.7	23.8
T8	26.0	26.5	0.5	26.2	22.5	23.6	1.1	23.2	23.0	24.0	1.0	23.7
T9	25.0	26.4	1.4	25.9	22.5	23.8	1.3	23.22	23.0	24.0	0.5	23.9
T10	28.0	30.5	2.5	29.8	24.0	24.8	0.8	24.81	23.8	24.0	0.2	23.9
T11	28.0	31.5	3.5	30.2	23.8	24.9	1.1	24.22	23.5	24.0	0.5	23.8
F test	**	**			**	**			**	**		
CD @ 5%	0.655	0.76			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 au seuil de 1 %.*

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 (%) pendant les saisons. (Moyenne de 3 essais de 3 répétitions chacun).

Treatments	Summer/ Eté				Rainy / Saison des pluies				Winter / Hiver			
Traitements	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne	Min.	Max.	Diff.	Mean Moyenne
T1	56.8	65.3	8.5	61.3	80.0	91.0	11.0	86.1	75.0	88.3	13.3	80.2
T2	82.8	96.0	13.2	89.5	87.0	94.3	7.3	91.2	79.5	91.0	11.5	86.6
T3	62.0	72.0	10.0	66.3	77.5	91.0	13.5	84.7	77.8	83.0	5.2	80.8
T4	86.5	93.5	7.0	89.5	87.0	96.0	9.0	92.5	85.8	92.0	6.3	89.6
T5	59.3	68.5	9.3	63.6	75.0	85.0	10.0	82.3	65.3	77.8	12.5	70.9
T6	86.5	90.21	3.7	87.9	83.0	88.8	5.8	85.1	80.56	90.2	9.6	85.4
T7	71.3	77.5	6.2	74.6	83.0	92.8	9.8	89.9	77.8	88.3	10.5	84.5
T8	92.0	94.8	2.8	92.8	88.3	96.0	7.7	93.7	85.3	91.0	5.7	89.2
T9	96.0	99.0	3.0	97.9	92.8	96.0	3.2	94.9	89.5	90.8	1.3	90.5
T10	62.0	72.0	10.0	68.8	80.9	90.0	9.1	85.3	79.1	89.9	10.8	85.2
T11	64.0	76.0	12.0	69.1	84.2	90.0	5.8	87.5	80.0	90.0	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 au seuil de 1 % .

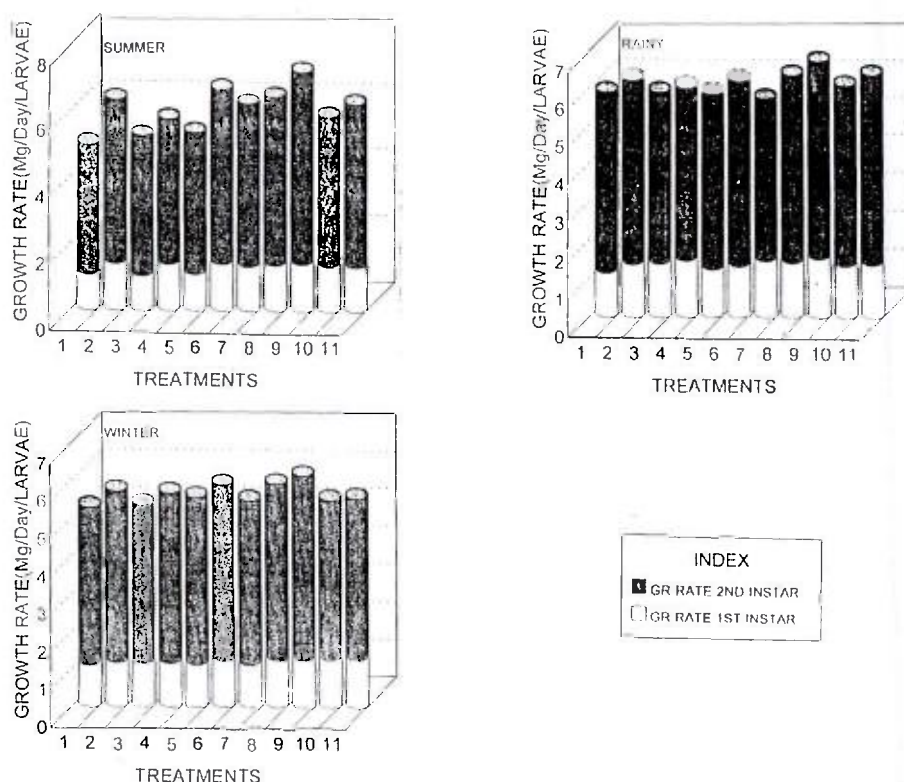


Fig. 2. Preservation of leaf on larval growth rates (G. R.) of silkworm *Bombyx mori* L.

Fig. 2. Effets de la conservation de la feuille sur les taux de croissance larvaire (G. R.) du ver à soie *Bombyx mori* L.

Moulting parameters:

Higher values of moulting ratio (Table IV) were recorded for T2 and T6 to T11 (100%) for both 1st and 2nd moult at 18th hour during summer, while in rainy. T9 recorded higher values (97%) followed by T8, T2, T1, T6 (94, 92, 89, 88%) and least was in T11 (63%) for 2nd moult. A similar trend was recorded for the winter season also (Table IV). A higher larval weight of 0.61 and 4.1g/100 larvae was recorded in T9 after 1st and 2nd moult respectively followed by T6, (0.61 and 3.73g/100 larvae), T7 (0.58 and 3.49), T2 (0.61 and 3.49g), T11 (0.58 and 3.47g) compared to the lower values of larval weight recorded in T1 (0.05 and 2.79 g) during summer. A similar trend of larval weights was recorded for rainy and winter seasons for both the instars (Fig. 1). Maximum growth rates of 1.43 and 5.83 mg/day were recorded in T9 followed by T6, T7, T2 and T11 for 1st age (0.58 to 0.61 mg/day) and 2nd age (3.47 to 3.73 mg/day) (Fig 2).

Table III. Biochemical levels of 12 hour preserved mulberry leaf. (Mean of 3 trials with 3 replicates each).*Tableau III. Niveaux biochimiques dans les feuilles de mûrier conservées depuis 12 heures. (moyenne de 3 essais avec 3 répétitions chacun).*

Treatment	Summer						Rainy					
	Moisture loss	Total nitrogen	Soluble protein	npN	Starch	Soluble sugars	Moisture loss	Total nitrogen	Soluble protein	npN	Starch	Soluble sugars
<i>Traitement</i>	<i>Eté</i>						<i>Saison des pluies</i>					
	<i>Perte d'humidité (%)</i>	<i>Azote total (%)</i>	<i>Protéines solubles (%)</i>	<i>Anp (%)</i>	<i>Amidon (%)</i>	<i>Sucres solubles (%)</i>	<i>Perte d'humidité (%)</i>	<i>Azote total (%)</i>	<i>Protéines solubles (%)</i>	<i>Anp (%)</i>	<i>Amidon (%)</i>	<i>Sucres solubles (%)</i>
T1	16.79	3.51	20.06	0.55	4.36	9.65	13.15	3.21	21.95	0.25	2.45	9.12
T2	10.71	3.80	21.31	0.21	3.66	11.50	3.17	3.41	23.77	0.01	2.35	14.24
T3	14.92	3.64	20.49	0.41	4.13	10.64	11.01	3.28	22.76	0.15	2.31	11.14
T4	10.37	3.94	22.19	0.09	3.97	12.22	4.52	3.55	24.60	0.06	2.30	12.70
T5	12.05	3.64	18.95	0.38	4.05	7.90	13.75	3.03	22.75	0.41	2.56	10.22
T6	2.95	3.76	20.56	0.26	3.90	11.13	3.47	3.29	23.49	0.16	2.40	10.49
T7	9.90	3.65	20.52	0.36	4.22	10.23	5.44	3.28	22.78	0.18	2.45	12.24
T8	3.80	3.79	21.42	0.25	4.17	12.05	4.94	3.43	23.68	0.01	2.44	13.23
T9	2.17	4.02	22.94	0.06	3.60	13.67	2.53	3.49	25.13	0.00	1.90	13.76
T10	1.69	3.43	19.63	0.53	3.84	11.79	1.49	3.14	21.41	0.35	1.93	12.13
T11	2.68	3.45	19.27	0.80	4.19	11.62	2.83	3.08	21.59	0.32	1.97	11.60
F test	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	NS	**
Cd@5%	2.131	0.119	0.746	0.026	0.600	1.006	0.119	0.119	1.118	0.168	—	0.884
Cd 1%	2.847	0.160	0.997	0.036	0.793	1.344	0.160	0.160	1.494	0.233	—	1.181

Note -

* Significant at 5% / * *Significatif au seuil de 5 %.*** Significant at 1% / ** *Significatif au seuil de 1 %*NS - Not significant / *Non significatif.*

Table III. (Continued).

Tableau III (Suite)

	Winter					
	Moisture loss	Total nitrogen	Soluble protein	npN	Starch	Soluble sugars
	<i>Hiver</i>					
	<i>Perte d'humidité (%)</i>	<i>Azote total (%)</i>	<i>Protéines solubles (%)</i>	<i>Anp (%)</i>	<i>Amidon (%)</i>	<i>Sucres solubles (%)</i>
T1	16.71	2.49	15.58	1.58	3.37	9.88
T2	4.30	2.74	17.12	1.30	3.02	10.63
T3	11.23	2.77	17.30	1.29	3.82	10.25
T4	4.88	2.81	17.59	1.26	3.42	12.63
T5	12.31	2.60	16.24	1.33	3.61	11.80
T6	3.36	2.72	17.01	1.48	3.30	14.40
T7	6.54	2.91	18.20	1.03	3.60	11.25
T8	4.02	3.04	19.02	1.27	3.42	12.56
T9	2.41	3.47	21.69	0.36	3.01	14.28
T10	1.65	3.09	19.34	1.38	3.76	10.92
T11	2.63	3.03	18.92	1.31	3.76	11.20
F-test	**	**	**	**	**	**
Cd 5%	1.055	0.091	0.566	0.852	0.695	0.695
Cd 1%	1.409	0.121	0.756	1.065	0.863	0.928

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

Table IV. Bioassay performance of 12 hour preserved mulberry leaf on moulting ratio (%) of *Bombyx mori* L. (Mean of 3 trials with 3 replications each)

Tableau IV. Essais biologiques avec des feuilles de mûrier conservées pendant 12 heures par mesure du taux de mue de *Bombyx mori* L. (moyenne de trois essais avec trois répétitions chacun).

Treatment	SUMMER				RAINY				WINTER			
	I Molt (hour)		II Molt (hour)		I Molt (hour)		II Molt (hour)		I Molt (hour)		II Molt (hour)	
	12 th	18 th	12 th	18 th	12 th	18 th	12 th	18 th	12 th	18 th	12 th	18 th
Traitement	ETE				SAISON DES PLUIES				HIVER			
	Mue I (hres)		Mue II (hres)		Mue I (hres)		Mue II (hres)		Mue I (hres)		Mues II (hres)	
	12 ^{ème}	18 ^{ème}	12 ^{ème}	18 ^{ème}	12 ^{ème}	18 ^{ème}	12 ^{ème}	18 ^{ème}	12 ^{ème}	18 ^{ème}	12 ^{ème}	18 ^{ème}
T1	32.00	88.00	20.00	81.00	54.00	64.00	89.00	89.00	43.00	85.00	28.00	63.00
T2	67.00	100.00	68.00	100.0	76.00	88.00	90.00	92.00	64.00	100.0	70.00	80.00
T3	27.00	89.00	45.00	94.00	68.00	85.00	55.00	66.00	43.00	85.00	58.00	77.00
T4	39.00	96.00	53.00	96.00	61.00	80.00	70.00	74.00	67.00	100.0	39.00	86.00
T5	33.00	86.00	24.00	88.00	66.00	82.00	88.00	85.00	36.00	68.00	36.00	87.00
T6	61.00	100.00	49.00	100.0	68.00	81.00	85.00	88.00	90.00	100.0	52.00	92.00
T7	44.00	100.00	37.00	93.00	62.00	77.00	83.00	84.00	68.00	79.00	41.00	73.00
T8	57.00	100.00	53.00	100.0	74.00	85.00	83.00	94.00	82.00	87.00	55.00	88.00
T9	53.00	100.00	58.00	100.00	77.00	92.00	93.00	97.00	90.00	100.00	64.00	92.00
T10	59.00	85.00	63.00	100.0	87.00	78.00	83.00	88.00	55.00	86.00	63.00	64.00
T11	55.00	86.00	52.00	100.0	83.00	63.00	54.00	63.00	43.00	85.00	60.00	80.00
F test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CD@5%	2.856	8.223	4.822	6.251	6.001	3.528	4.602	8.255	2.362	3.962	3.202	4.803
CD@1%	4.050	12.317	6.983	8.212	7.928	5.800	6.085	12.012	3.198	4.856	4.311	7.044

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

DISCUSSION

Water and nitrogen content of leaves are known to correlate with the growth and development of insects (Tinge and Singh 1980, Scriber 1982). The values of these parameters varied with the environment of the methods selected for leaf preservation in the present study. This was well pronounced in the dry treatments with higher values of leaf moisture loss and npN and lower values of proteins and sugars. In contrast, wet treatments recorded higher values of leaf proteins and sugar contents owing to degradation (Narasimhamurthy *et al.*, 1987) and conservation for longer periods (Himantharaj *et al.*, 1995).

Leaf moisture, protein and sugar contents were high during rainy season and were associated with better bioassay performances in respect of moulting ratio, larval weight and growth rate. Summer and winter seasons ranking 2nd and 3rd also corroborated with the leaf moisture, protein and sugar levels of the corresponding seasons. Among different methods evaluated in this study, T9 recorded the highest 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 temperature and > 90% RH (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 moulting 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 (Mac O Nanth, 1984). However, the extent of cooling and its variability among the treatments varied depending on surface to volume ratio exposed and material used apart from ambient temperature, humidity and wetting frequency. Surface to volume ratio (63.32) and water holding capacity (13-14%) being high 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 (6.2° C). The npN in the form of nitrates is non toxic to animals; but during long preservation the nitrates get reduced to nitrites which are toxic. The increased levels of soluble sugars of leaves in wet treatments favoured the nullifying toxic effects of nitrites (Mc Donald *et al.*, 1981).

In conclusion, preservation of tender leaf for the young age larvae, in earthen pots buried in moist sand recorded higher values of moulting parameters 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

- BENCHAMIN K. V., NAGARAJ C. S. (1987) Silkworm rearing techniques. In: Jolly, M. S. (ed.) *Appropriate Sericulture Techniques* (pp. 176). Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 8, pp. 63-106.
- BENCHAMIN K. V., ANANTHARAMAN K. V. (1990) Standardisation of moulting test to evaluate mulberry leaf quality under tropical conditions. *Ind. J. Seric.*, 29(2): 225-262.
- 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.
- DUBIOS 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.

- 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.
- HAMANO K., YAMAMOTO T., MUKAIYAMA F. (1985) Relationship between performance to artificial diet and feeding habit of the Silkworm *Bombyx mori*, *J. Seri. Sci. Jpn.*, 54(6): 495-499.
- IWANARI Y., OHNO Y. (1969) Rearing experiments of silkworms on the artificial diets composed mainly of the mulberry leaf powder harvested on the late age autumnal and there after season. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 38(4): 307-315.
- JACKSON M. L. (1973) Soil analysis, Prentice Hall of India Pvt Ltd, New Delhi., p. 498.
- 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. Seri.* 10(1): 79-86.
- LOWRY O. H., ROSE BROUGH N. J., FARR A. L., RANDIL R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-267.
- MUNIRAJU E. (1995) Studies on Standardisation of Rearing Methods of young age Silkworm *Bombyx mori*. L. Phd. Thesis Bangalore University, pp. 84-135.
- MC CREADY R. M., GUGGOLZ J., SILVIERA V., OWENS H. S. (1950) Determination of starch and amylase in vegetables. *Anal. Chem.*, 22: 1156-1158.
- MC DONALD P., EDWARDS R. A., GREENHALGH J. F. D. (1981) In animal nutrition: Pub. By the English language book society and long man. Third edition , p 48-354.
- MACK O NARTH (1984) Animal science textbook series commercial chicken production manual. 3rd edition AVI Pub. Com. California., p. 56-61.
- NARASIMHA MURTHY C. V., DONATES E., PILLAL 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 Chamberfor Rearing Young Age (chawki) silkworms in the Tropics. *Sericologia* 35(3): 525-534.
- TINGE 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.
- ULLAL S. R., NARASIMHANNA M. N. (1978) Hand book of practical sericulture. Pub. By Central Silk Board, Bangalore, p 1-151.

EVALUATION BIOLOGIQUE DE LA QUALITE NUTRITIVE DE FEUILLES DE MURIER (*MORUS* SPP.) CONSERVEES PAR MESURE DE LA REPONSE DE MUE ET DES PERFORMANCES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. EN FONCTION DES SAISONS

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

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

Nous avons étudié la conservation selon 11 méthodes différentes pendant 12 heures, de feuilles de mûrier tendres provenant du sommet (1^{ère} à 4^{ème}) de tiges de mûriers irrigués. Les données sur la teneur en humidité, les protéines totales, l'azote non protéique (npN), l'amidon et la teneur en sucres ont été enregistrées. On a aussi analysé simultanément les effets biologiques en réalisant un test de mue. Les observations révèlent des différences importantes entre les méthodes de conservation. On enregistre un taux de mue, un poids larvaire et un taux de croissance médiocres avec les traitements secs, qui sont associés à des taux d'humidité de la feuille et des teneurs en protéines et en sucres faibles. On enregistre en général une teneur plus faible en npN et des teneurs plus élevées en protéines et en sucres quand la feuille est conservée avec des traitements humides et en particulier dans un pot enterré : les taux de mue, le poids larvaire et le taux de croissance sont plus élevés.

INTRODUCTION

La qualité de la feuille de mûrier (*Morus* spp.) et la croissance du ver à soie sont directement corrélées avec le développement larvaire et la mue (Benjamin et Anantharaman, 1990) qui influencent le rendement en cocons (Purohit et Pavankumar, 1996). Les dégradations biochimiques pendant la conservation après la récolte selon la variété, la saison et les conduites agricoles influencent la valeur nutritive de la feuille. La conservation de la feuille pendant 12 heures (parfois jusqu'à 20 heures) est inévitable et pendant cette période les feuilles perdent leur humidité et subissent des changements biochimiques (Govidan et coll., 1988) influencés par l'environnement (Krishnaswami et coll., 1971), ce qui altère la croissance des larves de vers à soie (Muniraju, 1995). Pour faire face à ces variations on a recommandé la conservation des feuilles avec des méthodes différentes en fonction de situations et régions différentes (Himantharaj et coll., 1995). Cependant, il existe extrêmement peu d'information sur l'évaluation critique des méthodes de conservation de la feuille en fonction des variations saisonnières et de l'environnement, en particulier sous les tropiques. Des études ont été réalisées sur ces aspects pour optimiser les besoins des jeunes vers à soie (Muniraju, 1995). Cet article se penche sur 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 muraille irriguée de la variété M5, entretenue avec les méthodes habituelles (Choudhury et Giridhar, 1987) avec 5 récoltes / an et une taille à chaque récolte. Les feuilles tendres en position terminale sur des pousses saines sont récoltées

au début de la matinée (8 – 9 heures) d'après les recommandations (Benchamin et Nagaraj, 1987) pour le premier âge (jusqu'à la deuxième mue). La feuille est transportée au laboratoire dans des plateaux en plastique recouverts d'un chiffon humide et conservée selon les traitements ci-dessous :

- T1 - Casier à feuilles (en bois)* recouvert avec de la toile de jute sèche,
- T2 - Casier à feuilles (en bois)* recouvert avec de la toile de jute mouillée,
- T3 - Panier à feuilles (en bambou) recouvert avec de la toile de jute sèche,
- T4 - Panier à feuilles (en bambou) recouvert avec de la toile de jute mouillée,
- T5 - En tas sur un tapis recouvert avec de la toile de jute sèche,
- T6 - En tas sur un tapis recouvert avec de la 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 à couvercle enterré dans du sable mouillé jusqu'au col,
- T10 - Sac en plastique (noir) et
- T11 - Sac en plastique transparent.

* (152,4 cm × 76,2 cm × 76,2 cm avec des lattes en bois tout autour de 3,2 cm × 1,3 cm écartées de 3,2 cm).

Avec les traitements mouillés (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 trois heures pendant 24 heures avec un ensemble de traitements parallèles au même endroit sans feuilles. La perte en humidité de la feuille, les teneurs en azote totale (Jackson, 1973), en protéines totales (Lowry et coll., 1951), en amidon (Mc Cready et coll., 1950) et en sucres solubles (Dubios et coll., 1956) sont estimées en utilisant les feuilles de chaque traitement après conservation pendant 12 heures. La teneur en azote non protéique (npN) est calculée à partir des valeurs en azote totale et en azote protéique. On a aussi réalisé des analyses biologiques en mesurant le taux de mue (Iwanari et Ohno, 1969 ; Hamano et coll., 1985) trois fois par saison avec trois répétitions, chacune avec des larves provenant de pontes saines (environ 400 larves) de la race de ver à soie bivoltine NB4D2. Les larves sont nourries séparément avec des feuilles conservées pendant 12 heures provenant de chaque traitement et pour chaque mue. Une pièce isolée (Sekharappa et coll., 1995) est utilisée où l'on maintient la température (27 à 28° C) et l'humidité (85 à 90 %) recommandées. Les larves en mue sont séparées de l'élevage et comptées toutes les 3 heures jusqu'à la fin de chaque mue. Les observations sur le taux de mue, le poids larvaire, la durée larvaire sont enregistrées et les taux de croissance calculés séparément pour la première et la deuxième mue. Les données sur la qualité de la feuille et les paramètres biologiques pour les trois essais tout comme la température et l'humidité de l'environnement de conservation de la feuille sont regroupés en fonction de la saison et comparés en fonction des différents traitements.

RESULTATS

Variations environnementales :

Pendant l'été la température la plus basse (25° C) est enregistrée pour T9 avec des fluctuations de 1,4° C suivi par T2, T8, T4 et T6 (26 à 26,8° C). Une tendance similaire est également enregistrée pendant la saison des pluies et en hiver (Tableau I). Une humidité maximum (96 à 99 %) avec le moins de fluctuations (jusqu'à 3 %) est enregistrée pour T9, suivi par T8, T6, T4 et T2 (92 à 94,8 %, 86,5 à 90,21, 86,5 à 93,5, 82,8 à 96 % respectivement) (Tableau II). Une tendance similaire est observée pour la saison des pluies et l'hiver (92,8 à 96, 89,5 à 90,8 % respectivement) pour T9 et pour les autres traitements humides.

Humidité de la feuille et paramètres biochimiques :

En été, les valeurs les plus basses de perte en humidité de la feuille (2,17 %) sont obtenues chez T9, suivi par T6 (2,95 %) et T8 (3,8 %) qui diffèrent des autres traitements de manière importante, les valeurs les plus élevées étant enregistrées pour T1 et T3 (16,79 et 14,92 % respectivement). Les valeurs les plus faibles en perte d'humidité (1,69 et 2,68, 1,49 et 2,83, 1,65 et 2,63 % respectivement l'été, à la saison des pluies et l'hiver) enregistrées pour T10 et T11 pendant les trois saisons sont, cependant, dues à l'accumulation d'humidité à la surface de la feuille. On enregistre une tendance similaire également pendant la saison des pluies et en hiver (Tableau III). Les valeurs les plus élevées de teneur totale en azote sont enregistrées pour T9 à la fois en été et en hiver, et pour T4 pendant la saison des pluies (3,55 %). Des valeurs plus élevées de teneurs en protéines sont enregistrées pour T9 pendant les trois saisons, qui diffèrent de manière importante ($P > 0,01$) avec tous les autres traitements pendant les trois saisons sauf avec T4 pendant les saisons d'été et des pluies. Les valeurs les plus basses en protéines solubles sont enregistrées pour T5, T10 et T1 pendant respectivement l'été, la saison des pluies et l'hiver. Par opposition, des valeurs élevées de teneur en azote non protéique sont enregistrées pour T11 (0,80 %) suivi par T1, T10, T3 et T7 (0,55 à 0,36 %) pendant l'été et la même tendance est observée pendant la saison des pluies et l'hiver. Des valeurs maximums en amidon sont obtenues pour T1 (4,36 %) suivi par T7, T11, T8, T3 et T5 (4,22 à 4,05 %) pendant l'été et cette situation se maintient pendant les autres saisons. De même, la teneur en sucres est plus élevée pour T9 (13,67, 13,76 et 14,28 %) pendant toutes les saisons, comparé à T5 et T1 pendant l'été et la saison des pluies et T3 pendant l'hiver (Tableau III).

Paramètres de mue :

Des valeurs plus élevées de taux de mue (Tableau IV) sont obtenues avec T2 et de T6 à T11 (100 %) pour la 1^{ère} et la 2^{ème} mue après 18 h pendant l'été, tandis que pendant la saison des pluies, T9 enregistre les valeurs les plus élevées (97 %) suivi par T8, T2, T1, T6 (94, 92, 89, 88 %) et T11 la moins élevée (63 %) pendant la 2^{ème} mue. Une tendance similaire est observée également pendant l'hiver (Tableau IV). Un poids larvaire plus élevé de 0,61 et 4,1 g/100 larves est enregistré pour T9 après la 1^{ère} et la 2^{ème} mue respectivement, suivi par T6 (0,61 et 3,73 g/100 larves), T7 (0,58 et 3,49), T2 (0,61 et 3,49 g), T11 (0,58 et 3,47 g) comparés aux valeurs plus basses obtenues pour T1 (0,05 et 2,79 g) pendant l'été. Une tendance similaire pour le poids larvaire est enregistrée pour la saison des pluies et en hiver pour les deux âges (Fig. 1). Des taux de croissance maximums de 1,43 et 5,83 mg/jour sont obtenus avec T9 suivi par T6, T7, T2 et T11 pendant le premier âge (0,58 à 0,61 mg/jour) et le 2^{ème} âge (3,47 à 3,73 mg/jour) (Fig. 2).

DISCUSSION

On sait que les teneurs en eau et en azote des feuilles sont corrélées avec la croissance et le développement des insectes (Tinge et Singh 1980, Seriber 1982). Dans notre étude, les valeurs de ces paramètres varient en fonction des méthodes choisies pour la conservation des feuilles. Ceci apparaît clairement pour les traitements secs avec des valeurs plus élevées en perte d'humidité de la feuille et en npN et des valeurs plus faibles en protéines et en sucres. Par opposition, les traitements humides donnent des valeurs plus élevées pour les teneurs en protéines de la feuille et en sucres permettant une dégradation (Narasimhamurthy et coll., 1987) et une conservation pendant des périodes plus longues (Himantharaj et coll., 1995).

La teneur en humidité de la feuille, les teneurs en protéines et en sucres sont élevées pendant la saison des pluies et sont associées à de meilleures performances biologiques pour le taux de mue, le poids larvaire et le taux de croissance. Le fait que les saisons d'été et d'hiver se classent 2^{ème} et 3^{ème} confirment les niveaux d'humidité de la feuille, et en protéines et en sucres pendant les saisons correspondantes. Parmi les différentes méthodes évaluées dans cette étude, T9 enregistre l'humidité la plus élevée (34,31, 9,76 et 19,67 % plus que T5 pendant les saisons d'été, des pluies et d'hiver

respectivement) pendant toutes les saisons. Le maintien des conditions suggérées de température inférieure à 20° C et de plus de 90 % d'HR % (Ullal et Narasimhanna, 1978), est bien des fois impossible sous les tropiques, qui subissent de fréquentes variations de climat influençant la qualité de la feuille et à son tour la performance de mue. Parmi les méthodes étudiées, les traitements humides (en l'occurrence T2, T4, T6, T8 et T9) enregistrent des températures plus basses grâce au refroidissement dû à l'évaporation (Mac O Narth, 1984). Cependant, le degré de refroidissement et la variabilité entre les traitements dépendent du rapport volume /surface exposés, du matériel utilisé, de la température ambiante, de l'humidité et de la fréquence d'humidification. Le fait que le rapport surface / volume (63,32) et que la capacité de rétention d'eau (13 à 14 %) soient élevés avec T9 est un avantage supplémentaire pour augmenter l'efficacité du 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 (6,2° C). L'azote non protéique sous la forme de nitrates n'est pas toxique pour les animaux ; mais quand la conservation dure longtemps les nitrates se réduisent à des nitrites qui sont toxiques. Les niveaux plus élevés en sucres solubles dans les feuilles avec des traitements humides favorisent l'annulation des effets toxiques des nitrites (Mc Donald et coll., 1981).

En conclusion, la conservation des feuilles tendres destinées aux jeunes larves dans des pots en terre enterrés dans du sable mouillé donne les valeurs les plus élevées pour les paramètres de mue et de meilleurs résultats que les autres traitements à la fois pour la qualité de la feuille et la performance biologique. Le stockage des feuilles sous de la toile de jute mouillée est en général meilleur que la conservation à l'air libre.

GRADUAL IMPROVEMENT OF MULBERRY VARIETIES UNDER IRRIGATED CONDITIONS IN SOUTH INDIA AND THE OPTIMAL PROGRAM FOR VARIETAL SELECTION IN THE TROPICS

A. SARKAR, JALAJA S. KUMAR & R. K. DATTA

Central Sericultural Research & Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore – 570008, Karnataka, India.

In South India, only the local mulberry variety with the yield of only 20 MT per hectare per year under irrigated condition was available till 1970. In the gradual development of new varieties the yield level of the recently recommended high yielding mulberry variety, Victory-1 (V-1) has reached to the extent of 71.9 MT per hectare per year which is 55.7% high over the last recommended variety, S-36 (46.2 MT/ha/yr). The high production in the variety V-1 is mainly due to the high photosynthetic rate and reduced transpiration.

The quality of leaf of the mulberry variety, V-1 as judged by the chemical analysis indicated a higher amount of protein (24.56%) and total sugar (16.98%). Bioassay test proved the superiority of the variety, V-1 with respect to survival, single cocoon weight and single shell weight over the other varieties so far developed. Finally a high rooting percentage (94%) from cuttings ensures an easy establishment of the variety. Moreover, the variety was found to be resistant to leaf spot and moderately resistant to leaf rust diseases.

An analysis of the process of development of the variety, V-1 clearly indicated that selection of suitable parents contributed to its success. A cross between high yielding tropical mulberry variety and a well adapted temperate variety which exhibits no or less dormancy in winter increases the chance of getting a productive genotype with quality leaf in tropical region.

Keywords: High yielding mulberry variety, evaluation, physiological efficiency, bioassay, tropical climate, optimal breeding program.

INTRODUCTION

Sericulture is a unique form of agriculture consisting of two processes namely, cultivation of mulberry and rearing of silkworm. Its technology covers a wide range of activities like the use of high yielding superior mulberry varieties along with proper package of cultivation practices for mulberry, the breeds of silkworm and their feeding management, disease and insect control, mounting and protection of cocoons. Out of all the activities listed above raising of mulberry is considered to be the most important aspect for sericulture as 60% of the total cost of raising cocoons goes for mulberry cultivation alone (Rangaswami *et al.*, 1976). The opportunity to increase the production of leaves in mulberry lies in improved agricultural practices including better fertilisation, improved tillage methods and more efficient weed, disease and insect control. Naturally, a high yielding mulberry variety in combination with the suitable cultivation practices will be able to boost up the yield of leaves to a considerable extent.

Mulberry is distributed in temperate, sub-tropical and tropical regions of the world. Though all types of climate are represented in India i.e. temperate climate in extreme North, subtropical in foot hills of Himalayas and tropical climate in the rest of the country, the contribution of silk production from South India which lies in the tropical region is quite substantial and accounts for nearly 86% of the total production of silk in India. The growth of sericulture in India is envisaged by the quantum jump of silk production from 1184 MT in 1960 to 14,000 MT during 1994 (Anonymous, 1995).

Mulberry grows well all round the year under tropical conditions. The productivity is further increased with necessary irrigation during non-rainy period. The areas in South India are both irrigated and non-irrigated, mostly falling under water stress condition. Normally 3-4 fold increase is found in irrigated areas in comparison to the production under water stress conditions.

Increased yield is the ultimate aim in most of the plant breeding works. This can be accomplished by providing varieties basically more productive due to greater physiological efficiency. Certainly, the development of high yielding varieties is not the end of breeding. The developed varieties must be of high quality to be accepted by silkworm resulting in heavier cocoon weight. The contribution to human welfare made by superior varieties is the most satisfying of all the methods of increasing productivity. Normally, such varieties add nothing or very less to the cost of production beyond that required to handle the additional increment of yield (Allard, 1960).

In this paper an attempt has been made to describe the gradual improvement of mulberry under irrigated conditions in south India resulted from the research work conducted at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India for three decades and to study the comparative performance of those varieties. Mysore is situated in the Southern part of India with the latitude of 12.18°N and longitude of 72.42°. Its elevation is 767 m above sea level. The other object of the paper is to analyse the developmental process of the recently developed superior mulberry variety, Victory-1, which may serve as a guideline for evolving a variety under tropical condition.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry varieties studied in the present work were varieties evolved by the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore and recommended at various times. These include Kanva-2; S-54 and S-36 (Sastry, 1984) and Victory-1 (Jalaja *et al.*, 1995). The characteristic features of these varieties are presented in Table I and Plate-I. The comparison among the varieties was made simultaneously with the evaluation of Victory-1 (V-1) mulberry variety, which was carried out during 1991-95 while evolving the variety.

The meteorological information on the experimental site is presented in Table II. It is clear from the Table that the potential evaporation (1636 mm) is more than the total precipitation (837 mm). But the mean temperature (25.1° C) is suited for mulberry cultivation. The minimum temperature never goes below 18° C except in December and January when a temperature of 16.4° C was recorded. This area can produce excellent mulberry throughout the year if irrigation is provided. During the experiment, the land was maintained with irrigation (3.75 ha. cm / irrigation) in every 7-10 days during the non-rainy period.

The experiment was conducted with the above mentioned four mulberry varieties along with Local under randomised block design in four replications with 60 × 60 cm spacing at the farm of CSR & TI, Mysore. The experimental plot was maintained as per the recommended package of practices for irrigated condition with N:P:K @ 300:120:120kg per ha. per year in five split doses. Data on leaf yield was recorded for three years, i.e. 1992-93, 1993-94 and 1994-95 leaving one year for establishment. The varieties were evaluated for resistance to leaf rust and leaf spot during 1991 and 1992.

To assess the leaf quality, protein content was determined using the method of Lowry *et al.*, (1951) and total and reducing sugars were estimated following the procedure suggested by Plummer (1971). Physiological parameters like photosynthetic rate and transpiration rate were measured using the

photosynthetic system LICOR 6200. Total chlorophyll content was measured using the method of Hiscox and Israelstam (1979). Full bioassay was conducted for three seasons covering a full year with popular multivoltine $\times$ bivoltine and bivoltine $\times$ bivoltine hybrids during winter, summer and rainy in 1993-94 to assess the feeding quality. Apart from recording the cocoon characters, leaf utilization of different mulberry varieties was also measured by the production efficiency of cocoon shell (PECS) which is calculated as:

$$\text{PECS} = \frac{\text{Cocoon shell weight}}{\text{Amount of leaf ingested}} \times 100$$

Table I. Characteristics features of mulberry varieties recommended by Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore along with Local.

Tableau I. Traits caractéristiques des variétés de mûrier recommandées par l'Institut Central de Recherche et de Formation Séréricole de Mysore et de la variété locale.

Character / <i>Caractère</i>	Local	Kanva-2	S-54	S-36	V-1
Year of release <i>Année d'autorisation</i>	—	1968	1984	1984	1996
Parentage / <i>Parenté</i>	—	Selection from Local <i>Sélection de variétés locales</i>	Mutant from Ber. Local <i>Mutant de Ber. local</i>	Mutant from Ber. Local <i>Mutant de Ber. local</i>	S30 $\times$ Ber C776
Plant type / <i>Type de plante</i>	erect <i>droit</i>	erect <i>droit</i>	spreading <i>étendu</i>	spreading <i>étendu</i>	erect <i>étendu</i>
Ploidy / <i>Ploidie</i>	Diploid <i>Diploïde</i>	Diploid <i>Diploïde</i>	Diploid <i>Diploïde</i>	Diploid <i>Diploïde</i>	Diploid <i>Diploïde</i>
Average number of shoots <i>Nombre moyen de pousses</i>	10-12	8-10	8-10	8-10	10-12
Leaf size and shape <i>Taille et forme de la feuille</i>	small, many lobed <i>Petite, très lobée</i>	medium, entire <i>Moyenne, entière</i>	medium entire <i>Moyenne entière</i>	medium entire <i>Moyenne entière</i>	large, entire <i>Grande, entière</i>
Leaf surface <i>Surface de la feuille</i>	Scabrous, dull <i>Rugueuse, terne</i>	Smooth, slightly dull <i>Lisse, légèrement terne</i>	Smooth, glossy <i>Lisse, brillante</i>	Smooth, glossy <i>Lisse, brillante</i>	Smooth, glossy <i>Lisse, brillante</i>
Leaf colour <i>Couleur de la feuille</i>	Dark green <i>Vert foncé</i>	Pale green <i>Vert pâle</i>	Pale green <i>Vert pâle</i>	Pale green <i>Vert pâle</i>	Dark green <i>Vert foncé</i>
Rooting ability <i>Capacité de racinement</i>	95%	80%	75%	48%	94%



Plate 1 / Planche 1.

1). Mysore Local. 2). Kanva-2. 3). S-36. 4). S-54. 5). V-1.

Table II. Meteorological data of the experiment site (Mysore).

Tableau II. Données météorologiques sur le site d'expérimentation (Mysore).

Months	Precipitations (mm)	Temp. avg. (° C)	Temp Mean		Wind speed (m s ⁻¹)	Sunshine (%)	Total radiation (cal cm ² /day)	Evapo transpiration (mm)
			Max. (° C)	Min. (° C)				
<i>Mois</i>			<i>Temp. moyenne</i>					
		<i>Moyenne de temp.</i>	<i>Max. (° C)</i>	<i>Min. (° C)</i>	<i>Vitesse du vent (m s⁻¹)</i>	<i>Soleil (%)</i>	<i>Radiations totales (cal cm²/jour)</i>	
January / janvier	3	24.5	28.3	16.4	2.0	81	466	130
February / février	6	25.9	31.2	18.2	1.6	82	513	132
March / mars	12	27.9	33.5	20.2	1.7	83	559	175
April / avril	68	28.4	34.0	21.4	1.8	69	527	169
May / mai	157	27.3	32.6	21.2	1.9	62	500	159
June / juin	61	24.6	28.9	20.2	2.5	52	457	136
July / juillet	72	23.6	27.3	19.7	2.6	44	427	129
August / août	80	23.9	27.9	19.6	2.3	46	436	131
September / sept.	116	24.2	28.7	19.3	1.9	54	457	128
October / octobre	180	24.4	28.4	19.6	1.4	56	436	121
November / nov.	67	23.8	27.4	18.3	1.6	65	426	111
December / déc.	15	22.9	27.0	16.5	2.0	75	432	115
Year / année	837	25.1	29.6	19.2	1.9	64	470	1636

PECS is generally considered as the final indicator for the evaluation of nutritive value of mulberry leaves (Machii and Katagiri, 1991; Sarkar and Fujita, 1994) and the high values of PECS indicate the high acceptability of the feed by the silkworm.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf yield:

The total annual leaf yield from three years along with C.D. values are presented in Table III. It is clear from Table III that the percentage of increase in yield is quite significant. By the way of

introducing the variety, Kanva-2, during 1968 the production of mulberry was boosted up from 21562kg per hectare per year to 30459kg/ha/year registering an increase of 41.26%. In the gradual process S-36 and S-54 were recommended in the field by the Institute during 1984 which showed the potentiality of increasing the leaf yield by more than 50% over Kanva-2. The recently recommended variety, Victory-1, showed its excellence further by producing the yield to an extent of 71917 kg/ha/year with an increase of nearly 56% over S-36.

Physiological efficiencies:

The physiological efficiencies as measured by the photosynthetic rate, transpiration rate, water use efficiency (photosynthesis/transpiration) and total chlorophyll content are presented in Table IV. A perusal of Table IV indicates that the variety, Victory-1 recorded higher photosynthetic rate with reduced transpiration rate in comparison to the other mulberry varieties studied. High physiological efficiency of V-1 associated with superior morphological traits might have contributed to higher production. The high water use efficiency of Victory-1 measured by the ratio of photosynthetic rate and transpiration rate indicates its ability to withstand limited water stress condition also. The lower values of water use efficiency in case of S-36 and S-54 indicated that the varieties are only suitable with assured irrigation.

Table III. Leaf yield of mulberry varieties recommended by Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore along with Local (kg/ha/yr).

Tableau III. Rendement en feuilles de variétés de mûrier recommandées par l'Institut Central de Recherche et de Formation Séricole et de la variété locale (kg/ha/année).

Genotype	I year (1992-93)	II year (1993-94)	III year (1994-95)	Avg. of 3 years	% increase over Local	% increase over K-2	% increase over S-36	Remarks
<i>Génotype</i>	<i>Année I</i> <i>(1992-93)</i>	<i>Année II</i> <i>(1993-94)</i>	<i>Année III</i> <i>(1994-95)</i>	<i>Moyenne</i> <i>de 3</i> <i>années</i>	<i>% d'aug-</i> <i>mentation</i> <i>par rapport</i> <i>à la variété</i> <i>Locale</i>	<i>%</i> <i>d'augmentation</i> <i>par rapport</i> <i>à K-2</i>	<i>% d'augmen-</i> <i>tation par</i> <i>rapport</i> <i>à S-36</i>	<i>Remarques</i>
Local	14683	24684	25319	21562	—	—	—	Traditional Traditionnelle
Kanva-2	29522	29080	32775	30459	41.26	—	—	Recommended in 1968 Recommandée en 1968
S-54	44708	51709	47085	47834	121.84	57.04	—	Recommended in 1984 Recommandée en 1984
S-36	41522	50787	46254	46188	114.21	51.64	—	Recommended in 1984 Recommandée en 1984
V-1	59835	74678	81237	71917	233.53	136.11	55.70	Recommended in 1996 Recommandée en 1996
C.D. At 5%	7763.9	4034.00	5742.6	3039.4				

Table IV. Physiological parameters of different mulberry varieties.*Tableau IV. Paramètres physiologiques de différentes variétés de mûrier.*

Parameter / Paramètre	Local	Kanva-2	S-54	S-36	V-1	C.D at 5%
Photosynthetic Rate <i>Taux photosynthétique</i> ($\mu\text{mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	12.32	14.72	10.87	12.45	19.89	2.981
Transpiration rate <i>Taux de transpiration</i> ($\mu\text{mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	8.26	9.80	9.40	9.30	8.70	0.210
Water use efficiency <i>Efficacité d'utilisation de l'eau</i> (P/T)*	1.49	1.50	1.16	1.34	2.29	—
Total chlorophyll (mg/g fresh wt.) <i>Chlorophylle totale</i> (mg/g poids frais)	3.187	2.800	2.792	2.237	3.237	0.434

* (Photosynthetic rate/ Transpiration rate) / (*Taux de photosynthèse/ Taux de transpiration*).**Chemical composition of leaves:**

The chemical composition of leaves of all the varieties along with Local is presented in Table V. A perusal of Table V indicates that the varieties i.e. Kanva-2 and Local are on par with respect to moisture content. The moisture content in leaves of all developed varieties (74.50% to 75.70%) was found to be better than that of Local (68.88%) and Kanva-2 (69.5%). Nearly 50% increase in crude protein was found in the varieties S-54, S-36 and Victory-1 (22.23, 23.89 and 24.56 respectively) as against 16.74% in Local and 18.37% in Kanva-2. Significantly higher values were obtained in all the improved varieties with respect to total sugar and reducing sugar when compared to Local.

Moisture retention:

The palatability of different mulberry varieties during the rearing of silkworm depends on the quantity of moisture retained during harvest, transportation and preservation. The moisture retained in the leaves of different varieties after harvest and transportation from field and subsequent preservation in rearing house is presented in Table VI. It is evident from the table that the varieties S-36 and V-1 have the highest capacity to retain moisture after four hours of plucking. Local, Kanva-2 and S-54 showed lower percentage of moisture after four hours of harvest.

Table V. Chemical composition of leaves of different mulberry varieties (on dry wt. basis).*Tableau V. Composition chimique des feuilles de différentes variétés de mûrier (sur base poids sec).*

Parameter / Paramètre	Local	Kanva-2	S-54	S-36	V-1	CD at 5%
Moisture content (%) <i>Teneur en humidité (%)</i>	68.88	69.50	74.50	75.70	75.65	1.135
Crude protein (%) <i>Protéines brutes (%)</i>	16.74	18.37	22.23	23.89	24.56	0.819
Reducing sugar (%) <i>Sucres réducteurs (%)</i>	1.48	1.73	1.88	1.90	1.91	0.048
Total sugar (%) <i>Sucres totaux (%)</i>	10.07	16.76	15.70	15.19	16.98	0.731

Table VI. Moisture retention of different mulberry varieties.*Tableau VI. Rétention d'humidité chez différentes variétés de mûrier.*

Varieties / Variétés	Moisture percent after / Pourcentage d'humidité après	
	2 hours / 2 heures	4 hours / 4 heures
Local	57.92	44.37
Kanva-2	59.10	51.20
S-54	64.90	49.40
S-36	69.62	60.30
Victory-1	68.81	58.80
C.D. at 5%	2.182	2.136

Table VII. Reaction to different diseases in different mulberry varieties.

Tableau VII. Réaction à différentes maladies chez différentes variétés de mûrier.

Varieties	Reaction to / Réaction à	
Variétés	Leaf spot / Tache de la feuille	Leaf rust / Rouille de la feuille
Local	Moderately resistant <i>Modérément résistante</i>	Moderately susceptible <i>Modérément sensible</i>
Kanva-2	Resistant / <i>Résistante</i>	Moderately susceptible / <i>Modérément sensible</i>
S-54	Resistant / <i>Résistante</i>	Moderately susceptible / <i>Modérément sensible</i>
S-36	Moderately susceptible <i>Modérément sensible</i>	Moderately resistant <i>Modérément résistante</i>
Victory-I	Resistant / <i>Résistante</i>	Moderately resistant / <i>Modérément résistante</i>

Reaction to important diseases

The incidence of diseases in different varieties was recorded and it was found that the developed varieties are either superior over Local or similar in respect of resistance to leaf rust and leaf spot (Table VII).

Bioassay test:

The acceptance of the varieties was tested by conducting full rearing in three seasons covering a full year with popular multivoltine $\times$ bivoltine and bivoltine $\times$ bivoltine hybrids. In case of multivoltine $\times$ bivoltine hybrid, F1 layings of Pute Mysore $\times$ NB4D2 were used and the rearing performance is presented in Table VIII. Similarly, for bivoltine $\times$ bivoltine hybrid, a cross of NB4D2 and CC₁ was used and the rearing performance is presented in Table IX. It is evident from the data that the mulberry variety, Victory-I, exhibited its superiority in respect of most of the economic characters especially effective rate of rearing (ERR), cocoon weight, and shell weight. It is also clear from Table VIII and IX that until the development of the variety, Victory-I, there was not so much impact of the varieties to indicate the superior rearing performance. All the varieties developed earlier to V-I i.e., Kanva-2, S-36 and S-54 showed more or less similar performance in rearing and none of the varieties were considered to be either superior or inferior in comparison to earlier developed one.

Leaf utilization:

Leaf utilization of different mulberry varieties with both multi $\times$ bi and bi $\times$ bi hybrid silkworm was measured during winter season and the result is presented in Table X along with production efficiency of cocoon shell (PECS) values for each of the mulberry variety. It is evident from Table X that the improvement in the efficiency of leaf utilization as measured by PECS value is increased when the silkworms were fed with leaves of Victory-I. The high PECS value obtained in the experiment for the mulberry variety, V-I in bivoltine hybrid (14.8%) is comparable with the result obtained by Sarkar and Fujita (1994) in Japan. They observed the highest PECS of 14.07 in the variety,

Hachinose while testing six improved Japanese varieties as a part of an evaluation study. The high PECS values as observed in the variety, Victory-1 both for multivoltine $\times$ bivoltine and bivoltine $\times$ bivoltine hybrid indicated that the variety has a better convertibility which ultimately led to the higher cocoon production with less consumption of leaves.

Table VIII. Bioassay with multivoltine $\times$ bivoltine hybrids (PM $\times$ NB₄D₂).

Tableau VIII. Essai biologique avec des hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin (PM $\times$ NB₄D₂).

Genotypes characters	Season	Kanva-2	S-36	S-54	V-1	C. D. at 5%
<i>Caractères des génotypes</i>	<i>Saison</i>					
Larval duration (days, Hrs)	Rainy / <i>Pluies</i>	24.06	24.00	24.12	24.00	NS
<i>Durée larvaire (jours, Hrs)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	24.00	24.00	24.00	24.00	NS
	Summer / <i>Eté</i>	21.06	21.00	21.06	21.00	NS
	Average / <i>Moyenne</i>	23.04	23.00	23.06	23.00	
Weight of 10 mature larvae (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	39.02	39.83	45.03	47.49	4.620
<i>Poids de 10 larves matures (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	36.29	36.04	38.52	42.70	1.836
	Summer / <i>Eté</i>	43.53	44.55	43.67	48.73	1.651
	Average / <i>Moyenne</i>	39.61	40.14	42.40	46.31	
ERR*	Rainy / <i>Pluies</i>	9376	9783	8616	9300	767.84
(No.)/10000 larvae brushed	Winter / <i>Hiver</i>	9400	9266	9166	9866	267.07
<i>(nbre)/10,000 larves levées</i>	Summer / <i>Eté</i>	8600	8500	8466	9500	687.51
	Average / <i>Moyenne</i>	9122	9183	8749	9555	
E.R.R.*	Rainy / <i>Pluies</i>	16.90	17.76	15.95	18.31	2.532
(Wt.)/10,000 larvae brushed	Winter / <i>Hiver</i>	16.75	15.89	16.21	18.66	1.047
<i>(Poids) / 10,000 larves levées</i>	Summer / <i>Eté</i>	15.65	16.48	15.50	18.64	1.622
	Average / <i>Moyenne</i>	16.43	16.71	15.89	18.54	
Single cocoon weight (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	1.743	1.78	2.05	2.05	0.207
<i>Poids d'un cocon (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	1.653	1.65	1.83	1.98	0.937
	Summer / <i>Eté</i>	1.913	1.98	1.88	2.01	0.063
	Average / <i>Moyenne</i>	1.769	1.80	1.92	2.01	
Single shell Weight (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	0.286	0.309	0.358	0.340	0.0404
<i>Poids d'une coque (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	0.271	0.271	0.308	0.340	0.0172
	Summer / <i>Eté</i>	0.321	0.344	0.322	0.350	0.0197
	Average / <i>Moyenne</i>	0.293	0.308	0.329	0.340	
Shell ratio (%)	Rainy / <i>Pluies</i>	16.41	17.36	17.52	16.83	1.137
<i>Richesse soyeuse (%)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	16.57	16.52	16.78	17.33	0.650
	Summer / <i>Eté</i>	16.79	17.37	17.13	17.53	0.655
	Average / <i>Moyenne</i>	16.56	17.11	17.14	17.20	

NS : Not significant / *Non significatif.*

* Effective rate of rearing / *Taux d'élevage effectif.*

Table IX Bioassay with bivoltine × bivoltine hybrids (NB4D2 × CC1).**Tableau IX. Essai biologique avec l'hybride bivoltin × bivoltin (NB4D2 × CC1).**

Genotypes characters	Season	Kanva-2	S-36	S-54	V-1	C. D. at 5%
Caractères des génotypes	Saison					
Larval Duration (days. Hrs)	Rainy / <i>Pluies</i>	24.12	24.12	24.20	24.00	0.375
<i>Durée larvaire (jours. Hrs)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	24.00	24.00	24.00	24.00	NS
	Summer / <i>Eté</i>	21.08	21.12	21.12	21.00	NS
	Average / <i>Moyenne</i>	23.06	23.08	23.11	23.00	
Weight of 10 mature larvae (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	49.19	49.99	50.25	55.08	4.331
<i>Poids de 10 larves matures (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	44.72	45.76	48.84	49.34	2.955
	Summer / <i>Eté</i>	45.53	47.48	42.02	51.53	1.823
	Average / <i>Moyenne</i>	46.48	47.74	47.03	51.98	
ERR*	Rainy / <i>Pluies</i>	8783	7417	8950	9400	1236.77
(No.) / 10000 larvae brushed	Winter / <i>Hiver</i>	9167	8833	9033	9866	472.34
<i>(nbre) / 10,000 larves levées</i>	Summer / <i>Eté</i>	8300	8566	8200	9366	697.03
	Average / <i>Moyenne</i>	8750	8272	8727	9544	
E.R.R.*	Rainy / <i>Pluies</i>	17.37	15.15	17.74	20.31	3.166
(Wt.) / 10,000 larvae brushed	Winter / <i>Hiver</i>	17.03	16.33	17.26	21.48	1.260
<i>(Poids) / 10,000 larves levées</i>	Summer / <i>Eté</i>	14.08	15.37	13.87	19.16	1.250
	Average / <i>Moyenne</i>	16.16	15.62	16.29	20.31	
Single cocoon Weight (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	2.029	2.073	1.998	2.149	0.288
<i>Poids d'un cocon (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	1.952	1.923	2.113	2.256	0.125
	Summer / <i>Eté</i>	1.742	1.858	1.692	2.257	0.107
	Average / <i>Moyenne</i>	1.907	1.951	1.934	2.221	
Single shell Weight (g)	Rainy / <i>Pluies</i>	0.395	0.399	0.400	0.403	0.064
<i>Poids d'une coque (g)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	0.375	0.373	0.399	0.444	0.018
	Summer / <i>Eté</i>	0.316	0.350	0.313	0.435	0.024
	Average / <i>Moyenne</i>	0.361	0.374	0.370	0.427	
Shell ratio (%)	Rainy / <i>Pluies</i>	19.53	19.21	20.04	18.76	1.359
<i>Richesse soyeuse (%)</i>	Winter / <i>Hiver</i>	19.21	19.38	18.88	19.66	0.831
	Summer / <i>Eté</i>	18.17	18.86	18.54	19.23	0.827
	Average / <i>Moyenne</i>	18.93	19.71	19.15	19.21	

NS : Not significant / *Non significatif*.* Effective rate of rearing / *Taux d'élevage effectif*.

Analysis of the process of evolution of the variety, Victory 1 (V-1) and the recommendation of the breeding plan for the tropics:

An analysis of the parents of Victory-1 indicated that the variety was developed from a cross of S-30 and C-776. S-30 is a high yielding promising genotype developed at CSRTI, Mysore for South India and C-776 is a high yielding genotype developed at CSRTI, Berhampore for Eastern India. Though both the parents are from the tropical region of India the places are quite apart and so the

geographically distant parents probably contributed to produce desirable heterosis. Moreover, the variety C-776 is from a unique cross in which the female parent is *Morus multicaulis*. *Morus multicaulis* is well known for its nutritional superiority. Though the variety, *M. multicaulis* is from a temperate area, it shows a very high percentage of rooting and does not exhibit high dormancy in winter months in the tropical region. Hence to improve the yield and quality, the temperate exotic varieties with no or less dormancy may be utilized as one of the parents for developing varieties under tropical conditions.

Table X. Leaf utilization of different mulberry varieties during V age and their efficiencies (winter season).

Tableau X. Utilisation et efficacité des feuilles de différentes variétés de mûrier pendant le 5^{ème} âge (saison d'hiver).

Name of the variety	Multivoltine × bivoltine hybrid			Bivoltine hybrid		
	Dry wt. of leaves consumed per larva during V age	Single shell weight (cg)	P.E.C.S (%)	Dry wt. of leaves consumed per larva during V age	Single shell weight (cg)	P.E.C.S (%)
Nom de la variété	Hybride Polyvoltin × bivoltin			Hybride bivoltin		
	Poids sec des feuilles consommées par une larve pendant le 5 ^{ème} âge	Poids d'une coque (cg)	P.E.C.S (%)	Poids sec des feuilles consommées par une larve au 5 ^{ème} âge	Poids d'une coque (cg)	P.E.C.S (%)
Kanva-2	3.391	27.1	7.99	3.797	37.5	9.87
S-54	3.688	30.8	8.35	3.624	39.9	11.01
S-36	3.396	27.1	7.98	3.791	37.3	9.84
V-1	2.814	34.0	12.08	3.00	44.4	14.80
Mean / moyenne	3.322	29.82	9.12	3.553	39.78	11.38
S. D.	0.366	3.25	1.98	0.377	3.30	2.34
C.V	11.01	10.44	21.17	10.61	8.30	20.56

* P.E.C.S = Production Efficiency of Cocoon Shell / Efficacité de production de coques soyeuses.

Selection and evaluation method:

The screening and selection of hybrid population after hybridization could be done as per the method described by Finnley (1958) and Currow (1961), who considered the following situation. The hybrid progenies are first subjected to preliminary trials in which undesirable genotypes are eliminated. The reminder undergoes more extensive trial (final) in which yield is the main criterion

for selection. The genotypes with the highest yield are compared with established varieties and those found to be superior are passed into commercial use. The same process described above was followed to develop the mulberry variety, V-1. At the final stage, the superior genotypes are subjected to rearing test and rooting ability before recommending for release to the farmers.

REFERENCES

- ALLARD R. W. (1960) Principles of plant breeding. John Wiley and sons Inc., New York.
- ANONYMOUS (1995) Silk review 1995. International Trade Centre, UNCTD/GATT, Geneva.
- CURROW R. N. (1961) Optimal programs for varietal selection. J. R. Statis. Soc., B23: 282-318.
- FINNLEY D. J. (1958) Statistical problems of plant selection. Bull. Int. Statis., 36: 242-268.
- HISCOX J. D., ISRAELSTAM G. F. (1979) A method of extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian J. Botany, 57: 1332-1334.
- JALAJA S. KUMAR, SARKAR A., DATTA R. K. (1995) A breakthrough in mulberry breeding for sustainable cocoon production. In Global Silk Scenario – 2001, Proc. Of the International Conference on Sericulture, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi; pp. 242-247.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951) Protein Measurement with Folin Phenol reagent. J. Biol. Chemistry, 193: 265-275.
- MACHII H., KATAGIRI K. (1991) Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworms. JARQ, 25(3) 202-208.
- PLUMMER D. T. (1971) An introduction to practical chemistry, Mc Graw Hill, New York.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C. R., MANJEET S. JOLLY (1976) Mulberry cultivation, FAO, The United Nations Agricultural Service Bulletin, 15(1).
- SARKAR A., FUJITA H. (1994) Better technique for nutritive evaluation of mulberry leaves for silkworm *Bombyx mori* L. Ind. J. Seric., 33(1): 19-22.
- SASTRY C. R. (1984) Mulberry varieties, exploitation and pathology. Sericologia, 24(3): 333-359.

AMELIORATION PROGRESSIVE DE VARIETES DE MURIER IRRIGUE DANS LE SUD DE L'INDE ET PROGRAMME OPTIMAL POUR UNE SELECTION VARIETALE DANS LES ZONES TROPICALES

A. SARKAR, S. JALAJA S. KUMAR & R. K. DATTA

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore – 570008, Karnataka, Inde.

Dans le sud de l'Inde, jusque dans les années 1970, il n'y avait qu'une variété de mûrier locale de disponible qui donnait un rendement de seulement 20 t par hectare par an à condition d'être irriguée. Avec la mise au point progressive de nouvelles variétés, le rendement a atteint jusqu'à 71.9 t par hectare par an avec la variété de mûrier à haut rendement récemment recommandée, Victory-1 (V-1), ce qui représente 55 % fois plus que celui de la dernière variété recommandée, S-36 (46.2 t/ha/an). La production importante de la variété V-1 est en grande partie due à son taux de photosynthèse élevé et à une transpiration réduite.

D'après l'analyse chimique de la feuille de mûrier de la variété V1 on constate une quantité plus élevée en protéines (24,56 %) et en sucres totaux (16,98 %). L'évaluation biologique a prouvé la supériorité de la variété V-1 pour la survie, le poids du cocon et le poids de la coque sur les autres variétés mises au point. Enfin, un pourcentage de racinement élevé (94 %) à partir de boutures assure une multiplication facile de la variété. De plus, la variété s'avère résistante à la tache de la feuille et elle est modérément résistante aux maladies de la rouille de la feuille.

Une analyse du processus de mise au point de la variété V-1 indique clairement que la sélection de parents adoptés a contribué à son succès. Un croisement entre une variété de mûrier tropicale à haut rendement et une variété tempérée bien adaptée qui présente aucune ou peu de dormance en hiver augmente les chances de donner un génotype productif dans la zone tropicale avec une feuille de qualité.

INTRODUCTION

La sériciculture est une forme unique d'agriculture constituée de deux processus à savoir, la culture du mûrier et l'élevage du ver à soie. Sa technologie comprend de nombreuses activités comme l'utilisation de variétés de mûrier supérieures au rendement élevé avec leurs propres pratiques de culture, le choix de lignées de vers à soie, la gestion de la nourriture, la lutte contre les insectes et les maladies et la montée et la protection des cocons. Sur toutes les activités citées on considère que la culture du mûrier est la plus importante pour réussir la sériciculture puisque 60 % du coût total de l'élevage des cocons vient de la culture du mûrier (Rangaswami et coll., 1976). On peut augmenter la production de feuilles de mûrier en améliorant les pratiques agricoles y compris l'utilisation d'engrais, les méthodes de labourage et en luttant plus efficacement contre les mauvaises herbes, les maladies et les insectes. Naturellement, en associant une variété de mûrier au rendement élevé à des pratiques de culture adaptées cela permet d'augmenter le rendement en feuilles de manière considérable.

Le mûrier est distribué dans les régions tempérées, subtropicales et tropicales du globe. Bien que tous les types de climat soient représentés en Inde ; c'est à dire un climat tempéré dans l'extrême nord, subtropical dans les collines au pied de l'Himalaya et un climat tropical dans le reste du pays, la part de production de soie venant du sud de l'Inde, c'est à dire de la région tropicale est très importante et représente près de 86 % de la production totale de soie en Inde. La croissance de la sériciculture en Inde a été assurée par le bond en avant de la production de soie de 1184 t en 1960 à 14 000 t en 1994 (Anonyme, 1995).

Le mûrier pousse bien toute l'année dans les conditions tropicales. On peut augmenter la productivité en recourant à l'irrigation qui est nécessaire pendant la sécheresse. Les zones du sud de l'Inde sont à la fois irriguées et non irriguées, et sont en grande partie soumises à des conditions de stress hydrique. Normalement, la production de feuilles dans les zones irriguées est 3 à 4 fois plus importante que dans des conditions de stress hydrique.

L'augmentation du rendement est l'objectif de la plupart des études sur le breeding des plantes. Cela peut être accompli en mettant au point des variétés plus productives grâce à leur efficacité physiologique plus importante. Il est certain que la mise au point de variétés à haut rendement n'est pas l'objectif final du lignage. Les variétés conçues doivent être de qualité élevée pour être acceptées par le ver à soie et donner des cocons au poids plus élevé. Les variétés supérieures contribuent au bien-être de l'humanité et permettent d'augmenter la productivité de la manière la plus satisfaisante. Normalement, de telles variétés n'augmentent pas ou peu le coût de production en dehors de ce qui est requis pour couvrir l'augmentation supplémentaire de rendement (Allard, 1960).

Dans cet article, nous essayons de décrire l'amélioration progressive du mûrier dans les conditions irriguées du sud de l'Inde à partir du travail de recherche réalisé à l'Institut Central de Formation et de Recherche de Mysore en Inde pendant trois décennies et d'étudier la performance comparative de ces variétés. Mysore est situé dans le sud de l'Inde à une latitude de 12,18° N et une longitude de 72,42°. Elle est située à 767 m au-dessus du niveau de la mer. L'autre objet de l'article consiste à analyser la manière dont la variété de mûrier supérieure, Victory-1, a été récemment mise au point, ce qui pourrait servir de guide pour concevoir une variété dans les conditions tropicales.

MATERIELS ET METHODES

Les variétés de mûrier étudiées ici sont des variétés mises au point à l'Institut Central de Recherche et de Formation Séricicoles de Mysore et recommandées plusieurs fois. Elles comprennent Kanva-2, S-54 et S-36 (Sastri, 1984) et Victory-1 (Jalaja et coll., 1995). Les traits caractéristiques de ces variétés sont présentés dans le Tableau I et dans la Planche I. La comparaison entre les variétés a été faite en même temps que l'évaluation de la variété de mûrier Victory-1 (V-1), c'est à dire de 1991 à 1995.

Les informations météorologiques sur le site expérimental sont présentées dans le Tableau II. Il est clair d'après le Tableau que le potentiel d'évaporation (1636 mm) est plus important que les précipitations totales (837 mm). Mais la température moyenne (25,1° C) convient à la culture du mûrier. La température minimum ne descend jamais en-dessous de 18° C sauf en décembre et en janvier où on enregistre une température de 16,4° C. Cette zone peut produire un excellent mûrier pendant toute l'année s'il y a irrigation. Pendant l'expérience, le terrain est irrigué (3,75 ha. cm/irrigation) tous les 7 à 10 jours pendant la période sèche.

L'expérience est réalisée avec les quatre variétés de mûrier citées plus haut et avec la variété locale selon une conception en blocs aléatoires en quatre répétitions et un espacement de 60 × 60 cm à la ferme du CSR & TI, de Mysore. On suit les pratiques recommandées pour l'irrigation dans la parcelle expérimentale avec N : P : K à raison de 300 : 120 : 120 kg par hectare par année en cinq doses séparées. Les données sur le rendement sont enregistrées pendant trois ans, c'est à dire en 1992-93, 1993-94 et 1994-95. Les variétés sont évaluées pour leur résistance à la rouille de la feuille et à la tache de la feuille en 1991 et 1992. Pour évaluer la qualité de la feuille, la teneur en protéines

est déterminée en utilisant la méthode de Lowry et coll., (1951) et la totalité des sucres réducteurs est estimée en suivant la procédure suggérée par Plummer (1971). Les paramètres physiologiques comme le taux de photosynthèse et le taux de transpiration sont mesurés en utilisant le système LICOR 6200. La teneur totale en chlorophylle est mesurée en utilisant la méthode de Hiscox et Israelstam (1979). Une évaluation biologique complète est réalisée pendant trois saisons couvrant une année complète avec des hybrides populaires polyvoltin $\times$ bivoltin et bivoltin $\times$ bivoltin pendant l'hiver, l'été et la saison des pluies en 1993-94 pour évaluer la qualité de la nourriture. Les caractères des cocons sont enregistrés et la qualité de la feuille de différentes variétés de mûrier est mesurée par l'efficacité de production de coques soyeuses (PECS) qui est calculée comme suit :

$$\text{PECS} = \frac{\text{Poids de la coque soyeuse}}{\text{Quantité de feuilles ingérées}} \times 100$$

Le PECS est en général considéré comme l'indicateur final d'évaluation de la valeur nutritive des feuilles de mûrier (Machii et Katagiri, 1991 ; Sarkar et Fujita, 1994) et des valeurs élevées de PECS indiquent une acceptabilité élevée de la nourriture par le ver à soie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement en feuilles :

Le rendement total en feuilles pendant trois années est présenté dans le Tableau III. Il est clair d'après le Tableau III que le pourcentage d'augmentation du rendement est très significatif. L'introduction de la variété Kanva-2 en 1968 a fait passer la production de mûrier de 21562 kg à 30459 kg/ha/an soit une augmentation de 41,26 %. Progressivement, S-36 et S-54 ont été recommandées sur le terrain par l'Institut en 1984, ce qui a permis d'augmenter le rendement en feuilles de plus de 50 % par rapport à Kanva-2. La variété récemment recommandée, Victory-1, est encore meilleure car elle donne un rendement de 71 917 kg/ha/année ce qui représente une augmentation de près de 56 % par rapport à S-36.

Efficacité physiologique :

L'efficacité physiologique mesurée par le taux de photosynthèse, le taux de transpiration, l'efficacité d'utilisation de l'eau (photosynthèse/transpiration) et la teneur totale en chlorophylle est présentée dans le Tableau IV. Une observation du Tableau IV indique que la variété Victory-1 a un taux de photosynthèse plus élevé et un taux de transpiration réduit par comparaison aux autres variétés de mûrier étudiées. L'efficacité physiologique élevée et les caractères morphologiques supérieurs de V-1 pourraient avoir contribué à une production plus importante. L'efficacité élevée d'utilisation de l'eau de Victory-1 mesurée par le rapport taux de photosynthèse / taux de transpiration indique également sa capacité à résister à un stress hydrique limité. Les valeurs plus faibles d'efficacité d'utilisation de l'eau chez S-36 et S-54 indiquent que ces variétés ne conviennent que lorsque l'irrigation est assurée.

Composition chimique des feuilles :

La composition chimique des feuilles de toutes les variétés et de la variété locale est présentée dans le Tableau V. L'observation du Tableau V indique que les variétés Kanva-2 et Local ont la même teneur en humidité. La teneur en humidité des feuilles de toutes les variétés mises au point (74,50 % à 75,70 %) s'avère meilleure que celle de la variété locale (68,88 %) et de Kanva-2 (69,5 %). La teneur en protéines brutes chez les variétés S-54, S-36 et Victory-1 est plus importante de 50 % (22,23, 23,89 et 24,56 respectivement) contre 16,74 % pour la variété locale et 18,37 % chez Kanva-2. Des valeurs

significativement plus élevées sont obtenues chez toutes les variétés améliorées pour les sucres totaux et les sucres réducteurs quand on les compare à la variété locale.

Rétention d'humidité :

La saveur des différentes variétés de mûrier pendant l'élevage du ver à soie dépend de la quantité d'humidité retenue au cours de la récolte, du transport et de la conservation. L'humidité retenue dans les feuilles des différentes variétés après la récolte, le transport et la conservation qui s'ensuit dans la magnanerie est présentée dans le Tableau VI. Il est évident d'après le tableau que les variétés S36 et V-1 ont la capacité la plus élevée pour retenir l'humidité quatre heures après la cueillette. La variété locale, Kanva-2 et S-54 ont le taux d'humidité le plus bas quatre heures après la cueillette.

Réaction aux maladies importantes :

L'incidence des maladies enregistrée chez les différentes variétés montre que la résistance à la rouille de la feuille et à la tache de la feuille des variétés mises au point est soit supérieure soit similaire à la variété locale (Tableau VII).

Evaluation biologique :

On a jugé de l'acceptation des variétés en réalisant un élevage complet pendant trois saisons couvrant une année complète avec des hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin et bivoltin $\times$ bivoltin. Dans le cas de l'hybride polyvoltin $\times$ bivoltin, des pontes F1 de Pure Mysore $\times$ NB4D2 sont utilisées et la performance d'élevage est présentée dans le Tableau VIII. De même, pour l'hybride bivoltin $\times$ bivoltin, un croisement entre NB4D2 et CC1 est utilisé et la performance d'élevage est présentée dans le Tableau IX. Il est évident d'après les données que la variété de mûrier, Victory-1, présente une supériorité pour la plupart des caractères économiques surtout pour le taux effectif d'élevage (ERR), le poids du cocon et le poids de la coque. Il est aussi clair d'après les Tableaux VIII et IX que jusqu'à la mise au point de la variété Victory-1, les variétés n'avaient pas un impact aussi important pouvant donner une performance d'élevage supérieure. Toutes les variétés mises au point avant V-1, c'est à dire Kanva-2, S-36 et S-54 ont une performance d'élevage plus ou moins similaire et aucune des variétés n'a été jugée supérieure ou inférieure à celles mises au point avant.

Utilisation de la feuille :

L'utilisation de différentes variétés de mûrier par un ver à soie hybride à la fois poly $\times$ bi et bi $\times$ bi a été mesurée pendant l'hiver et le résultat est présenté dans le Tableau X avec l'efficacité de production de coques soyeuses (PECS) pour chaque variété de mûrier. Il est évident d'après le Tableau X que l'efficacité d'utilisation de la feuille mesurée d'après la valeur du PECS augmente quand les vers à soie sont nourris avec des feuilles de Victory-1. La valeur de PECS élevée obtenue dans l'expérience avec la variété de mûrier V-1 chez l'hybride bivoltin (14,8 %) est comparable au résultat obtenu par Sarkar et Fujita (1994) au Japon. Dans le cadre d'une étude d'évaluation testant six variétés de mûrier améliorées, ils ont observé que la variété Hichinose donnait le PECS le plus élevé (14,07). Les valeurs PECS élevées relevées pour la variété Victory-1 à la fois pour l'hybride polyvoltin $\times$ bivoltin et pour l'hybride bivoltin $\times$ bivoltin indiquent que cette variété donne une meilleure convertibilité et finalement une production de cocons plus élevée avec une consommation de feuilles moins importante.

Analyse du processus de mise au point de la variété Victory 1 (V-1) et recommandation de plan de breeding pour les tropiques :

Une analyse des parents de Victory-1 indique que la variété a été mise au point à partir d'un croisement entre S-30 et C-776. S-30 est un génotype prometteur au rendement élevé mis au point par le CSRTI de Mysore pour le sud de l'Inde et C-776 est un génotype au rendement élevé mis au point au CSRTI de Berhampore pour l'est de l'Inde. Bien que les deux parents viennent de la zone

tropicale indienne, les endroits sont assez distants et donc les parents géographiquement éloignés contribuent probablement à produire une hétérosis favorable. De plus, la variété C-776 vient d'un croisement unique où le parent femelle est *Morus multicaulis*. *Morus multicaulis* est bien connu pour sa supériorité nutritionnelle. Bien que la variété, *M. multicaulis* vienne d'une zone tempérée, elle présente un pourcentage de racinement très élevé et dans la région tropicale elle ne présente pas de dormance élevée pendant les mois d'hiver. Il faudrait utiliser des variétés tempérées exotiques ayant aucune ou peu de dormance comme l'un des parents pour mettre au point des variétés dans des conditions tropicales et pour améliorer le rendement et la qualité.

Méthode de sélection et d'évaluation :

Le criblage et la sélection de la population hybride après hybridation pourraient être faits d'après la méthode décrite par Finnley (1958) et Currow (1961). Les descendances d'hybrides sont en premier lieu soumises à des essais préliminaires pendant lesquels les géotypes indésirables sont éliminés. Le reste subit un test plus complet (final) où le critère principal pour la sélection est le rendement. Les géotypes avec le rendement le plus élevé sont comparés avec les variétés établies et ceux qui s'avèrent supérieurs passent dans l'usage commercial. Le même procédé décrit plus haut a été suivi pour mettre au point la variété de mûrier V-1. Au stade final, les géotypes supérieurs sont soumis à un test d'élevage et de capacité de racinement avant d'être recommandés aux fermiers.

EVALUATION OF SPECIFIC PARAMETERS IN THE ISOLATION OF PROTOPLASTS FROM MESOPHYLL CELLS OF THREE MULBERRY CULTIVARS

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.

*Significance of type of mulberry (**Morus indica** L.) cultivar, enzyme treatment duration and level of the solute during protoplast isolation from mesophyll cells of mulberry has been investigated. For this purpose, axenic shoot cultures of three mulberry cultivars i.e. K₂, S₁₃ and S₃₆ were raised via culture of nodal explants. From the results, it may be concluded that protoplast yield in mulberry is cultivar dependent. 12-13 hours prolonged incubation of cv. S₃₆ resulted in higher protoplast yield compared to cvs. K₂ and S₁₃. However, 9 hours of short duration incubation is preferable to get maximum protoplast yield from cvs. K₂ and S₁₃. 0.5 M concentration of mannitol as osmoticum was found to be more appropriate for protoplast isolation.*

Keywords: *Morus indica*, cvs. K₂, S₁₃ and S₃₆, protoplast isolation, cultivar dependent, cellulase onozuka R-10, macerozyme R-10.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus indica* L.) plants play a significant role in the silk industry and forestry (Hossain *et al.*, 1992; Zaman *et al.*, 1993, 1996; Kathiravan *et al.*, 1995; Tewary *et al.*, 1996). Selection of novel genotypes showing high yield, suitability to silkworm rearing and resistance to different abiotic stress factors i.e., tolerance to water stress, alkalinity and salinity is always desirable. Protoplast culture and fusion can facilitate the combination of such useful traits by producing somatic hybrids. Somatic hybridization provides an alternative method to conventional hybridisation for improving mulberry. These unique properties of protoplast have opened up an entirely new area of fundamental and applied research in experimental biology and somatic cell genetics. However, for the successful application of these techniques the availability of an efficient procedure for protoplast isolation is a prerequisite. In mulberry not much work has been done in this regard except a few reports on isolation (Ohyama and Oko, 1975; Ohnishi and Kiyama, 1987; Katagiri, 1988; 1989; Tewary and Lakshmisita, 1992; Tewary *et al.*, 1995; Chand *et al.* 1996; Tohjima *et al.*, 1996).

The experiment described in this paper was carried out to improve the yield of protoplasts from mesophyll cells by analysing three specific parameters i.e., the type of mulberry cultivar used during protoplast isolation (K₂, S₁₃ and S₃₆), the effect of duration of enzyme treatment (prolonged and short duration incubation period) and the effect of osmoticum level (0.4M, 0.5M and 0.6M).

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

Axenic shoot cultures of three mulberry cultivars of *Morus indica* namely K₂, S₁₃ and S₃₆ were used for the isolation of mesophyll protoplasts. Leaves from *in vitro* grown plants were always found to be more promising for protoplast isolation than those of *in vivo* plants (Tewary and Lakshmisita, 1992). To initiate axenic cultures, the nodal explants were found to be the best source for rapid micropropagation of mulberry through *in vitro* cloning (Zaman *et al.*, 1996).

Young fully expanded leaves of 2-3 cm in length and 1-1.5 cm in width were excised from all the parts of the shoots (3-4 cm) approximately 10-15 days from the beginning of the subculture. The leaves were cut into pieces smaller than 1 mm and incubated in filter sterilised enzyme solution. The enzyme solution consisted of 2% cellulase "Onozuka" R-10 and 1% macerozyme R-10 prepared in MS (Murashige and Skoog, 1962) salts at pH 5.5 with mannitol as osmoticum. Different levels of osmoticum (0.4 M, 0.5 M and 0.6 M) were tried to optimise the level of osmoticum to get better protoplast yield.

The sliced leaf pieces were incubated in 10 ml of enzyme solution at 27° C and shaken at 40-50 rpm for 5 hours. After being left stationarily over a period of 1-10 hours, the protoplasts were then purified by 60 µm steelmesh. The filtrate was collected in screw cap centrifuge tube and centrifuged at 50 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet containing protoplasts was floated on 20% sucrose solution for purification and centrifuged at 100g for 10 minutes to get a distinct protoplast band. The band was taken in a screw cap centrifuge tube and washed with 5 ml of 0.5M mannitol by centrifuging at 50g for 5-7 minutes. The pellet was suspended in culture medium containing MS + 0.5M mannitol + 2,4-D and BAP and the protoplast yield was estimated by using hemocytometer. Upto 15 hours from the start of incubation, protoplast in 500 µl aliquotes were removed and centrifuged every hour and used for microscopic investigations.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of duration of enzyme treatment on protoplast isolation:

In the case of two mulberry cultivars K₂ & S₁₃, prolonged incubation periods i.e., 12-13 hours were observed to be unfavourable for a good protoplast yield. Longer duration of incubation caused shrinkage of protoplasts in these cultivars. Sliced explants of cvs. K₂ and S₁₃ immersed in the enzyme mixture shaken at 40-50 rpm in dark for 5 hours and being left stationary for 4 hours, resulted in better yield of protoplasts. The number of protoplasts increased with treatment time and it reached a peak at 9 hours of incubation (5 hours shaken and 4 hours stationary) in dark. Beyond 9 hours of incubation the protoplast yield gradually decreased and further resulted in shrinkage of protoplasts at 12-13 hrs of incubation. From these results, it is estimated that the adequate time for enzyme treatment to isolate maximum number of protoplasts from mesophyll cells of cvs. K₂ (Fig. 1a) and S₁₃ (Fig. 1b) is 9 hours (5 hours shaken and 4 hours stationary incubation) in dark.

Several authors have reported that cell digestion and protoplast yield in case of cvs. K₂ and S₁₃ were fairly good during 12-13 hours incubation in the dark (Tewary and Lakshmisita, 1992, Tewary *et al.*, 1995; Chand *et al.*, 1996) in contrast to our observations. However, our findings agree with the result of Tohjima *et al.*, (1996) who have examined a similar effect of enzyme treatment time for shorter duration (4 hours) on protoplast isolation from seedling cotyledons of mulberry.

Contradictory to the above findings, a prolonged incubation in dark for 12-13 hours resulted in much increase in protoplast yield from mesophyll cells of cv. S₃₆ (Fig. 2). The number of mesophyll protoplasts isolated for every hour, after being incubated in the enzyme solution for increasing time (up to 15 hours) is shown in Fig. 3. In the case of cvs. K₂ and S₁₃, the number of protoplasts increased with treatment time and reached peak at 9 hours (6×10^6 and 5.6×10^6 respectively). In case of cv. S₃₆, the number of protoplasts increased during longer incubation period i.e., 12-13 hours (5 hours

shaken and 7-8 hours stationary incubation) and reached a maximum of 6.2×10^6 . Tohjima *et al.*, (1996) have opined that cell walls are not completely digested in shorter treatment times, but some protoplasts get released during longer treatment times. The above statement was found to be correct in accordance with our findings that the cell walls of cvs. K₂ and S₁₃ get completely digested in shorter enzyme treatment time, but protoplasts of cv. S₃₆ get released during longer treatment times.

The result of the present investigation has revealed the importance of incubation time on protoplast yield which in turn is cultivar dependent. Earlier studies on plant induction from winter buds (Oka, 1985), axillary buds (Jain *et al.*, 1990), leaf explants (Wen *et al.*, 1990) and nodal explants (Tewary *et al.*, 1996) of mulberry genotypes showed that the *in vitro* regeneration is genotype dependent. Even if the *in vitro* regeneration is genotype dependent as the protoplast yield, the mechanism involved in the two physiological behaviours is probably completely different and depending on different factors.

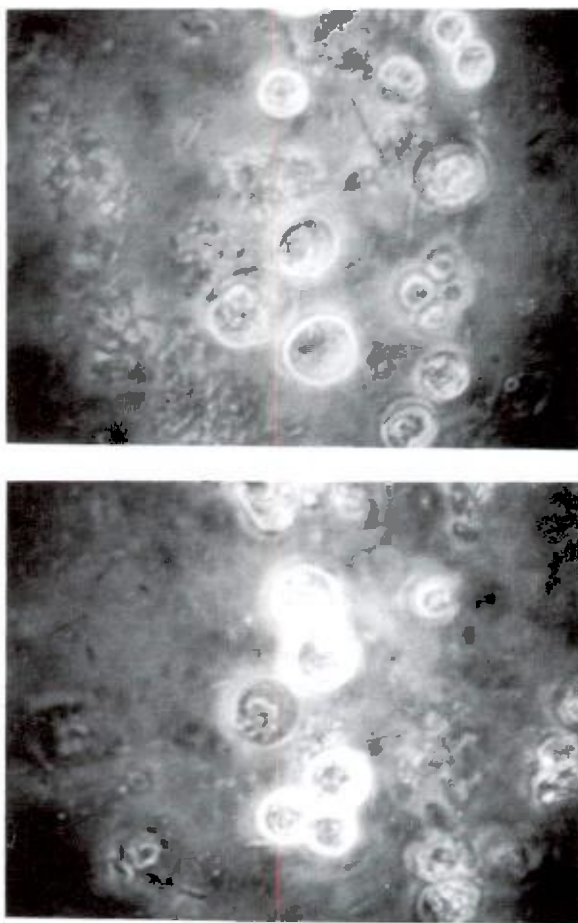


Fig 1. Freshly isolated mesophyll protoplasts after 9 hours of incubation in enzyme solution from (a) K₂ cultivar (b) S₁₃ cultivar.

Fig. 1. Protoplastes du mésophylle fraîchement isolés du cultivar K₂ (a) et du cultivar S₁₃ (b) après 9 heures d'incubation dans une solution enzymatique.

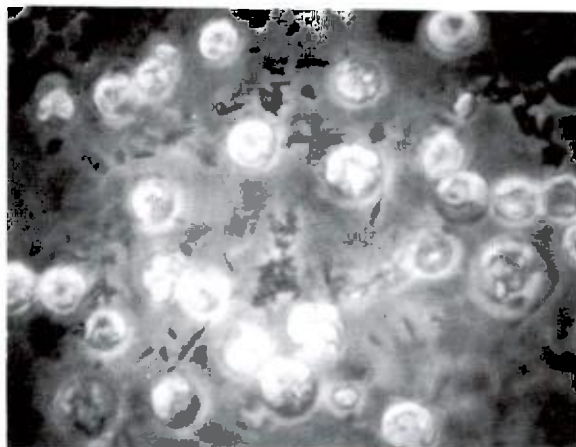


Fig. 2. Freshly isolated mesophyll protoplasts from S₃₆ cultivar after 13 hours of incubation in enzyme solution.

Fig. 2. Protoplastes du mésophylle fraîchement isolés du cultivar S₃₆ après 13 heures d'incubation dans une solution enzymatique.

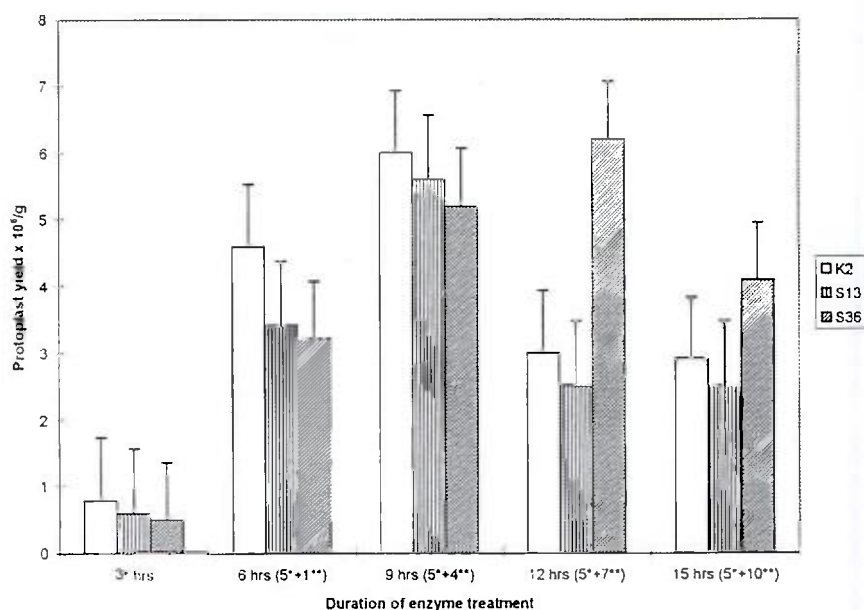


Fig. 3. Time schedule for the release of mesophyll protoplasts isolated from three mulberry cultivars (K2, S13 and S36).

Leaves were excised after 10-15 days from subculture. Protoplasts were prepared with 0.5 M mannitol. The bar shows standard error.

Fig. 3. Cinétique de la libération des protoplastes isolés du mésophylle sur trois cultivars de mûrier (K2, S13 et S36).

Les feuilles sont prélevées de la sous-culture après 10 à 15 jours. Les protoplastes sont préparés avec 0,5 M de mannitol. La barre montre l'écart type.

(* = shaken / agité ; ** = stationary / stationnaire)

Effect of osmoticum levels on protoplast isolation:

Three concentrations of mannitol 0.4M, 0.5M and 0.6M as osmoticum were tried in the enzyme solution (described above) to get fruitful protoplast yield from mesophyll cells of mulberry. Of all the concentrations tried, 0.5M was found to be the most appropriate and was reported to be the right osmoticum level for keeping mulberry protoplast intact in all the three cultivars (K2, S13 and S36) investigated. This is contradictory to all the earlier reports in which 0.6M concentration of mannitol was considered to be more favourable for mesophyll protoplast isolation (Tewary and Lakshmisita, 1992; Tewary, 1995; Chand *et al.*, 1996; Tohijima *et al.*, 1996). In the present studies, 0.4M concentration resulted in deformity of protoplast structure and this ultimately caused protoplast shrinkage. However, 0.6 M concentration resulted in enlargement of isolated protoplasts and caused bursting.

In conclusion, it may be said that optimisation of protocols for protoplast isolation from mulberry cultivars needs a prior understanding with regard to the status of cultivar used in the process. Our data confirm the importance of mulberry cultivar, effect of enzyme treatment time and level of osmoticum in protoplast isolation and its yield. More research would be warranted to find the favourable conditions permitting better cultivar independent protoplast yield from mesophyll cells of mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr R. K. Datta, Director, CSRTI, Mysore for providing mulberry cultivars. This research has been financed by the Department of Biotechnology, 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.
- HOSSAIN M., RAHMAN S. M., ZAMAN A., JOARDER O. I., ISLAM R. (1992) Micropropagation of *Morus laevigata* Wall. From mature trees. *Plant Cell Rep.*, 11, 522-524.
- JAIN A.K., DANDIN S. B., SENGUPTA K. (1990) Micropropagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. *Plant Cell Rep.*, 8, 737-740.
- KATAGIRI K. (1988) Specific and cultural differences in division of cells in culture of mulberry mesophyll protoplasts. *J. Seric. Sci. Japan.*, 57- 445-416.
- KATAGIRI K. (1989) Colony formation in culture of mulberry mesophyll protoplasts. *J. Seric. Sci. Japan.*, 58, 267-268
- KATHIRAVAN K., GANAPATHI A., SHAJAHAN A. (1995) Evaluation of *in vitro* response of mulberry genotypes. *Sericologia.*, 35, 305-317.
- MURASHIGE, SKOOG (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- OHNISHI T., KIYAMA S. (1987) Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance. *J. Seric. Sci. Japan.*, 56, 407-410.
- OHYAMA K., OKO S. (1975) Isolation of protoplasts in Moraceae. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan.*, 44, 121-122.
- OKA S. (1985) *In vitro* culture of isolated buds and organ formation in mulberry. *Bull. Seric. Exp. Stn.*, 29, 747-852.
- 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., RANGA SWAMY N. S., (1995) Isolation and culture of mulberry (*Morus alba* L.) protoplasts from callus tissues. *Indian J. Plant physiol.*, 38, 114-117.

- TEWARY P. K., RAGHUNATH M. K., VENKATESHWARLU M., SARKAR A. (1996) Genotype differences in response to *in vitro* shoot development of mulberry (*Morus* spp.). Indian J. Seric., 35, 104-106.
- 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.
- WEN K. L., ZHENG S. X., BIAN B. S. (1990) Leaf culture and plant regeneration of different mulberry varieties. Sci. Seric., 16, 198-202.
- ZAMAN A., ISLAM R., BARMAN A. C., JOARDER O. I. (1996) Propagation of mulberry through *in vitro* shoot proliferation: Effects of different seasons. Sericologia, 36, 545-550.
- ZAMAN A., ISLAM R., HOSSAIN M., BARI M. A., JOARDER O. I. (1993) Plant regeneration and seedless fruit formation in nodal explant cultures of *Morus alba* L. cv. S₁. Sericologia, 33, 313-318.

EVALUATION DE PARAMETRES SPECIFIQUES POUR ISOLER DES PROTOPLASTES A PARTIR DE CELLULES DU MESOPHYLLE CHEZ TROIS CULTIVARS DU MURIER

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 étudié l'importance du type de cultivar de mûrier (*Morus indica* L.), de la durée du traitement enzymatique et du niveau de soluté pendant l'isolement de protoplasme à partir de cellules de mésophylle de mûrier. Dans ce but, nous avons effectué des cultures axéniques de pousses de trois cultivars de mûrier, K₂, S₁₃ et S₃₆ à partir de la culture d'explants nodaux. Les résultats permettent de conclure que le rendement en protoplastes chez le mûrier dépend du cultivar. Chez le cultivar S₃₆, une incubation prolongée de 12 à 13 heures donne un rendement plus élevé en protoplastes comparé aux cvs. K₂ et S₁₃. Cependant chez les cultivars K₂ et S₁₃, une durée d'incubation courte de 9 heures est préférable pour obtenir un rendement maximum en protoplastes. Pour la substance osmotique, nous constatons qu'une concentration en mannitol de 0,5 M est la plus appropriée pour l'isolement des protoplastes.*

INTRODUCTION

Les plants de mûrier (*Morus indica* L.) ont un rôle important dans l'industrie séricicole (Hossain et coll., 1992 ; Zaman et coll., 1993, 1996 ; Kathiravan et coll., 1995 ; Tewary et coll., 1996). La sélection de nouveaux génotypes au rendement élevé, convenant à l'élevage des vers à soie et avec une résistance à différents facteurs de stress abiotique comme la tolérance au stress hydrique, à l'alcalinité et à la salinité est toujours recherchée. La culture et la fusion de protoplastes peuvent faciliter l'association de ces traits utiles en produisant des hybrides somatiques. L'hybridation somatique est une alternative à l'hybridation conventionnelle pour améliorer le mûrier. Les propriétés uniques du protoplasme ont débouché sur un domaine entièrement nouveau de recherche fondamentale et appliquée en biologie expérimentale et en génétique des cellules somatiques. Cependant, pour que ces techniques soient appliquées avec succès, il faut d'abord qu'il existe une procédure efficace pour l'isolement des protoplastes. Peu de recherches ont été faites dans ce domaine chez le mûrier, si ce n'est quelques rapports sur l'isolement (Ohyama et Oko, 1975 ; Ohnishi et Kiyama, 1987 ; Katagiri, 1988 ; 1989 ; Tewary et Lakshmisita, 1992 ; Tewary et coll., 1995 ; Chand et coll., 1996 ; Tohjima et coll., 1996).

L'expérience décrite dans cet article a été réalisée pour améliorer le rendement en protoplastes à partir de cellules du mésophylle grâce à l'analyse de trois paramètres spécifiques : le type de cultivar de mûrier utilisé (K₂, S₁₃ et S₃₆), l'effet de la durée du traitement enzymatique (durée d'incubation longue et courte) et l'effet de la force osmotique (0,4 M, 0,5 M et 0,6 M).

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

Des cultures de pousses axéniques de trois cultivars de mûrier de *Morus indica* en l'occurrence K₂, S₁₃ et S₃₆ ont été utilisées pour l'isolement des protoplastes du mésophylle. Les feuilles de plantes cultivées *in vitro* ont toujours été trouvées plus prometteuses pour l'isolement des protoplastes que celles des plantes *in vivo* (Tewary et Lakshmisita, 1992). Pour démarrer les cultures axéniques, les explants nodaux constituent la meilleure source pour une micro-propagation rapide du mûrier par clonage *in vitro* (Zaman et coll., 1996).

Des jeunes feuilles complètement développées de 2 à 3 cm de longueur et de 1 à 1,5 cm de largeur sont prélevées à tous les endroits sur les pousses (3 à 4 cm) approximativement 10 à 15 jours après le début de la sous-culture. Les feuilles sont coupées en morceaux inférieurs à 1 mm et incubées dans une solution enzymatique stérilisée et filtrée. La solution enzymatique comprend 2 % de cellulase "Onozuka" R-10 et 1 % de macerozyme R-10 préparée dans un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) au pH de 5,5 avec du mannitol comme soluté osmotique. Différentes concentrations de substance osmotique ont été essayées (0,4 M, 0,5 M et 0,6 M) pour optimiser le niveau de substance osmotique afin d'obtenir le meilleur rendement en protoplastes.

Les morceaux de feuille découpés sont incubés dans 10 ml de solution enzymatique à 27° C et secoués à 40-50 tpm pendant 5 heures. Après les avoir laissés au repos pendant 1 à 10 heures, les protoplastes sont ensuite purifiés à travers un tamis en acier de 60 µm de maille. Le filtrat est recueilli dans un tube à centrifugeuse avec un bouchon à pas de vis et centrifugé à 50 g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot contenant les protoplastes est suspendu dans une solution de saccharose à 20 % pour la purification et centrifugé à 100g pendant 10 minutes pour obtenir une bande de protoplaste distincte. La bande est placée dans un tube pour centrifugeuse au bouchon à pas de vis et lavée avec 5 ml de mannitol à 0,5 M, en la centrifugeant à 50 g pendant 5 à 7 minutes. Le culot est suspendu dans un milieu de culture contenant du MS + du mannitol à 0,5 M + 2,4-D et du BAP et le rendement en protoplastes est estimé en utilisant un hémocytomètre. Quinze heures après le début de l'incubation, les protoplastes en aliquots de 500 µl sont centrifugés toutes les heures et utilisés pour des études microscopiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet de la durée du traitement enzymatique sur l'isolement du protoplaste :

Chez les cultivars de mûrier K₂ et S₁₃, on observe que des périodes d'incubation prolongées c'est à dire de 12 à 13 h ne sont pas favorables à un bon rendement en protoplastes. Une durée d'incubation plus longue provoque le rétrécissement des protoplastes de ces cultivars. Des coupes d'explants des cvs. K₂ et S₁₃ immergées dans le mélange d'enzyme secoué à 40 à 50 tpm dans l'obscurité pendant 5 heures et laissées au repos pendant 4 heures, donnent un meilleur rendement en protoplastes. Le nombre de protoplastes augmente avec la durée du traitement et il atteint un sommet après 9 heures d'incubation dans l'obscurité (secoué pendant 5 heures et stationnaire pendant 4 heures). Au-delà de 9 heures d'incubation, le rendement en protoplastes baisse progressivement et 12 à 13 heures d'incubation entraînent un rétrécissement supplémentaire des protoplastes. D'après ces résultats, nous estimons que chez les cultivars K₂ (Fig. 1a) et S₁₃ (Fig. 1b), la durée adéquate de traitement enzymatique pour isoler le nombre maximum de protoplastes à partir des cellules du mésophylle est de 9 heures dans l'obscurité (5 heures d'agitation et 4 heures d'incubation stationnaire).

Plusieurs auteurs ont observé que la digestion des cellules et le rendement en protoplastes sont assez bons après 12 à 13 heures d'incubation dans l'obscurité (Tewary et Lakshmisita, 1992, Tewary et coll., 1995 ; Chand et coll., 1996) chez les cultivars K₂ et S₁₃ contrairement à nos observations. Cependant, nos observations concordent avec les résultats obtenus par Tohjima et coll., (1996) avec une durée de traitement enzymatique plus courte (4 heures) pour isoler des protoplastes à partir des cotylédons de jeunes plants de mûrier.

Contrairement aux observations ci-dessus, chez le cultivar S36, une incubation prolongée dans l'obscurité de 12 à 13 heures entraîne une augmentation importante du rendement en protoplastes à partir des cellules du mésophylle (Fig. 2). Le nombre de protoplastes du mésophylle isolé toutes les heures, après avoir été incubé dans une solution d'enzymes pendant une durée plus longue (jusqu'à 15 heures) est présenté sur la Fig 3. Chez les cvs. K2 et S13, le nombre de protoplastes augmente avec la durée du traitement et atteint un sommet au bout de 9 heures (6×10^6 et $5,6 \times 10^6$ respectivement). Chez le cv. S36, le nombre de protoplastes augmente quand la durée d'incubation est plus longue, c'est à dire de 12 à 13 heures (5 heures d'incubation agitée et 7 à 8 heures d'incubation stationnaire) et atteint un maximum de $6,2 \times 10^6$. Tohjima et coll., (1996) ont émis l'opinion que les parois des cellules ne sont pas complètement digérées avec des durées de traitement plus courtes mais que certains protoplastes sont libérés avec des traitements plus longs. Cette affirmation est en accord avec nos observations : avec les cvs. K2 et S13 les parois des cellules sont complètement digérées avec une durée de traitement enzymatique plus courte, mais les protoplastes du cv. S36 sont libérés avec des durées de traitement plus longues.

Les résultats de cette étude révèlent l'importance de la durée d'incubation sur le rendement en protoplastes, qui à son tour dépend du cultivar. Des études précédentes sur l'induction de plantes à partir de bourgeons d'hiver (Oka, 1985), de bourgeons axillaires (Jain et coll., 1990), d'explants de feuilles (Wen et coll., 1990) et d'explants nodaux (Tewary et coll., 1996) avec des génotypes de mûrier ont montré que la régénération *in vitro* dépend du génotype. Si la régénération *in vitro* dépend du génotype comme le rendement en protoplastes, le mécanisme impliqué dans les deux comportements physiologiques est probablement complètement différent et dépend de facteurs différents.

Effet des niveaux osmotiques sur l'isolement du protoplaste :

Trois concentrations en mannitol de 0,4 M, 0,5 M et 0,6M ont été essayées comme substance osmotique dans la solution enzymatique (décrite plus haut) afin d'obtenir un rendement intéressant en protoplastes à partir des cellules du mésophylle de mûrier. Sur toutes les concentrations essayées, celle de 0,5 M est la meilleure et on constate qu'elle convient comme niveau osmotique pour conserver les protoplastes de mûrier intacts chez les trois cultivars de mûrier étudiés (K2, S13 et S36). Ceci est contraire aux précédents rapports publiés qui ont montré qu'une concentration en mannitol de 0,6M convient mieux à l'isolement de protoplastes du mésophylle (Tewary et Laksmisita 1992 ; Tewary, 1995 ; Chand et coll., 1996 ; Tohjima et coll., 1996). Dans l'étude présente, une concentration de 0,4M a entraîné une déformation de la structure du protoplaste, qui a finalement entraîné le rétrécissement du protoplaste. Alors qu'une concentration de 0,6 M entraîne l'agrandissement des protoplastes isolés et leur éclatement.

En conclusion, on peut dire que pour optimiser les protocoles d'isolement des protoplastes chez les cultivars de mûrier il faut d'abord une connaissance du cultivar utilisé pendant la procédure. Nos résultats confirment l'importance du cultivar de mûrier, l'effet de la durée du traitement enzymatique et du niveau osmotique pour l'isolement du protoplaste et son rendement. Il faudrait des recherches supplémentaires pour trouver les conditions favorables à un meilleur rendement en protoplastes indépendant du cultivar à partir des cellules du mésophylle chez le mûrier.

EFFICACY OF BIOCONTROL AGENTS AND PLANT PRODUCTS AGAINST *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *MORI* AND *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *MORI* CAUSING BACTERIAL BLIGHT IN MULBERRY

M. F. BAQUAL, D. D. SHARMA, V. P. GUPTA & D. S. CHANDRASHEKAR

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

The efficacy of different biocontrol agents and plant products was tested *in vitro* against *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (*Psm*) and *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (*Xcm*) causing bacterial blight in mulberry. The efficacy of these bioagents was compared with the recommended chemical fungicide (Dithane M-45, @ 0.2%) and agricultural antibiotic (Streptocycline, @ 0.1%). Of the twelve biocontrol agents, *P. fluorescens* (PF-2) and *T. harzianum* (TH-1) were found most effective against both the pathogens and were rated under strong antagonist category. With regards to five plant products tested, Neemgold (Azadirachtin 0.15% EC) gave the highest inhibition zone of 18.3, 23.2 and 28.3 mm against *Psm* and 9.0, 12.0 and 20.0 mm against *Xcm* at 0.1, 0.2 and 0.3% concentrations, respectively. The degree of antagonism for the above plant products was assessed as moderate to strong. However, the efficacy of antibiotic was significantly higher when compared to biocontrol agents, plant products and fungicides.

Keywords: Biocontrol agents, plant products, *P. syringae* pv. *mori*, *X. campestris* pv. *mori*, mulberry.

INTRODUCTION

Bacterial blight disease of mulberry caused by *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer & Lambert) Young, Dye & Wilkie and *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson has become a major problem for mulberry cultivation during rainy season in tropical countries. Presently, the disease has spread in almost all the sericultural practising states of India and results in quantitative as well as qualitative degradation of mulberry foliage (Teotia and Mandal, 1993; Maji *et al.*, 1996; Philip *et al.*, 1997). Although agricultural antibiotic, Streptocycline @ 0.1% and chemical fungicide, Dithane M-45 (Mancozeb 75% WP) @ 0.2% have been recommended for the control of bacterial blight in mulberry (Sengupta *et al.*, 1990; Teotia and Mandal, 1993), their use in controlling the disease is expensive, besides the fungicides being hazardous to environment. Therefore, the use of biocontrol agents and plant products in disease management is one of the safe alternatives to chemicals. Several biocontrol agents and plant products, especially neem-derivatives (*Melia azadirachta* L.) possessing bactericidal properties are being investigated to prevent the bacterial diseases in many agricultural crops (Bora *et al.*, 1993; Saikia and Chowdhary, 1993; Arya and Parashar, 1997; Ahuja, 1997; Hulloli *et al.*, 1998). However, no attempt has been made till date to control the bacterial blight of mulberry by using the biocontrol agents and plant products. Therefore, keeping this in view, the present study was undertaken to evaluate the potential of various biocontrol agents and plant products against *P. syringae* pv. *mori* (*Psm*) and *X. campestris* pv. *mori* (*Xcm*) causing bacterial blight of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Various biocontrol agents and plant products were tested for their bactericidal potential against *Psm* and *Xcm*, and their efficacy was compared with recommended fungicide (Dithane M-45) and antibiotic (Streptocycline).

1. Efficacy of biocontrol agents:

Twelve biocontrol agents including fungi and bacteria such as *Trichoderma harzianum* Rifai (isolates TH-1, TH-2 & TH-3), *T. viride* Pers. ex. Fr. Grey (isolates TV-1 & TV-2), *T. pseudokoningii* Rifai, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. (isolates BS-5a, BS-5b, BS-6 & BS-7) and *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula (isolates PF-1 and PF-2) were tested *in vitro* by employing different methods.

a. Paper disc method:

Metabolites of biocontrol agents were obtained by growing the fungal biocontrol agents on potato dextrose broth (HiMedia Co., India) and bacterial biocontrol agents on nutrient broth (HiMedia Co., India). Fifty ml of potato dextrose/nutrient broth was taken in 250 ml Erlenmeyer flask and sterilised. A 4-mm diameter plug of each biocontrol agent grown on potato dextrose agar (PDA) / nutrient agar (NA) in plates was aseptically transferred to cool broth and incubated at $30 \pm 2^\circ \text{C}$ for 2 days for bacterial biocontrol agents and 10 days for fungal biocontrol agents. After incubation, the culture filtrates were harvested by separating the biomass by filtering through Whatman filter Paper No. 1. Sterile 4-mm diameter discs of Whatman filter paper No. 1 were aseptically dipped in culture filtrates of biocontrol agents for 5 hrs. For comparative study, Dithane M-45 and Streptocycline solutions of their recommended concentrations of 0.2 and 0.1%, respectively were also taken for paper disc treatment. The suspension of both the pathogenic bacteria (*Psm* and *Xcm*) were mixed separately with sterilised lukewarm nutrient agar medium and poured in to 10-cm diameter petriplates. The treated paper discs were placed centrally in the plates with three replications for each treatment. The discs dipped in sterilised distilled water served as check. The plates were kept for incubation for 2 days at $30 \pm 2^\circ \text{C}$. After incubation, the inhibition zone was measured and the degree of antagonism was categorised in following classes.

I = Inhibition zone – nil	(Not antagonist)
II = Inhibition zone of 0 – 5 mm diameter	(Weak antagonist)
III = Inhibition zone of 6 – 20 mm diameter	(Moderate antagonist)
IV = Inhibition zone of 21-50 mm diameter	(Strong antagonist)
V = Inhibition zone of > 51 mm diameter	(Very strong antagonist)

b. Agar plug method :

The nutrient agar medium seeded with pathogenic bacteria, *Psm* and *Xcm* separately was poured in 10-cm diameter petriplates. The 4-mm diameter plugs cut from the actively growing colonies of biocontrol agents on PDA/NA were placed centrally in the plates seeded with *Psm* and *Xcm*. The plugs cut from the agar amended with Dithane M-45 @ 0.2% and Streptocycline @ 0.1% were also centrally inoculated to the *Psm* and *Xcm* seeded plates for comparative study. The plugs from the plain agar were used as check. Each treatment was replicated thrice. All the plates were incubated for 2 days at $30 \pm 2^\circ \text{C}$. The inhibition zone was measured and the degree of antagonism was classified as described earlier.

2. Efficacy of plant products:

Plant products especially neem-based such as Econeem (Azadirachtin 0.3% EC), Neemgold (Azadirachtin 0.15% EC), Nimbicidine (Azadirachtin 0.03% EC), Limbitor or ZA-199 (Azadirachtin 0.03% EC) and Amrutguard (Azadirachtin 0.03% EC) were tested at 0.1, 0.2 and 0.3% concentrations against *Psm* and *Xcm* by paper disc method. The concentrations were made by adding the sterilised distilled water with neem-based product (V/V). The Dithane M-45 and Streptocycline were also taken at similar concentrations to know the comparative efficacy. Sterilised distilled water was used as a check. Three replications were maintained for each treatment. Observations on the degree of antagonism were taken as described earlier.

Data were analysed after subjecting them to square root transformation by analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

1. Efficacy of biocontrol agents:

The biocontrol agents differed in their antagonistic action, not only between the species but also between the isolates of the same species. All the biocontrol agents, except *T. viride* (TV-1) showed moderate to strong degree of antagonism either against one or both the pathogenic bacteria (Table I). None of the biocontrol agents showed weak or very strong antagonism against any of the pathogenic bacteria. Among all the biocontrol agents tested, *P. fluorescens* (PF-2) and *T. harzianum* (TH-1) were found most effective against both the pathogens. Significantly, they produced very clear and sharp inhibition zone of 26 and 21 mm against *Xcm* while in case of *Psm* it was 28 and 23 mm, respectively. Both these antagonists showed the degree of antagonism under class IV, thus rated as strong antagonists.

2. Efficacy of plant products :

All the neem products showed varying degree of bactericidal effect against both the pathogenic bacteria. In general, antagonistic effect was slow at a lower concentration (0.1%) but gradually increased with the increase in concentration of plant products (Table II). Among all the plant products, Neemgold produced the highest inhibition zone of 18.3, 23.2 and 28.3 mm against *Psm* and 9.0, 12.0 and 20.0 mm against *Xcm* at 0.1, 0.2 and 0.3% concentrations, respectively. Its degree of antagonism was rated as moderate to strong. However, Nimbicidine showed the least antagonistic effect against *Psm* while Econeem showed least antagonism against *Xcm*. None of the plant products showed either weak or very strong antagonistic activity against both the bacteria.

With regard to the comparative efficacy of biocontrol agents and plant products with recommended fungicide and antibiotic, it was found that *P. fluorescens* (PF-2) and *T. harzianum* (TH-2) showed the degree of antagonism at par with fungicide against both the bacteria. However, the efficacy of antibiotic was significantly higher when compared to biocontrol agents, plant products and fungicide.

DISCUSSION

In the present study, among the bacterial and fungal biocontrol agents, *P. fluorescens* (PF-2) and *T. harzianum* (TH-1) were found most effective to inhibit the growth of the test bacteria (*Psm* and *Xcm*). Further, both the methods used for screening of biocontrol agents i.e., agar plug and paper disc were found equally effective. The inhibition of bacterial growth by the two biocontrol agents i.e.,

Table I. *In vitro* comparative efficacy of fungal and bacterial biocontrol agents, fungicide and antibiotics against bacterial blight pathogens.**Tableau I. Efficacité *in vitro* d'agents de lutte biologique fongiques et bactériens, d'un fongicide et d'un antibiotique contre les pathogènes de la flétrissure bactérienne.**

Treatments	<i>P. s. pv mori</i>			<i>X. c. pv. mori</i>		
	Inhibition zone (mm)		Degree of antagonism (class)	Inhibition zone (mm)		Degree of antagonism (class)
	Paper disc	Agar plug		Paper disc	Agar plug	
	Traitements	<i>P. s. pv. mori</i>			<i>X.c. pv. mori</i>	
	Zone d'inhibition (mm)		Degré d'antagonisme (classe)	Zone d'inhibition (mm)		Degré d'antagonisme (classe)
	Disque de papier	Tampon agar		Disque de papier	Tampon agar	
A. Fungal biocontrol agents / Agents fongiques de lutte biologique						
<i>Trichoderma harzianum</i> (TH-1)	23	23	IV	21	21	IV
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	0	0	I	20	20	III
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	0	0	I	12	12	III
<i>T. pseudokoningii</i>	12	12	III	16	16	III
<i>T. viride</i> (TV-1)	0	0	I	0	0	I
<i>T. viride</i> (TV-2)	0	0	I	15	15	III
B. Bacterial biocontrol agents / Agents bactériens de lutte biologique						
<i>Bacillus subtilis</i> (BS-5a)	10	10	III	18	18	III
<i>B. subtilis</i> (BS-5b)	14	14	III	0	0	I
<i>B. subtilis</i> (BS-6)	13	13	III	16	16	III
<i>B. subtilis</i> (BS-7)	11	11	III	15	15	III
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PF-1)	12	12	III	18	18	III
<i>P. fluorescens</i> (PF-2)	28	28	IV	26	26	IV
C. Fungicide / Fongicide						
Dithane M-45 (0.2%)	23	23	IV	21	21	IV
D. Antibiotic / Antibiotique						
Streptocycline (0.1%)	29	29	IV	27	27	IV
Check / Témoin	0	0	I	0	0	I
C.D at 5 %	0.69	0.69	—	0.75	0.75	—
D.C à 5 %						

Table II. *In vitro* comparative efficacy of plant products, fungicide and antibiotic against bacterial blight pathogens.

Tableau II. Efficacité comparative *in vitro* de produits à base de plantes, d'un fongicide et d'un antibiotique contre les pathogènes de la flétrissure bactérienne.

Treatments		<i>P. s. pv. mori</i>		<i>X. c. pv. mori</i>	
	Concentration (%)	Inhibition zone (mm)	Degree of antagonism (class)	Inhibition zone (mm)	Degree of antagonism (class)
Traitements		<i>P. s. pv. mori</i>		<i>X. c. pv. mori</i>	
		Zone d'inhibition (mm)	Degré d'antagonisme (classe)	Zone d'inhibition (mm)	Degré d'antagonisme (classe)
A. Plant products / Produits à base de plantes					
Necmgold	0.1	18.3	III	9.0	III
	0.2	23.2	IV	12.0	III
	0.3	28.3	IV	20.0	III
Nimbicidine	0.1	6.6	III	8.0	III
	0.2	8.6	III	10.6	III
	0.3	9.3	III	11.6	III
Econcem	0.1	14.0	III	7.3	III
	0.2	14.3	III	8.6	III
	0.3	15.3	III	11.6	III
Amrutguard	0.1	12.3	III	7.3	III
	0.2	13.0	III	11.0	III
	0.3	14.0	III	12.6	III
ZA-199	0.1	9.3	III	8.0	III
	0.2	11.6	III	9.0	III
	0.3	14.6	III	11.6	III
B. Fungicide / Fongicide :					
Dithane M-45	0.1	18.0	III	15.0	III
	0.2	23.0	IV	21.0	IV
	0.3	26.0	IV	24.0	IV
C. Antibiotic / Antibiotique :					
Streptocycline	0.1	29.0	IV	27.0	IV
	0.2	35.0	IV	30.0	IV
	0.3	40.0	IV	35.0	IV
Check / Témoin	-	0.0	I	0.0	I
CD at 5% / DC à 5 %					
Treatments / Traitements (A)		0.28		0.23	
Concentrations (B)		0.17		0.17	
A ×B		0.49		0.49	

P. fluorescens (PF-2) and *T. harzianum* (TH-1) might be due to the production of toxic substances/metabolites. *P. fluorescens* are known to produce phenazine and siderophore types of antibiotics which play the major role in suppressing the growth of various pathogens (Kloepper *et al.*, 1980; Loper, 1988). Similarly, *Trichoderma* species also produce active metabolites such as lytic enzymes, chitinases, gluconases, monobasic acids and trichodermin which kill many pathogenic fungi and bacteria (Chet, 1987; Anonymous, 1988). Control of bacterial blight and wilt diseases by using certain strains of *P. fluorescens* have also been reported by several workers (Arya and Parashar, 1997; Aino *et al.*, 1998). Besides, many workers have reported the effectiveness of phylloplane microbes including *T. harzianum* against various bacterial diseases under *in vitro* and *in vivo* conditions (Bora *et al.*, 1993; Saikia and Chowdhary, 1993).

In the present study, the bacterial antagonist *P. fluorescens* (PF-2) was superior to fungal antagonist *T. harzianum* (TH-1) in inhibiting the growth of *Psm* and *Xcm*. Similar observations were also made by Kim *et al.*, (1990) and Jubina and Girija (1998) who reported bacterial antagonist (*P. fluorescens*) superior to fungal antagonist (*T. harzianum*) in suppressing the growth of *Phytophthora capsici* causing blight of red pepper and foot rot of black pepper.

It was interesting to note that neem formulations especially Econeem with higher concentrations (0.3% EC) of azadirachtin was not as effective as Neemgold which contains azadirachtin of 0.15% EC. This indicates that azadirachtin is not the only active compound but other compounds also play a significant role in inhibiting the bacterial growth. Therefore, it is assumed that the higher reduction in the growth of bacteria by Neemgold might be due to a bactericidal action of azadirachtin as well as other compounds, like glyceric fatty acid esters (18% w/w) and ethoxylated fatty acid esters (35% w/w) which are present in Neemgold but not available in Econeem. The neem products are known for their bactericidal action against various plant pathogenic bacteria under *in vitro* and *in vivo* conditions (Ahuja, 1997; Hulloli *et al.*, 1998).

The present investigation appears to be the first report on the evaluation of various biocontrol agents and plant products for the control of bacterial disease in mulberry. Considering the above facts, the information generated in the study seem to be useful in developing an ecofriendly approach for bacterial disease management in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to Director, CSRTI, Mysore for providing the facilities and Mrs M. Rekha, Statistician for rendering help in statistical analysis.

REFERENCES

- AHUJA S. C. (1997) Field trials on promising herbal control of bacterial blight of paddy. International Conference on Integrated Plant Disease Management for Sustainable Agriculture, New Delhi, India (10-15 Nov. 1997), p. 19.
- AINO M., MACKAWA Y., MAYAMA S., KATO H. (1998) The use of endophytic bacteria in biological control. 7th International Congress of Plant Pathology – Edinburgh, Scotland (9-16 Aug. 1998). Vol. 1: Abstract 2-10-55.
- ANONYMOUS (1998) *Trichoderma* spp. – Natural friends of the farmer. Pestalogy, Scientia Publication Private Ltd., Bombay, India, pp. 19-23.
- ARYA S., PARASHAR R. D. (1997) Biological control of bacterial blight of cotton by phylloplane antagonists. International Conference on Integrated Plant Disease Management for Sustainable Agriculture. New Delhi, India (10-15 Nov. 1997), p. 195.
- BORA L. C., GANGOPADHYAY S., CHAND J. N. (1993) Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mungbean with phylloplane antagonists. Indian J. Mycol. Pl. Pathol., 23: 162-168.

- CHET I. (1987) *Trichoderma*—application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. In: Innovative approaches to plant disease control. (Ed. Chet, I.). Wiley-Interscience, New York, pp. 137-160.
- HULLOLI S. S., SINGH R. P., VERMA J. P. (1998) Management of bacterial blight of cotton induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* with the use of neem based formulations. Indian Phytopathol., 51: 21-25.
- JUBINA P. A., GIRIJA, V. K. (1998) Antagonistic rhizobacteria for management of *Phytophthora capsici*, the incitant of foot rot of black pepper. Indian J. Mycol. Pl. Pathol., 28: 147-153.
- KIM C. H., JEE H. J., PARK K. S., LEE D. J. (1990) Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red pepper. V. Performance of antagonistic agents in fields. Korean J. Plant Pathol., 6: 201-206.
- KLOPPER J. W., LEONG J., TEINTZE M., SCHROTH M. N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286: 885-886.
- LOPER J. E. (1988) Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Phythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. Phytopathology, 78: 166-172.
- MAJI M. D., QADRI S. M. H., PAL S. C. (1996) Bacterial leaf spot disease of mulberry in West Bengal. Indian Silk, 35 (6 & 7): 11-13.
- PHILIP T., GOVINDAIAH, BAJPAI A. K., NAGABUSHANAN G., NAIDU N. R. (1997) A preliminary survey on mulberry diseases in South India. Indian J. Seric., 36: 128-132.
- SAIKIA P., CHOWDHARY H. D. (1993) Phylloplane microflora for the control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Indian Phytopathol., 46: 218-223.
- SENGUPTA K., KUMAR P., BAIG M., GOVINDAIAH (1990) Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. United Nations Economic and Social Commission for Asia and Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 3-15.
- TEOTIA R. S., MANDAL S. K. (1993) Bacterial leaf blight disease of mulberry. Indian Silk, 32(6): 41-44.

EFFICACITE D'AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE ET DE PRODUITS A BASE DE PLANTES CONTRE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *MORI* ET *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *MORI* RESPONSABLES DE LA FLÉTRISSION BACTERIENNE CHEZ LE MURIER

M. F. BAQUAL, D. D. SHARMA, V. P. GUPTA & D. S. CHANDRASHEKAR

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

L'efficacité de différents agents de lutte biologique et de produits à base de plantes a été testée *in vitro* contre *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Psm) et *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (Xcm) responsables de la flétrissure bactérienne chez le mûrier. L'efficacité de ces agents de lutte biologique a été comparée à celles du fongicide chimique, le dithane M-45 à 0,2 % et d'un antibiotique agricole, la streptocycline à raison de 0,1 %. Sur les 12 agents de lutte biologique, on constate que *P. fluorescens* (PF-2) et *T. harzianum* (TH-1) sont les plus efficaces contre les deux pathogènes et sont des antagonistes puissants. Sur les cinq produits à base de plantes testés, le Neemgold (Azadirachtin 0,15% CE) donne la zone d'inhibition la plus élevée de 18,3 ; 23,2 et 28,3 mm contre Psm et de 9,0 ; 12,0 et 20,0 mm contre Xcm à des concentrations respectivement de 0,1 ; 0,2 et 0,3 %. Le degré d'antagonisme de ces produits à base de plantes est jugé modéré à fort. Cependant, l'efficacité des antibiotiques est significativement plus élevée que celles des agents de lutte biologique, des produits à base de plantes et des fongicides.

INTRODUCTION

La maladie de la flétrissure bactérienne causée par *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer & Lambert) Young, Dye & Wilkie et par *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson est devenue un problème majeur pour la culture du mûrier pendant la saison des pluies dans les pays tropicaux. Aujourd'hui, la maladie s'est propagée dans presque tous les états indiens pratiquant la sériculture et entraîne la dégradation des feuilles de mûrier sur le plan quantitatif et qualitatif (Teotia et Mandal, 1993 ; Maji et coll., 1996 ; Philip et coll., 1997). Bien que l'antibiotique agricole, la Streptocycline à 0,1 % et le fongicide chimique, le Dithane M-45 (Mancozeb 75 % WP) à 0,2 % aient été recommandés pour lutter contre la flétrissure bactérienne chez le mûrier (Sengupta et coll., 1990 ; Teotia et Mandal, 1993), leur utilisation pour lutter contre la maladie est coûteuse et les fongicides présentent des risques pour l'environnement. L'utilisation d'agents de lutte biologique et de produits à base de plantes pour lutter contre les maladies est donc l'une des alternatives aux produits chimiques. Plusieurs agents de lutte biologique et de produits à base de plantes, surtout les dérivés de margousier (*Melia azadirachta* L.) ayant des propriétés bactéricides ont été étudiés pour prévenir les maladies bactériennes chez de nombreuses cultures (Bora et coll., 1993 ; Saikia et Chowdhary, 1993 ; Arya et Parashar, 1997 ; Ahuja, 1997 ; Hulloli et coll., 1998). Cependant, on n'a pas essayé jusqu'à présent de lutter contre la flétrissure bactérienne du mûrier en utilisant des agents de lutte biologique et des produits à base de plantes. Compte tenu de cela, l'étude présente a été entreprise pour évaluer le potentiel de plusieurs agents de lutte biologique et de produits à base de plantes contre *P. syringae* pv. *mori* (Psm) et *X. Campestris* pv. *mori* (Xcm) responsables de la flétrissure bactérienne du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Plusieurs agents de lutte biologique et de produits à base de plantes ont été testés pour leur potentiel bactéricide contre *Psm* et *Xcm* et leur efficacité a été comparée à celles du fongicide (Dithane M-45) et de l'antibiotique recommandés (Streptocycline).

1. Efficacité des agents de lutte biologique :

Douze agents de lutte biologique comprenant des champignons et des bactéries tels que *Trichoderma harzianum* Rifai (isolats TH-1, TH-2 & TH-3), *T. viride* Pers. ex. Fr. Grey (isolats TV-1 & TV-2), *T. pseudokoningii* Rifai, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. (isolats BS-5a, BS-5b, BS-6 & BS-7) et *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula (isolats PF-1 et PF-2) ont été testés *in vitro* en employant différentes méthodes.

a. Méthode du disque en papier :

Les métabolites des agents de lutte biologique sont obtenus en faisant pousser les agents fongiques sur un bouillon de dextrose de pomme de terre (HiMedia Co., Inde) et les agents bactériens sur un milieu nutritif (HiMedia Co., Inde). Cinquante ml de dextrose de pomme de terre / milieu nutritif ont été mis dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml et stérilisés. Un tampon de 4 mm de diamètre de chaque agent biologique cultivé sur des plaques de dextrose de pomme de terre (PDA) / de milieu nutritif (NA) a été transféré de manière aseptique dans un milieu froid et incubé à $30 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 2 jours pour les agents de lutte biologique bactériens et pendant 10 jours pour les agents biologiques fongiques. Après l'incubation, les filtrats de culture ont été récoltés en séparant la biomasse par filtration sur un filtre papier Whatman No. 1. Des disques stériles de 4 mm de diamètre de filtre en papier Whatman No. 1 ont été plongés de manière aseptique dans des filtrats de culture des agents de lutte biologique pendant 5 heures. Pour une étude comparative, des solutions de Dithane M-45 et de Streptocycline aux concentrations recommandées de 0,2 et 0,1 %, respectivement ont été utilisées pour le traitement de disque de papier. Les suspensions des deux bactéries pathogènes (*Psm* et *Xcm*) ont été mélangées séparément avec un milieu nutritif stérilisé tiède et versées dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre. Les disques de papier traités sont placés au milieu des plaques avec trois répétitions pour chaque traitement. Des disques plongés dans de l'eau distillée stérilisée servent de témoin. Les plaques sont conservées en incubation pendant 2 jours à $30 \pm 2^\circ \text{C}$. Après l'incubation, la zone d'inhibition est mesurée et le degré d'antagonisme est évalué d'après les classements suivants.

I = Zone d'inhibition nulle	(Pas antagoniste)
II = Zone d'inhibition de 0 à 5 mm de diamètre	(Antagoniste faible)
III = Zone d'inhibition de 6 – 20 mm de diamètre	(Antagoniste modéré)
IV = Zone d'inhibition de 21 à 50 mm de diamètre	(Antagoniste puissant)
V = Zone d'inhibition de plus de 51 mm de diamètre	(Antagoniste très puissant)

b. Méthode du tampon agar :

Le milieu nutritif contaminé séparément avec des bactéries pathogènes, *Psm* et *Xcm* a été versé dans des boîtes Petri de 10 cm de diamètre. Des disques de 4 mm de diamètre découpés sur des colonies actives des agents de lutte biologique en croissance sur PDA/NA sont placés au centre des boîtes contaminées par *Psm* et *Xcm*. Les disques découpés sur le milieu contenant du Dithane M-45 à 0,2 % ou de la Streptocycline à 0,1 % sont aussi inoculés au centre des boîtes contaminées par *Psm* et *Xcm* à des fins comparatives. Des disques de milieu neutre sont utilisés comme témoin. Chaque traitement est répété trois fois. Toutes les plaques sont incubées pendant 2 jours à $30 \pm 2^\circ \text{C}$. La zone d'inhibition est mesurée et le degré d'antagonisme est évalué d'après le classement présenté plus haut.

2. Efficacité des produits à base de plantes :

Les produits à base de plantes surtout les produits à base de margousier comme l'Econeeem (azadirachtine 0,3 % CE), le Neemgold (azadirachtine 0,15 % CE), le Nimbicidine (azadirachtine 0,03 % CE), le Limbitor ou ZA-199 (azadirachtine 0,03 % CE) et l'Amrutguard (Azadirachtine 0,03 % CE) ont été testés à des concentrations de 0,1 ; 0,2 et 0,3 % contre *Psm* et *Xcm* avec la méthode du disque en papier. Les concentrations sont faites en ajoutant de l'eau stérilisée distillée au produit à base de margousier (V/V). Le Dithane M-45 et la streptocycline sont aussi utilisés à des concentrations similaires pour évaluer leur efficacité comparative. De l'eau distillée stérilisée est utilisée comme témoin. Trois répétitions sont maintenues pour chaque traitement. Les observations sur le degré d'antagonisme sont faites d'après la méthode décrite plus haut.

Les données sont analysées après les avoir soumises à une transformation de racine carrée par l'analyse de variance (ANOVA).

RESULTATS

1. Efficacité des agents de lutte biologique :

L'action antagoniste des agents de lutte biologique diffère, non seulement selon les espèces mais aussi selon les isolats de la même espèce. Tous les agents de lutte biologique montrent un degré d'antagonisme de fort à modéré contre une ou deux des bactéries pathogènes (Tableau I) sauf *T. viride* (TV-1). Aucun des agents de lutte biologique ne montre un antagonisme faible ou très fort contre l'une des bactéries pathogènes. Sur tous les agents biologiques testés, *P. fluorescens* (PF-2) et *T. harzianum* (TH-1) s'avèrent les plus efficaces contre les deux pathogènes. De manière significative, ils produisent une zone d'inhibition très claire et nette de 26 et 21 mm contre *Xcm* tandis que dans le cas de *Psm* elle est de 28 et 23 mm, respectivement. Ces deux antagonistes ont un degré d'antagonisme correspondant au rang IV, et se classent donc comme des antagonistes puissants.

2. Efficacité des produits à base de plantes :

Tous les produits à base de margousier ont un degré varié d'effet bactéricide contre les deux bactéries pathogènes. En général, l'effet antagoniste est lent à une concentration plus faible (0,1 %) mais augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en produits à base de plantes (Tableau II). Sur tous les produits à base de plantes, le Neemgold produit la zone d'inhibition la plus élevée de 18,3 ; 23,2 et 28,3 mm contre *Psm* et de 9,0 ; 12,0 et 20,0 mm contre *Xcm* à des concentrations de 0,1 ; 0,2 et 0,3 % respectivement. D'après le classement, son degré d'antagonisme est de modéré à puissant. Cependant, la Nimbicidine a l'effet antagoniste le moins élevé contre *Psm* tandis que l'Econeeem est le moins efficace contre *Xcm*. Aucun des produits à base de plante ne montre une activité antagoniste faible ou très élevée contre les deux bactéries.

En ce qui concerne l'efficacité comparative des agents de lutte biologique et des produits à base de plantes avec le fongicide et l'antibiotique recommandés, on constate que *P. fluorescens* (PF-2) et *T. harzianum* (TH-2) ont un degré d'antagonisme égal à celui du fongicide contre les deux bactéries. Cependant, l'efficacité des antibiotiques est significativement plus élevée que celle des agents de lutte biologique, et des produits à base de plantes et du fongicide.

DISCUSSION

Dans l'étude actuelle, on constate que parmi les agents de lutte biologique bactériens et fongiques, *P. fluorescens* (PF-2) et *T. harzianum* (TH-1) sont les plus efficaces pour inhiber la croissance des bactéries testées (*Psm* et *Xcm*). De plus, les deux méthodes utilisées pour cribler les agents biologiques

c'est à dire le tampon agar et le disque en papier sont aussi efficaces l'une que l'autre. L'inhibition de la croissance bactérienne par les deux agents de lutte biologique c'est à dire par *P. fluorescens* (PF-2) et *T. harzianum* (TH-1) peut être due à la production de substances / métabolites toxiques. Il s'avère que *P. fluorescens* produit des antibiotiques du type de la phénazine et du sidérophore qui jouent un rôle majeur pour supprimer la croissance des divers pathogènes (Kloeper et coll., 1980 ; Loper 1988). De même, les espèces de *Trichoderma* produisent aussi des métabolites actives telles que les enzymes lytiques, les chitinases, les gluconases, les acides monobasiques et le trichodermin qui tuent de nombreux champignons et bactéries pathogènes (Chet, 1987 ; Anonyme 1988). Plusieurs chercheurs ont observé que l'on pouvait lutter contre les maladies de la rouille bactérienne et de la flétrissure en utilisant certaines souches de *P. fluorescens* (Arya et Parashar, 1997 ; Aino et coll., 1998). De plus de nombreux chercheurs ont signalé l'efficacité des microbes du phylloplane y compris de *T. harzianum* contre plusieurs maladies bactériennes dans des conditions *in vitro* et *in vivo* (Bora et coll., 1993 ; Saikia et Chowdhary, 1993).

Dans l'étude actuelle, l'antagoniste bactérien *P. fluorescens* (PF-2) est supérieur à l'antagoniste fongique *T. harzianum* (TH-1) pour inhiber la croissance de *Psm* et *Xcm*. Des observations similaires ont aussi été faites par Kim et coll., (1990) et Jubina et Girija (1998) qui ont montré que l'antagoniste bactérien (*P. fluorescens*) est supérieur à l'antagoniste fongique (*T. harzianum*) pour supprimer la croissance de *Phytophthora capsici* responsable de la flétrissure du poivron rouge et du pourrissement du pied du poivron noir.

Il est intéressant de noter que les formulations de margousier et surtout de l'Econeem à des concentrations plus élevées d'azadirachtine (0,3 % CE) ne sont pas aussi efficaces que le Neemgold qui contient de l'azadirachtine à 0,15 % de CE. Cela indique que l'azadirachtine n'est pas le seul composant actif et que d'autres composants jouent aussi un rôle significatif dans l'inhibition de la croissance bactérienne. On suppose donc que la baisse plus importante de la croissance des bactéries avec le Neemgold est due à l'action bactéricide de l'azadirachtine et d'autres composants, comme les esters d'acides gras glycériques (18 % p/p) et les esters d'acides gras éthoxylés (35 % p/p) qui sont présents dans le Neemgold mais ne sont pas présents dans l'Econeem. Les produits à base de margousier sont connus pour leur action bactéricide contre plusieurs bactéries pathogènes des plantes dans des conditions *in vitro* et *in vivo* (Ahuja, 1997 ; Hulloli et coll., 1998).

L'étude présente semble être le premier rapport sur l'évaluation de divers agents de lutte biologique et de produits à base de plantes pour lutter contre la maladie bactérienne chez le mûrier. Les résultats tirés de l'étude semblent être utiles pour lutter contre les maladies bactériennes du mûrier avec des méthodes qui ne nuisent pas à l'environnement.

MAXIMIZATION OF LEAF YIELD OF MULBERRY *MORUS ALBA* (L.) AND ECONOMIC RETURNS PER UNIT AREA OF LAND FROM SERICULTURE THROUGH MULCHING

S. K. GANGWAR¹, P. S. SINHA², B. D. SINGH*, RAM NAGINA, J. JAYASWAL³ & U. P. GRIYAGHEY⁴

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Ministry of Textile, Govt. Of India, Vinod Villa West End Park, P. O. Hehal, Ranchi-5, Bihar, India.

1. C.S.R. & T.I, Berhampore, Dist. Murshidabad, West Bengal, India.
2. Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, India.
3. N. S.S.P., Central Silk Board, Bangalore, India.
4. Retired as Joint Director, C.T. R. & T.I., Nagri, Ranchi, India.

The study covers modulations of growth, leaf yield, moisture content of leaf and soil under influence of some organic mulches applied directly in the field, or by growing some intercrop and mulching the biomass produced there itself to serve as surface mulch. With this practice, a substantial boost in leaf yield and economic returns was observed at a very little input cost, thus promising a boost to sericulture industry of rainfed areas like South Bihar.

Keywords: Mulching, average plant height, branching, leaf yield, leaf moisture contents, soil moisture, economics of mulching.

INTRODUCTION

In rainfed areas production from agriculture is very low, due to poor soil moisture content and mulberry sericulture is no exception. Economic returns from sericulture are also not that attractive as these could have been because of the poor leaf yield of mulberry per unit area of land due to very poor moisture available in soil during pre-monsoon and post-monsoon period. An effective water harvest and more importantly, its better conservation in mulberry field is the need of the hour for boosting the sericulture industry of rainfed areas like south Bihar. Mulching has been successful for soil moisture conservation in various crops e. g. in strawberry (Costellanos and Leal, 1970), in mulberry (Purohit, 1990; Choudhary *et al.* 1990 and Das *et al.*, 1990), tea (Field, 1970), in apples (Srivastava, 1964) in mustard (Mondal *et al.*, 1987) in wheat (Mittal *et al.*, 1986) and in sorghum (De *et al.*, 1983). Dzhenchradze and Ozhabridze (1985) have given a detailed account of mulching on the development of aerial part and root system of mandarin tree. Baxter (1970) detailed how mulching helps young fruit trees.

The present study was carried out with an objective of maximising the leaf yield of mulberry and thereby the income from sericulture by effective conservation of soil moisture through mulching using organic mulches. Mulching with artificial material like polyethylene etc., while on one side appears cumbersome, expensive and non ecofriendly is also known to increase the soil temperature (Purohit

* Author for correspondence

et al., 1990). In the present study biodegradable materials, which not only serve as mulching material but also add to soil fertility, were used.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the mulberry farm of chawki rearing centre Khunti, of Regional Sericultural Research Station, Ranchi, with the existing plantation of same age of two mulberry varieties i.e. S1 and K2. Mulberry plantation of both varieties were plotted as per layout. The experimental design was RBD. After bottom pruning of mulberry plantation in June (As per the package of practices of this area), after the onset of the monsoon, the following treatments were set in mulberry plantation.

T1 = Blackgram (*Vigna mungo*) was sown as intercrop with the onset of the monsoon and the biomass produced due to the growth of this inter crop was mulched there itself soon after the withdrawal of the monsoon i.e. in October last.

T2 = Sorghum (*Sorghum vulgare*) was sown as intercrop with the onset of the monsoon and the biomass produced due to the growth of this intercrop was mulched there itself soon after the withdrawal of the monsoon i.e. in October last.

T3 = Mulching with 5-6 cm layer of paddy straw soon after the withdrawal of the monsoon.

T0 = Control i.e. no mulching at all.

The study continued for about three years and during the period mulching was carried out two times in the same manner. The growth and leaf yield data were recorded during March, August and October coinciding with the rearing schedule of silkworm in this area with an additional growth and leaf yield data recorded during May i.e. one of the driest and the hottest months. Moisture content of leaf and soil were also recorded by the gravimetric method using 100 g sample.

RESULTS AND DISCUSSION

The growth and leaf yield data, moisture content of leaf and soil are presented in Table I to IV. As evident from the data, mulching has favourably affected the growth and leaf yield in both the mulberry varieties.

1) Average plant height : (Table I – 2nd column)

Average plant height recorded a significant rise with all the three types of mulching in both the varieties, with the sole exception of blackgram mulching in S1. There was no significant difference in plant height between sorghum and paddy straw mulching however the values were significantly higher than the plant height of black gram mulching. Increase in plant height is in conformity with the findings of Purohit *et al.*, (1990).

2) Branching : (Table I – 3rd column)

Mulching could not affect branching i.e. number of effective branches, except in case of paddy straw mulching in K2 variety.

Table I. Growth, leaf yield and moisture content of two mulberry varieties as affected by mulching.

Tableau I. Effets du paillage sur la croissance, le rendement en feuilles et la teneur en humidité chez deux variétés de mûrier.

Treatment	Variety	Plant Height (cm)	No. of branches (no.)	No. of leaves (no.)	Av. leaf area (sq. cm)	Leaf weight (g/plant/ 4 harvests)	Moisture contents (%)
<i>Traitement</i>	<i>Variété</i>	<i>Hauteur de la plante (cm)</i>	<i>Nbre de branches (Nbre)</i>	<i>Nbre de feuilles (Nbre)</i>	<i>Surface moyenne de la feuille (cm²)</i>	<i>Poids de la feuille (g/plante/ 4 récoltes)</i>	<i>Teneur en humidité (%)</i>
T0	S1	160.03	17.40	265.20	79.20	996.27	70.21
T1		159.60	16.97	291.47	73.83	1121.20	71.00
T2		181.53	18.10	322.03	75.87	1253.47	70.60
T3		175.67	18.03	365.67	78.90	1353.03	72.10
CD at 5%		9.58	NS	13.26	NS	84.63	0.84
T0	K2	135.83	12.53	191.43	82.93	643.33	69.90
T1		145.57	13.00	228.87	84.43	896.06	71.90
T2		157.00	12.63	243.37	81.97	917.27	71.80
T3		153.07	14.17	277.40	88.93	1042.20	72.80
C. D. at 5%		8.98	0.70	17.73	NS	36.71	0.69

T1 = Black gram mulching / *Paillage avec du pois chiche noir*. **T2** = Sorghum mulching / *Paillage avec du sorgho*. **T3** = Paddy straw mulching / *Paille de riz*. **T0** = Control / *Témoin*.

3) Leaf initiation : (Table I - 4th Column)

The number of leaves per plant significantly increased by all the three types of mulching, over control, in both the varieties. A highest leaf initiation was noticed with paddy straw mulching followed by sorghum and black gram mulching in both the varieties.

4) Leaf yield : (Table I—6th column and Table III)

Maximum enhancement in leaf yield was recorded with paddy straw mulching, followed by sorghum and least enhancement was recorded with blackgram mulching over control in both the varieties. Black gram mulching increased the leaf yield by 23.08%, sorghum mulching by 32.4% and paddy straw mulching caused an enhancement to the tune of 46.1%.

Table II. Individual leaf weight (g) of two mulberry varieties as affected by mulching.*Tableau II. Effet du paillage sur le poids individuel de la feuille (g) chez deux variétés de mûrier.*

Treatment / <i>Traitement</i>	Variety / <i>Variété</i>		Average / <i>Moyenne</i>
	S1	K2	
T0	0.93	0.84	0.88
T1	0.96	0.98	0.97
T2	0.97	0.94	0.95
T3	0.93	0.94	0.94
CD at 5%	0.02	0.03	0.02

T1 = Black gram mulching / *Paillage de pois chiche noir*. T2 = Sorghum mulching / *Paillage de sorgho*. T3 = Paddy straw mulching / *Paille de riz*. T0 = Control / *Témoin*.

Table III. Leaf yield as affected by mulching.*Tableau III. Effet du paillage sur le rendement en feuilles.*

Treatment	Leaf yield t / ha/4 harvests		Average of two varieties	Percent increase over control
	S1	K2		
<i>Traitement</i>	<i>Rendement en feuilles t / ha / 4 récoltes</i>		<i>Moyenne des deux variétés</i>	<i>Augmentation en pourcentage par rapport au témoin</i>
	S1	K2		
T1	13.30	10.67	12.01	23.08
T2	14.91	10.91	12.96	32.40
T3	16.10	12.40	14.25	46.10
T0	11.85	7.65	9.75	
CD at 5%	1.01	0.44	0.98	

T1 = Black gram mulching / *Paillage de pois chiche noir*. T2 = Sorghum mulching / *Paillage de sorgho*. T3 = Paddy straw mulching / *Paille de riz*. T0 = Control / *Témoin*.

Table IV. Average soil moisture (%) under various mulches.*Tableau IV. Humidité moyenne du sol (%) avec divers types de paillage.*

Treatment	Months					
	October	November	December	January	February	March
<i>Traitement</i>	<i>Mois</i>					
	<i>octobre</i>	<i>novembre</i>	<i>décembre</i>	<i>janvier</i>	<i>février</i>	<i>mars</i>
T0	24.60	21.90	19.50	19.50	20.30	19.30
T1	24.60	22.90	20.80	20.90	21.80	19.80
T2	24.70	23.70	20.90	21.40	22.40	20.40
T3	25.90	26.60	21.60	22.40	23.70	24.70
CD at 5%	NS	0.58	0.90	0.62	1.01	0.71

T1 = Black gram mulching / *Paillage de pois chiche noir*. **T2** = Sorghum mulching / *Paillage de sorgho*. **T3** = Paddy straw mulching / *Paille de riz*. **T0** = Control / *Témoin*.

5) Leaf moisture content: (Table I – 7th column)

As evident from data, leaf moisture content was significantly higher in most of the cases where mulching was practised compared to control.

6) Soil moisture: (Table IV)

As evident from table, soil moisture at 9" depth was observed to be higher with mulching in the majority of the cases than control, which suggests that mulches are effective in containing the soil moisture to a great extent and paddy straw appears to be more effective in conserving the soil moisture.

The favourable influence of mulching on the growth attributes and leaf yield appears to be primarily due to the increase in soil moisture. Paddy straw proved most effective in containing the soil moisture followed by sorghum and black gram. The growth and leaf yield appear to be a direct reflection of the soil moisture status as maximum growth and leaf yield were also found to be with paddy straw followed by sorghum and black gram mulching. The increase in soil moisture through conservation of the soil moisture by mulching and thereby increase in growth and leaf yield is in conformity with the findings of De *et al.*, (1983), Mittal *et al.*, (1986), Mondal *et al.*, (1987), Purohit *et al.*, (1990), Srivastava *et al.*, (1964), Field (1970) and Das *et al.*, (1990). The weed growth is greatly checked by mulching apparently due to curtailment of light resulting in immediate yellowing and death of existing weeds, if any, and checking further growth of the weeds. Reduction in weed population by mulching was observed by Das *et al.*, (1990) and Kasivisvanathan *et al.*, (1971). Reduced weed population may have a direct bearing on growth and leaf yield of mulberry.

It was expected that blackgram mulching should give better leaf yield due to adding to the soil fertility (being leguminous) besides serving as mulch, but as seen here, it proved least effective. It may be attributed to the qualitative efficacy of material as mulch, as plantation was given normal fertiliser doses so fertility was not the limiting factor. Black gram leaves are less fibrous compared to

sorghum and paddy. Fibrous nature of leaves appears to have made these materials more suitable mulch as these deform and decay at a slower pace. Paddy straw mulch has been found to be better mulch and more paying by Purohit *et al.*, (1990). Kundu *et al.*, (1992) also observed better leaf yield with straw mulches.

Thus it appears that mulch induces plant growth by not only increasing the soil moisture through reduced soil moisture depletion, but also by reducing weed growth and by adding to the soil fertility by slow decomposition of the mulches.

Increase in leaf yield appears to be mainly controlled by the increase in plant height (Table I – 2nd column), the number of leaves and the individual leaf weight, which in general, was enhanced by mulching (Table II) and expansion of leaf as measured on basis of average leaf area, does not appear to contribute to leaf yield as it is not affected (Table I – 5th column).

Table V. Economics of mulching.

Tableau V. Aspect économique du paillage.

Treatment	Cost of mulching (Rs)*	Leaf yield (t/ha/4 Harvests)	Additional leaf produced over control (t)	Cost of addit. leaf produced (Rs/kg)	Addit. Income by utilizing this leaf in rearing (Rs/ha/yr)
<i>Traitement</i>	<i>Coût du paillage (Rs)*</i>	<i>Rendement en feuilles (t/ha/4 récoltes)</i>	<i>Feuilles supplémentaires produites par rapport au témoin (t)</i>	<i>Coût des feuilles supplémentaires produites (Rs / kg)</i>	<i>Revenu supplémentaire en utilisant ces feuilles dans l'élevage (Rs / ha / année)</i>
T1	490.00	12.01	2.26	0.21	3897.50
T2	450.00	12.92	3.17	0.14	5692.50
T3	1250.00	14.25	4.50	0.27	7427.50

T1 = Black gram mulching / *Pois chiche noir*. **T2** = Sorghum mulching / *Paillage au sorgho*. **T3** = Paddy straw mulching / *Paille de riz*.

* Approximately RS 40 to 42 are equivalent to 1 US \$ / 40 à 42 RS équivalent approximativement à 1 US\$.

Table V depicts economics of mulching. It is seen that cost of per kg additional leaf produced is minimum i.e. Rs 0.14 (1 US \$ = Rs 40-42, approx.) per kg with sorghum and highest with paddy straw mulching i.e. Rs 0.27, however, taking into account the economic returns by utilising these additional leaves produced by mulching over control, in silkworm rearing, paddy straw mulching gives maximum increase in income i.e. Rs 7427.5/ha so paddy straw mulching without any doubt is a boon for mulberry sericulture. As seen from table, sorghum mulching can also be adopted if paddy straw is not intended to be used or not available which gives additional leaves at cheapest rate i.e. Rs 0.14 per kg with a quite handsome additional income of Rs 5692.50/ha/yr.

REFERENCES

- BAXTER P. (1970) How mulches help young fruit trees. *Vic Horticulture Dig.* 14:12-15.
- COSTELLANOS H. & LEAL F. (1970) A mulching trial with strawberries. *Agronomy Tropical Mooracy* 20: 125-130.
- CHOUDHURY P. C., DAS P. K., GHOSH A. & SENGUPTA K. (1990) The boon of green manuring and dry weed mulching in rainfed mulberry. *Indian Silk* 28(1): 39-41.
- DAS P. K., CHOUDHARY P. C., GHOSH A., MALLIKARJUNA B., SURYANARYANA N. & SENGUPTA K. (1990) Effect of green manuring, dry weed and black polythene mulching on soil moisture conservation growth and yield of mulberry and their economics under rainfed conditions. *Indian J. Seric.* 29(2): 263-272.
- DE R., BHEEMIAH G., RAMESHIAH K. & RAO Y. Y. (1983) Effect of mulches and anti transpirants on the grain yield of sorghum grown under limited irrigation on a deep vertisol. *J. Agric. Sci.* 100(1): 159-162.
- DZHINCH ORADZE G. D. & DZHABRIDZE R. K. (1985) Effect of different kinds of mulches on the development of aerial part and root system of mandarian trees. *Subtropichessikie. Kultury* 6:95-105.
- FIELD A. G. W. (1970) The use of mulches in tea. *Tea* 11:17, 19 21-32.
- KASIVISWANATHAN K., IYENDER M. N. S. & KRISNASWAMY S. (1971) Effect of black polythene mulch on soil temperature, soil moisture, weed density and yield of mulberry leaf under dry farming conditions in Mysore state. *Indian J. Seric.* 10(1):90-95.
- KUNDU C., MONDAL B. B., JANA P. K., SINHA A. C. (1992) Effect of irrigation and evapotranspiration control measures on growth and leaf yield of mulberry under Terai regions of Eastern India. *Nat. Conf. On Mul. Seric. Res.* Dec 10-11 1992, CSR & TI, Mysore
- MITTAL S. P., SINGH P., SINGH K & SINGH P. (1986) Effect of mulching on yield of rainfed wheat (*Triticum aestivum*) at Siwalik foot hills, India. *Indian J. Agric. Sci.* 56(4) : 277-281.
- MONDAL B. D., CHOWDHURY B., SOUNDA G., MONDAL B. K. & SINHA A. C. (1987) Effect of mulches on growth and yield of late sown unirrigated mustard. *Indian Agric.* 31(4) : 279-284.
- OTHIENO C. O. & AHN P. M. (1980) Effect of mulches on soil temperature and growth of tea plants in Kenya. *Exp. Agric.* 16(3) : 287-294.
- PUROHIT K. M., RAY D. & SUBBA RAO G. (1990) Effect of mulches on soil temperature, soil moisture growth and leaf yield of mulberry during winter under rainfed conditions in West Bengal. *Indian. J. Seric.* 29(1): 64-71.
- SRIVASTAVA R. P. (1964) Mulberry induces better fruiting in apples. *Ind. Hort.* 9: 27-28.

MAXIMALISATION DU RENDEMENT EN FEUILLES ET DES REVENUS PAR UNITE DE SURFACE DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) GRACE AU PAILLAGE

S. K. GANGWAR¹, P. S. SINHA², B. D. SINGH*, RAM NAGINA, J. JAYASWAL³ & U. P. GRIYAGHEY⁴

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Ministry of Textile, Govt. Of India, Vinod Villa West End Park P. O. Hehal, Ranchi-5, Bihar, Inde.

1. C.S.R. & T I Berhampore, Dist. Murshidabad, West Bengal.
2. Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi.
3. N.S.S.P., Central Silk Board, Bangalore
4. Directeur adjoint à la retraite, C.T.R. & T.I., Nagri, Ranchi.

Cette étude se penche sur les changements obtenus en matière de croissance, de rendement en feuilles, de teneur en humidité de la feuille et du sol sous l'influence de paillages organiques appliqués directement sur le terrain ou de cultures alternées dont la biomasse est utilisée pour servir de paillage en surface. On constate que cette pratique augmente le rendement en feuilles et les revenus de manière substantielle à un coût d'intrants très minime, ce qui permet d'envisager une poussée de l'industrie séricicole dans les zones non irriguées du sud Bihar.

INTRODUCTION

Dans les zones non irriguées, la production agricole est très faible à cause de la faible humidité du sol et la sériciculture mûrier ne fait pas exception. Les revenus économiques de la sériciculture ne sont pas aussi intéressants qu'ils pourraient l'être à cause du mauvais rendement en feuilles de mûrier par unité de surface de terrain, due à la très faible humidité présente dans le sol avant la mousson et après la mousson. A l'heure actuelle, une collecte de l'eau efficace et encore plus sa conservation dans les mûraies des zones de mousson comme le sud du Bihar sont nécessaires pour améliorer l'industrie séricicole. Le paillage réussit à conserver l'humidité du sol chez plusieurs cultures comme la fraise (Costellanos et Leal, 1970), le mûrier (Purohit, 1990 ; Choudhary et coll., 1990 et Das et coll., 1990), le thé (Field, 1970), les pommes (Srivastava, 1964), la moutarde (Mondal et coll., 1987), le blé (Mittal et coll., 1986) et le sorgho (De et coll., 1983). Dzhincharadze et Ozhabridze (1985) ont présenté un rapport détaillé sur le paillage et sur son effet sur le développement des parties aériennes et du système racinaire du mandarinier. Baxter (1970) a expliqué comment le paillage aide les jeunes arbres fruitiers.

L'étude présente a été réalisée dans le but de maximaliser le rendement en feuilles de mûrier et donc le revenu séricicole par la conservation réussie de l'humidité dans le sol grâce à des paillages organiques. Le paillage avec du matériel artificiel comme le polyéthylène apparaît d'une part encombrant, cher et défavorable à l'environnement et d'autre part, on sait qu'il augmente la

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

température du sol (Purohit et coll., 1990). Dans cette étude, des matériaux biodégradables ont été utilisés qui non seulement servent de matériel de paillage mais accroissent aussi la fertilité du sol.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée dans la mûraie du centre d'élevage des jeunes vers à soie, de la Station Régionale de Recherche Séricicole de Ranchi, avec une plantation existante comprenant deux variétés de mûrier S1 et K2 du même âge. Les deux variétés ont été disposées en suivant le plan de la mûraie. La disposition expérimentale est en blocs aléatoires. Après une taille basse de la mûraie en juin (d'après les pratiques en cours dans la zone) après le début de la mousson, les traitements suivants ont été appliqués dans la mûraie.

T1 = Le pois chiche noir (*Vigna mungo*) a été planté comme culture alternée au début de la mousson et la biomasse produite grâce à la croissance de cette culture alternée a été utilisée comme paillage peu après la fin de la mousson, c'est à dire fin octobre.

T2 = Le sorgho (*Sorghum vulgare*) a été planté comme culture alternée au début de la mousson et la biomasse produite grâce à la croissance de cette culture alternée a été utilisée comme paillage peu après la fin de la mousson, c'est à dire fin octobre.

T3 = Le paillage avec une couche de 5 à 6 cm de paille de riz peu après la fin de la mousson.

T0 = Témoin, c'est à dire aucun paillage.

L'étude a duré pendant environ trois ans et pendant cette période, on a eu recours à deux paillages de la même manière. Les données sur la croissance et le rendement en feuilles sont enregistrées en mars, août, et octobre, ce qui coïncide avec le calendrier d'élevage des vers à soie dans cette zone. Les données sur la croissance et le rendement en feuilles sont aussi enregistrées en mai, c'est à dire pendant l'un des mois les plus secs et les plus chauds. La teneur en humidité de la feuille et du sol a été déterminée par la méthode gravimétrique en utilisant 100 g d'échantillon.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur la croissance et le rendement en feuilles, la teneur en humidité de la feuille et du sol sont présentées dans les Tableaux I à IV. Comme le prouvent les données, le paillage a un effet favorable sur la croissance et le rendement en feuilles chez les deux variétés de mûrier.

1) Hauteur moyenne du plant : (Tableau I – 2^{ème} colonne)

La hauteur moyenne du plant augmente de manière importante avec les trois types de paillage chez les deux variétés, à l'exception du paillage de pois chiche noir pour S. Il n'y a pas de différence importante de hauteur des plants entre le paillage de sorgho et la paille de riz, cependant les valeurs sont significativement plus élevées que celles obtenues avec le paillage de pois chiche noir. L'augmentation de la taille du plant confirme les observations de Purohit et coll., (1990).

2) Ramification : (Tableau I – 3^{ème} colonne)

Le paillage n'a pas d'effet sur la ramification, c'est à dire sur le nombre effectif de branches, sauf dans le cas de la paille de riz avec la variété K2.

3) Formation de feuilles : (Tableau I – 4^{ème} colonne)

Le nombre de feuilles par plant augmente de manière importante avec les trois types de paillage chez les deux variétés par rapport au témoin. On note une formation de feuilles plus importante avec la paille de riz, suivie par le paillage de sorgho et de pois chiche noir chez les deux variétés.

4) Rendement en feuilles : (Tableau I – 6^{ème} colonne et Tableau III)

On enregistre une amélioration maximum du rendement en feuilles avec la paille de riz, suivie par le sorgho et une amélioration minimum avec le paillage de pois chiche noir chez les deux variétés par rapport au témoin. Le paillage de pois chiche noir augmente le rendement en feuilles de 23,08 %, le paillage de sorgho de 32,4 % et la paille de riz de 46,1 %.

5) Teneur en humidité de la feuille : (Tableau I – 7^{ème} colonne)

Comme le montrent les données, la teneur en humidité de la feuille augmente de manière importante dans la plupart des cas où l'on a recours au paillage par rapport au témoin.

6) Humidité du sol : (Tableau IV)

Comme le montre le tableau, on observe que l'humidité du sol à 22 cm de profondeur est plus élevée avec le paillage que chez le témoin dans la plupart des cas, ce qui suggère que le paillage est efficace pour retenir l'humidité du sol à un degré élevé et la paille de riz apparaît la plus efficace pour conserver l'humidité du sol.

L'influence favorable du paillage sur les attributs de croissance et le rendement en feuilles semble être principalement due à l'augmentation de l'humidité du sol. La paille de riz s'avère très efficace pour retenir l'humidité du sol, suivie par le sorgho et le pois chiche noir. La croissance et le rendement en feuilles semblent être un reflet direct de l'état d'humidité du sol puisque l'on observe une croissance et un rendement en feuilles maximums avec la paille de riz, suivie par le paillage de sorgho et de pois chiche noir. Le paillage permet d'augmenter l'humidité du sol en la conservant et il permet donc l'augmentation de la croissance et du rendement en feuilles comme l'ont observé De et coll., (1983), Mittal et coll., (1986), Mondal et coll., (1987), Purohit et coll., (1990), Srivastava et coll., (1964), Field (1970) et Das et coll., (1990). Le paillage empêche fortement la croissance des mauvaises herbes apparemment à cause de la baisse de la lumière qui fait immédiatement jaunir et mourir les mauvaises herbes existantes, s'il y en a, et empêche toute croissance supplémentaire des mauvaises herbes. La diminution des mauvaises herbes pourrait avoir un effet direct sur la croissance et le rendement en feuilles de mûrier.

On pouvait s'attendre à ce que le paillage de pois chiche noir donne un meilleur rendement en feuilles en accroissant la fertilité du sol (car c'est une légumineuse), mais comme on le voit ici, il s'avère le moins efficace. Cela pourrait être dû à l'efficacité qualitative du matériel de paillage, puisque la plantation a reçu des doses d'engrais normales pour que la fertilité ne soit pas le facteur limitant. Les feuilles de pois chiche noir sont moins fibreuses comparées au sorgho et à la paille de riz. La nature fibreuse des feuilles semble rendre le paillage avec ces matériaux plus adapté car ils se décomposent et pourrissent plus lentement. Purohit et coll., (1990) ont observé que la paille de riz est l'un des meilleurs paillages et qu'elle est plus profitable. Kundu et coll., (1992) ont aussi observé un meilleur rendement en feuilles avec un paillage de fraisiers.

Il semble ainsi que le paillage entraîne la croissance du plant non seulement en augmentant l'humidité du sol grâce à la diminution de l'évaporation de l'eau, mais aussi en restreignant la croissance des mauvaises herbes et en augmentant la fertilité du sol parce que les paillages se décomposent lentement.

L'augmentation du rendement en feuilles semble être principalement contrôlée par l'augmentation de la taille du plant (Tableau I – 2^{ème} colonne), le nombre de feuilles et le poids individuel de la feuille qui en général est amélioré par le paillage (Tableau II). Le développement de

la feuille mesuré sur la base de la surface foliaire ne semble pas contribuer à l'augmentation du rendement en feuilles car il ne varie pas (Tableau I – 5^{ème} colonne).

Le Tableau V présente l'aspect économique du paillage. On voit que le coût du kilo de feuilles supplémentaires produit est minime c'est à dire 0,14 Rs par kg (1 US \$ = 40 à 42 Rs, approximativement) avec le sorgho, il est plus élevé avec la paille de riz soit 0,27 Rs, cependant si l'on prend en compte les revenus apportés par l'utilisation des feuilles supplémentaires obtenues grâce au paillage, la paille de riz donne l'augmentation de revenus la plus importante soit 7427,5 Rs/ha. La paille de riz est donc sans aucun doute très favorable à la sériciculture mûrier. Comme on peut le voir dans le tableau, le paillage de sorgho peut aussi être adopté si on n'a pas l'intention d'utiliser de la paille de riz ou si elle n'est pas disponible, il donne des feuilles supplémentaires à un coût plus faible de 0,14 Rs par kg avec un revenu supplémentaire tout à fait honorable de 5692,50 Rs. ha/année.

GERMINATION AND SEEDLING GROWTH IN *MACHILUS BOMBYCINA* KING. MORPHOTYPES

A. SRIVASTAVA, K. SINGH, P. K. DAS*, A. A. SIDDIQUI* & S. S. RAGHUVANSHI

In Vitro Culture and Plant Genetics Unit, Department of Botany, University of Lucknow,
Lucknow – 226 007, India.

Machilus bombycina King. is the chief host plant of the muga silkworm *Antheraea assama* and in India it is only distributed in Assam, Meghalaya, Manipur and North Bengal. Eight morphotypes of this species have been identified on the basis of leaf morphology. The seeds of this tree have a hard, brown, almost impermeable covering and germinate only when scarified or subjected to rotting. Under the present investigation, a comparative study of germination and seedling establishment has been made for the eight morphotypes, the seeds being obtained from the Regional Muga Research Station, Boko, Assam. Significant differences were obtained between the morphotypes : S₂ showing maximum germination while S₂ and S₇ gave the maximum shoot length and S₆ gave the maximum root length after 21 days sowing.

Keywords: Som, scarification, germination, growth rate, variance, morphotypes.

INTRODUCTION

Plants have been under keen observation of man from immemorial times for their multiple uses. With the growing population and modernisation, the ever-increasing role of plants in human life has placed before us many fold tasks of understanding intimately the world of the plants and their relationship with human beings. Trees are a vital component of our economy and environment, with their uses being many and varied.

Sericulture is an ancient industry in India dating at least to the second century B.C. India has the unique distinction of being the only country in the world bestowed by nature with all four varieties of silk namely, mulberry, tasar, eri and muga.

Muga is obtained from the silkworm *Antheraea assama*. The caterpillars of this silkworm feed on the aromatic leaves of plants of Som (*Machilus bombycina* King) and Soalu (*Litsaea polyantha*), both members of the Lauraceae family. *Machilus bombycina* (King), the main host plant of the muga silkworm, is a medium sized tree with spreading branches and thick leaves. This muga host plant is distributed from India to Japan and Philippines and within India they are distributed in Assam, Meghalaya, Manipur and North Bengal. Eight morphotypes of *Machilus bombycina* have been reported by Raja Ram *et al.*, (1993) ; identified on the basis of leaf morphology and floral biology. Due to its significance in muga worm culture Som is also cultivated. There are several reports on the vegetative propagation of *Machilus bombycina* through stem cutting and air layering (Chowdhary, 1965; Isa & Sinha, 1980; Suryanarayana *et al.*, 1985).

However, these methods have their own disadvantages. Through air layering, it is not possible to obtain plants at commercial level because the technique is comparatively costly and requires special

* RMRS, Boko, Assam.

skills. Multiplication of Som is done on mass scale by cuttings, which ensures true to type multiplication. This method, however, shows a variable survival rate every year and also restricts the expression of natural variability, which is possible, only when populations are raised from seeds. The germination of seeds of *Machilus* has since long posed a major problem to muga plant workers. The seeds are covered with a hard and thick seed coat which checks the imbibition of water thereby, inhibiting germination. Srivastava *et al.*, (1998) have reported that partial scarification of seeds by mechanical methods helps in overcoming the otherwise inherent germination problem. Since seed germination and seedling establishment are important parameters for variety/morphotype differentiation, efforts were made to compare the same in the seeds of the eight known morphotypes of *Machilus bombycina*, obtained from RMRS, Boko.

MATERIAL AND METHOD

Seeds of the eight morphotypes of *Machilus bombycina* King. were obtained from Regional Muga Research Station, Boko, Assam. These seeds are small, round, brownish-black in colour with a hard covering. Our earlier studies based on different pretreatments revealed mechanical scarification to be the best method for maximum germination, especially when seeds were germinated on moistened filter paper. Initiation of germination took place six days after sowing and initial data were recorded then, followed by regular observations up to 3 weeks. The data were subjected to statistical analysis for calculating the actual mean and standard error and also, variance for testing the significance of difference amongst the 8 morphotypes.

RESULTS AND DISCUSSION

Maximum seed germination was observed for S₂, S₆, S₄ and S₈ showed over 70% germination while S₁ and S₃ along with S₅ showed less than 50% germination (Table I, Fig. 1). Analysis of variance revealed that the difference amongst the morphotypes with regard to germination was significant.

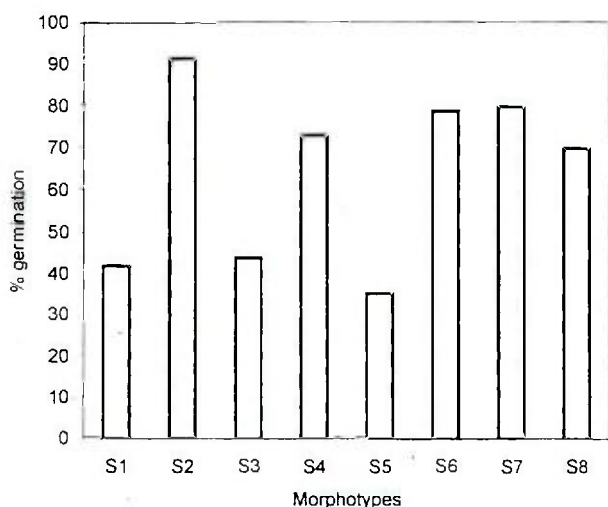


Fig 1. Germination percentage of *Machilus* morphotypes.

Fig. 1. Pourcentage de germination des génotypes de *Machilus*.

Table I. Average means $\pm$ SE values of percentage germination, shoot and root lengths (cms) of 8 morphotypes of *Machilus bombycina* (King).

Tableau I. Valeurs moyennes $\pm$ écart type du pourcentage de germination et de la longueur des pousses et des racines (cm) chez 8 morphotypes de Machilus bombycina (King).

Morphotype	Percentage Germination	Shoot length (15 days)	Shoot length (21 days)	Root length (15 days)	Root length (21 days)
	<i>Pourcentage de germination</i>	<i>Longueur d'une pousse (15 jours)</i>	<i>Longueur d'une pousse (21 jours)</i>	<i>Longueur d'une racine (15 jours)</i>	<i>Longueur d'une racine (21 jours)</i>
S1	42	1.36 $\pm$ 0.3462	2.73 $\pm$ 0.1721	1.40 $\pm$ 0.1121	2.16 $\pm$ 0.1422
S2	91.06	2.46 $\pm$ 0.7242	7.53 $\pm$ 1.1242	2.46 $\pm$ 0.4521	4.96 $\pm$ 1.0032
S3	44	1.10 $\pm$ 0.0102	2.46 $\pm$ 1.0021	1.36 $\pm$ 0.0022	3.03 $\pm$ 0.9127
S4	72.8	1.36 $\pm$ 0.0140	5.43 $\pm$ 0.9927	1.70 $\pm$ 0.0144	3.30 $\pm$ 0.8843
S5	35.33	0.63 $\pm$ 0.0122	3.0 $\pm$ 0.8104	1.60 $\pm$ 0.0289	3.90 $\pm$ 0.7824
S6	78.93	2.83 $\pm$ 0.7233	6.46 $\pm$ 0.8874	2.63 $\pm$ 0.0242	6.06 $\pm$ 1.0298
S7	80.00	2.63 $\pm$ 0.6100	7.13 $\pm$ 1.2104	2.10 $\pm$ 0.2187	4.26 $\pm$ 1.0094
S8	70.00	0.76 $\pm$ 0.0162	6.06 $\pm$ 1.1124	1.46 $\pm$ 0.0798	5.53 $\pm$ 1.0022
Variance ratio	156.26*	53.55*	17.41*	24.75*	117.87*
<i>Variance</i>					

* Significant at .01 and .05 probability / *Significatif à un seuil de 0.01 et de 0.05.*

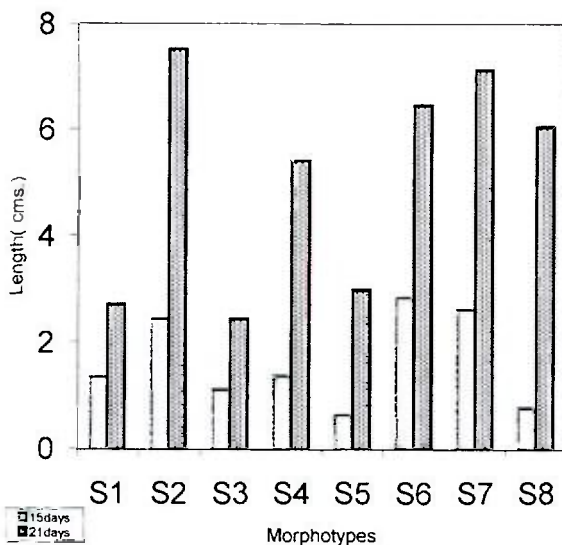


Fig. 2. Shoot length of *Machilus* seedlings.

Fig. 2. Longueur de pousses de jeunes plants de Machilus.

The shoot length after 15 days was maximum for S₆, followed closely by S₇ and S₂ and minimum for S₅. At 21 days after sowing, the shoot length of S₂ was maximum, followed closely by S₇ and S₆. The difference in length indicated a higher growth rate for S₈ and S₂ followed by S₇ and then S₄. S₁ and S₃ showed the minimum growth rate (Fig. 2).

Root length was maximum in morphotype S₆ (2.63 cm) followed by S₂ (2.46 cm) and S₇ (2.10 cm). S₄ and S₅ showed an average root length of 1.70 cm and 1.60 cm, respectively. Root length was minimum in S₃ with an average of 1.36 cm. After 3 weeks maximum root length was observed for S₆ and minimum for S₁. Maximum growth rate of roots was observed for S₈ followed by S₆. S₁ showed the minimum growth (Fig 3). Statistically, the best growth with regard to shoot length and root length was exhibited by S₂ and was followed closely by S₇ and then S₈ and S₆.

The recent emphasis in the sericulture industry is on the propagation and multiplication of non-mulberry silkworm food plants. Som is one of such plants whose method of propagation has been critically evaluated. *Machilus bombycina* is a tree, which produces seeds during early summer. They have to be washed with water to remove the pulp and later dried in the sun before storage. The seeds are brown or black with a thick covering and show poor germination. With the increasing demand of suitable plant variety the importance of vegetative propagation was realised and techniques like air layering, stem cutting and leaf and bud cutting were tried. Though Choudhary (1965), Isa and Sinha (1981), Suryanarayana *et al.*, (1985) have reported rooting during air layering by using NAA and IBA, Isa *et al.*, (1989) have reported that the rate differs with season, species, plant varieties and several other factors. Work on stem cutting with Som without hormonal treatment gave only 20% response (Siddiqui *et al.*, 1983) which therefore could not facilitate mass propagation and emphasis was again placed on seed germination. Siddiqui *et al.*, (1993) have reported morphotypic differences in the air layering method of vegetative propagation. Air layering was prepared in 8 Som morphotypes during

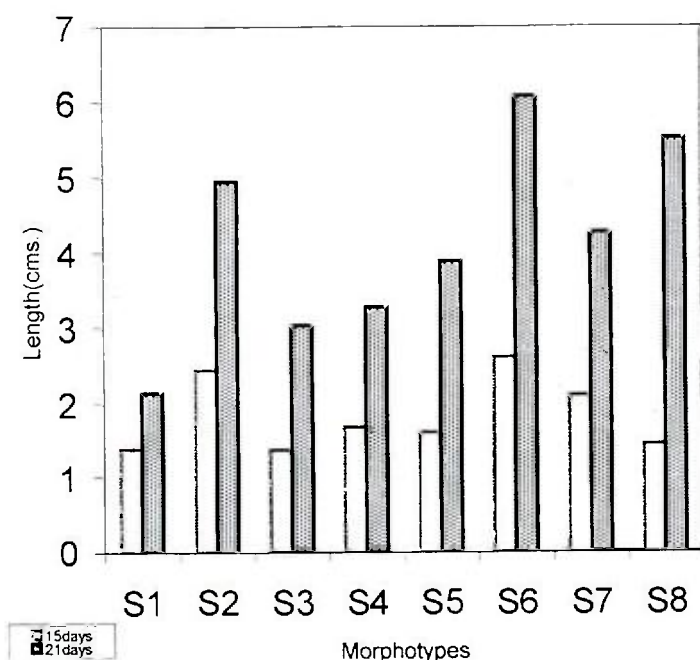


Fig. 3. Root length of *Machilus* seedlings.

Fig 3. Longueur des racines de plantules de *Machilus*.

spring and it was found that S₈ showed highest rooting followed by S₅ with 70% and S₂ with 66.7%. These results are somewhat similar to our observations regarding root establishment during seed germination where S₈ was found to show maximum rate of root growth followed by S₆ and S₂. Srivastava *et al.*, (1998) report that scarification of seeds of *Machilus* is the best way of promoting germination.

According to Landauski (1951), the variety of plant is a predominant factor which affects the rooting of a cutting in another silkworm food plant, *Morus* spp. Bindroo *et al.*, (1996) studied the propagation of mulberry under sub-tropical conditions and stated that varietal specificity in terms of regenerative capacity, growth and root induction potential plays a vital role in its propagation through stem cuttings. Siyathamma and Dandin (1998) have reported considerable variance in sprouting and rooting behaviour among the different varieties of mulberry while variation due to the season was found negligible. Variations at morphotypic/genotypic level are reported for a large number of characters – morphological, anatomical and physiological. Our investigation on two very important parameters for any tree spp. i.e., seed germination and seedling establishment has revealed significant differences among the morphotypes, hereby further supporting the division of the available germplasm of *Machilus bombycina* into morphotypes, as done by Raja Ram *et al.*, (1993).

REFERENCES

- BINDROO B.B., FOTEDAR R. K. & DHAR A. (1996) Propagation of mulberry under sub-tropical conditions. Indian Silk 34(9) 11-15.
- CHAUDHARY S. N. (1965) Studies on the propagation of "Som" (*Machilus bombycina*) by stem cutting with the aid of growth regulators. Indian Agriculturist 19(1): 82-83.
- ISA M. D. & SINHA S. S. (1981) Influence of plant growth regulators on rooting in air layers of *Machilus bombycina* King. Proceeding Sericulture Symposium and Seminar, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore : 69-72.
- ISA M. D., YADAV G. S. & THANGAVELU I. S. (1989) Seasonal effect on the rooting of air layering in *Machilus bombycina* King. (Som) Indian Jour. Seric. XXVIII No. 2: 139-144.
- LANDAUSKI M. M. (1951) Preliminary study of the different factors influencing the rooting of mulberry cutting. Revue du Ver à soie 111: 259-269.
- RAJA RAM, SENGUPTA A. K., DAS R., DEVNATH M., & SAMSON M. V. (1983) Collection, identification and evaluation of *Machilus bombycina* King. (Laurales-Lauraceae) Germplasm. The muga food plant-I. Sericologia 33(1): 109-124.
- SIDDIQUI A. A., RAJA RAM, BASUMATERY B. K. & SENGUPTA A. K. (1993) Role of biotechnology in muga food plant improvement. Indian Silk 32(1): 33-36.
- SIYATHAMMA P. & DANDIN S. B. (1998) Evaluation of mulberry (*Morus* spp.) genotypes for propagation parameters. Indian Seric. 37 No. 2: 133-136.
- SRIVASTAVA A., SINGH K., SINGH R., DAS P. K., SIDDIQUI A. A., & RAGHUVANSHI S. S. (1998) Seed germination in *Machilus bombycina* (Lauraceae). Indian Jour. of Sericulture. 37(1): 70-73.

GERMINATION ET CROISSANCE DE PLANTULES CHEZ DES MORPHOTYPES DE *MACHILUS BOMBYCINA* KING.

A. SRIVASTAVA, K. SINGH, P. K. DAS*, A. A. SIDDIQUI* & S. S. RAGHUVANSHI

In Vitro Culture and Plant Genetics Unit, Department of Botany, University of Lucknow,
Lucknow – 226 007, Inde.

Machilus bombycina King, est la plante nourricière principale du ver à soie muga *Antheraea assama* et en Inde elle n'est distribuée que dans l'Assam, le Meghalaya, le Manipur et le Bengale du Nord. Huit morphotypes de cette espèce ont été identifiés sur la base de la morphologie de la feuille. Les graines de cet arbre ont une enveloppe dure, marron presque imperméable et ne germent que lorsqu'elles sont scarifiées ou moisissent. Dans cette étude, nous avons procédé à une étude comparative de la germination et du développement de jeunes plants chez huit morphotypes, les graines provenant de la Station de Recherche Régionale sur le Muga à Boko, dans l'Assam. Des différences significatives sont obtenues entre les morphotypes : S₂ ayant la germination maximum tandis que S₂ et S₇ donnent la longueur de pousse maximum et S₆ la longueur de racine maximum 21 jours après le semis.

INTRODUCTION

Les plantes ont été observées assidûment par l'homme depuis des temps immémoriaux en raison de leurs usages multiples. Avec la croissance de la population et la modernisation, le rôle de plus en plus important des plantes dans la vie humaine nous pousse à comprendre intimement le monde des plantes et leur relation avec les êtres humains. Les arbres sont un composant vital de notre économie et de l'environnement et leurs usages sont multiples et variés.

La sériciculture est une industrie ancienne en Inde remontant au moins au deuxième siècle avant J. C. L'Inde se distingue car elle est le seul pays dans le monde à être dotée par la nature des quatre variétés de soie à savoir, la soie mûrier, la soie tussah, la soie eri et la soie muga.

La soie muga est obtenue à partir du ver à soie *Antheraea assama*. Les chenilles de ce ver à soie se nourrissent des feuilles aromatiques des plants de Som (*Machilus bombycina* King) et de Soalu (*Litsaea polyantha*), toutes les deux membres de la famille des Lauraceae. *Machilus bombycina* (King), la plante nourricière principale du ver à soie muga, est un arbre de taille moyenne avec des branches étendues et des feuilles épaisses. Cette plante nourricière du muga est distribuée de l'Inde au Japon en passant par les Philippines et en Inde elle est présente, dans l'Assam, le Meghalaya, le Manipur et le Bengale du nord. Huit morphotypes de *Machilus bombycina* ont été observés par Raja Ram et coll., (1993) et identifiés sur la base de la morphologie de la feuille et de la biologie florale. Som est également cultivée à cause de son importance dans l'élevage du ver à soie muga. Il existe plusieurs rapports sur la propagation végétale de *Machilus bombycina* par des boutures de tige et par marcottage (Chowdhary, 1965 ; Isa & Sinha, 1980 ; Suryanarayana et coll., 1985).

Cependant, ces méthodes ont leurs propres inconvénients. Avec le marcottage, il n'est pas possible d'obtenir des plantes pour le commerce parce que la technique est comparativement coûteuse

* RMRS, Boko, Assam, Inde.

et demande des compétences spéciales. La multiplication en masse de Som se fait par bouturage, ce qui assure une multiplication conforme. Cette méthode, cependant, donne un taux de survie variable chaque année et restreint aussi l'expression de la variabilité naturelle, qui est possible lorsque les populations sont cultivées à partir de graines. La germination des graines de *Machilus* pose un problème majeur depuis longtemps pour les cultivateurs de la plante muga. Les graines sont recouvertes par une enveloppe dure et épaisse qui empêche l'absorption de l'eau, ce qui freine la germination. Srivastava et coll., (1998) ont observé que la scarification partielle des graines avec des méthodes mécaniques aide à surmonter le problème de la germination. Comme la germination de la graine et l'établissement de jeunes plants sont des paramètres importants pour la différenciation variété /morphotype, nous nous sommes efforcés de les comparer chez huit morphotypes connus de *Machilus bombycina*, obtenus auprès du RMRS de Boko.

MATERIELS ET METHODES

Les graines de huit morphotypes de *Machilus bombycina* King, ont été obtenues auprès de la Station de Recherche Régionale du Muga à Boko, dans l'Assam. Ces graines sont petites, rondes, marron foncé avec une enveloppe dure. Nos études précédentes sur différents pré-traitements ont révélé que la scarification mécanique est la meilleure méthode pour une germination maximum, surtout quand les graines sont mises à germer sur du papier filtre humide. Le début de la germination a lieu six jours après le semis et les données initiales sont enregistrées, puis suivies par des observations régulières pendant 3 semaines. Les données ont été soumises à une analyse statistique pour calculer la moyenne réelle, l'écart type et aussi la variance pour tester l'importance de la différence entre les 8 morphotypes.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe une germination maximum des graines chez S₂, S₆, S₄ et S₈ donnent plus de 70 % de germination tandis que S₁, S₃ et S₅ donnent moins de 50 % (Tableau I, Fig. 1). L'analyse de variance montre que la différence de germination entre les morphotypes est importante.

La longueur de la racine après 15 jours est maximum chez S₆, suivi de près par S₇ et S₂ et minimum pour S₅. Vingt et un jours après le semis, la longueur de la racine est maximum chez S₂, suivi de près par S₇ et S₆. La différence de longueur indique un taux de croissance plus élevé chez S₈ et S₂, suivis par S₇ puis S₄. S₁ et S₃ ont un taux de croissance minimum (Fig. 2).

La longueur de la racine est maximum chez le morphotype S₆ (2,63 cm) suivi par S₂ (2,46 cm) et S₇ (2,10 cm). S₄ et S₅ ont une longueur de racine moyenne de 1,70 cm et de 1,60 cm respectivement. La longueur de la racine est minime chez S₃ avec une moyenne de 1,36 cm. Après 3 semaines, une longueur de racine maximum est observée chez S₆ et minimale chez S₁. Un taux maximum de croissance des racines est observé chez S₈, suivi par S₆. S₁ a la croissance minimum (Fig. 3). S₂ montre la meilleure croissance de la pousse et de la racine, suivi de près par S₇, S₈ et S₆.

La tendance récente dans l'industrie séricicole est à la propagation et à la multiplication des plantes nourricières du ver à soie non mûrier. Som est l'une de ces plantes, et sa méthode de propagation a été évaluée de manière critique. *Machilus bombycina* est un arbre qui produit des graines au début de l'été. Elles doivent être lavées avec de l'eau pour enlever la pulpe, puis séchées au soleil avant le stockage. Les graines sont marron ou noires avec une enveloppe épaisse et leur germination est mauvaise. Avec l'augmentation de la demande en variétés adaptées de plantes, on a pris conscience de l'importance de la propagation végétale et des techniques comme le marcottage, et le bouturage de la tige, de la feuille et du bourgeon ont été essayées. Bien que Choudhary (1965), Isa et Sinha (1981), Suryanarayana et coll., (1985) aient observé un racinement avec le marcottage en utilisant du NAA et de l'IBA, Isa et coll., (1989) ont signalé que le taux diffère en fonction de la saison, de l'espèce, des variétés de plantes et de plusieurs autres facteurs. Des boutures de tige de Som sans traitement

hormonal n'ont donné qu'une réponse de 20 % (Siddiqui et coll., 1983) ce qui n'a donc pas facilité la propagation en masse et on a à nouveau privilégié la germination des graines. Siddiqui et coll., (1993) ont remarqué des différences dans la propagation végétale par marcottage en fonction des morphotypes. Ils ont marcotté 8 morphotypes de Som au printemps et ont montré que S₈ a le racinement le plus élevé suivi par S₅ avec 70 % et S₂ avec 66,7 %. Ces résultats sont quelque peu similaires à nos observations concernant l'établissement de racines pendant la germination de graines, où S₈ s'est avéré présenter un taux maximum de croissance des racines, suivi par S₆ et S₂. Srivastava et coll., (1998) observent que la scarification des graines de *Machilus* est le meilleur moyen de promouvoir la germination.

Selon Landauski (1951), la variété de plante est un facteur prédominant qui a des effets sur le racinement de boutures chez une autre plante nourricière du ver à soie, *Morus* spp. Bindroo et coll., (1996) ont étudié la propagation du mûrier dans des conditions subtropicales et estimé que la spécificité variétale en termes de capacité régénératrice, de croissance et de potentiel d'induction de racines joue un rôle vital dans sa propagation par boutures de la tige. Siyathamma et Dandin (1998) ont signalé une variance considérable du comportement de bourgeonnement et de racinement chez les différentes variétés de mûrier tandis que la variation due à la saison s'avère négligeable. Des variations au niveau morphotypique / génotypique sont signalées pour un grand nombre de caractères morphologiques, anatomiques et physiologiques. Notre étude sur deux paramètres très importants pour n'importe quelle espèce d'arbre, la germination des graines et l'établissement de jeunes plants révèle des différences importantes entre les morphotypes, ce qui conforte la division en morphotypes par Raja Ram et coll., (1993) des germoplasmes disponibles de *Machilus bombycina*.

DESIGN OF SILKWORM FEEDING SHED

J. REED & A. SNYMAN

Tsakani Silk Farm, P.O. Box 538, Hazyuuen, 1242, Republic of South Africa.

Keywords : Design of feeding shed, produce silk cocoons, sub-tropical climate, mulberry shrubs, corrective pruning, diligent supervision, ten generations of silkworm colonies, monthly mean temperatures, building specifications, roofing, wall framework, rooms for feeding, feeding racks, wet wall panelling for cooling, heating unit, uniform temperatures for effective larval development.

INTRODUCTION

Silkworm rearing to produce silk cocoons has been established in a selected developing area in the north eastern region of Southern Africa.

This region possesses a sub-tropical climate which is suitable for mulberry leaf production. By applying planned corrective pruning of the mulberry shrubs which are planted in blocks, sufficient foliage is available every eight to nine weeks. Silkworm rearing on a large scale is a new type of farming enterprise in Southern Africa therefore it requires diligent supervision.

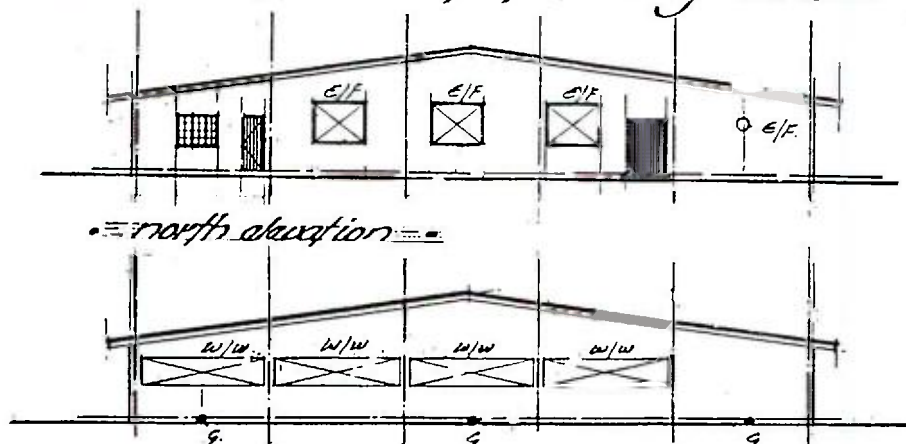
Up to ten generations of silkworm colonies have been cared for and fed per season commencing end July and terminating towards end of May of the following year.

Table 1. Mean temperature applicable to the north eastern region of Southern Africa.

Tableau 1. Températures moyennes dans la région nord-est de l'Afrique du Sud.

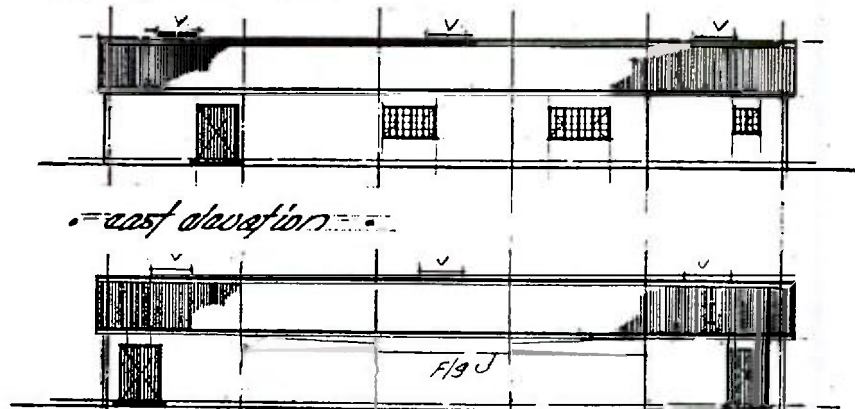
Month	Jan.	Feb.	March	April	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
Mois	janv.	fev.	mars	avril	mai	juin	juil.	août	sept.	oct.	nov.	dec.
Mean Max. Temp °C Temp. Max. Moyenne °C	30.9	31.2	30.6	29.9	28.8	22.9	23.6	24.9	26.0	25.5	28.04	30.1
Mean Min. Temp °C Temp. Min. Moyenne °C	18.4	19.7	19.1	17.8	13.6	6.6	11.9	12.1	13.7	14.7	17.01	18.6

• cross sections of feeding shed •



• north elevation •

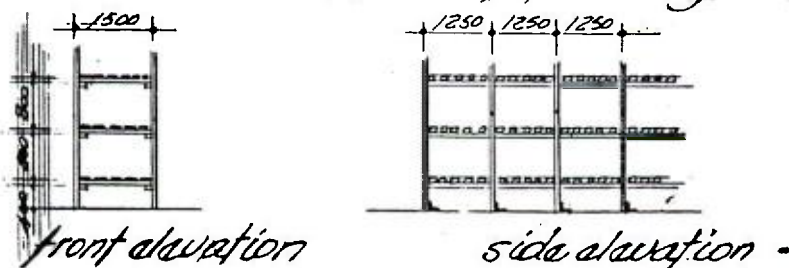
• south elevation •



• east elevation •

• west elevation •

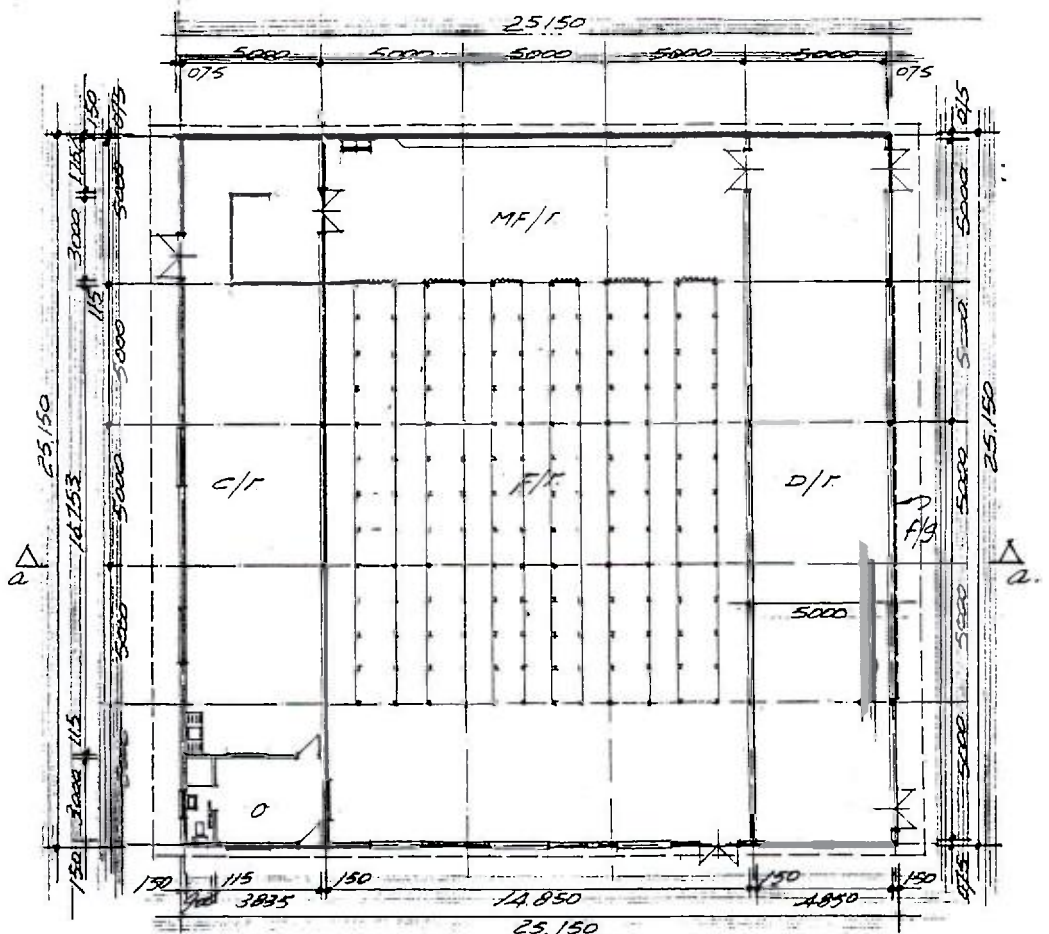
• cross sections of feeding racks •



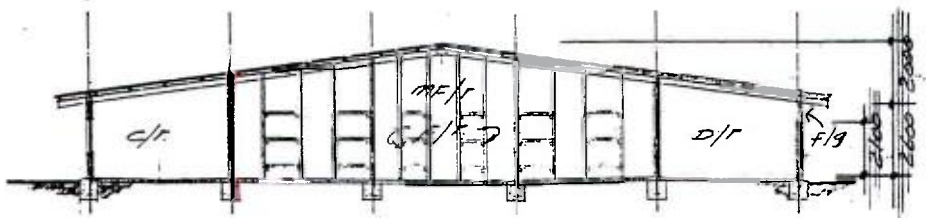
front elevation

side elevation •

• design of silkworm feeding shed •



• floor plan • total area: 632.52 m²



• section a-a •

Throughout Southern Africa the daily temperature during spring, summer and autumn is suitable for silkworm rearing. However, the night temperatures during the same period are much lower.

Bearing these aspects in mind, a feeding shed was designed for convenient functionality.

BUILDING SPECIFICATIONS

The floor area of the shed is 632.52 square meters. The roof is supported on laminated pine rafters 250 x 76 mm and 114 x 76 mm timber purlins. Roof pitch = seven and half degrees. The vertical supports for these beams are tanalith treated gum poles (*Eucalyptus* spp) 150 mm diameter. These poles are equidistantly spaced 5 m apart throughout the floor area including the outside walls.

Each pole is embedded in a concrete base. The corner poles are strengthened by cross beams to adjacent poles. The base of the exposed poles in the interior floor area is protected with a metal ring cover 100 mm high at floor level. The roof covering is corrugated iron or other suitable material. Under the corrugated iron cladding, sisalation insulation is installed. Ventilators (V) are mounted on the roof. The floor is covered with a 150 mm thick concrete slab on compacted soil finished with a steel float. The floor extends as an apron around the outside of the shed 1 000 mm wide. The floor slopes slightly to the centre over the length allowing for water run off in each section into gully's (G) for drainage.

The wall framework comprises diamond pattern metal network together with foam polystyrene board or other suitable insulation sheeting. After securing into position both sides are gunnited plastered internally and externally. The finished walls are 120 mm thick. All double doors are steel chawl.

The shed is divided into three main sections :

1. Drawer room (D/r) - 125 metre square.
2. Main feeding room (MF/r) - 375 metre square.
3. Cocoon sorting room (C/r) - 82.5 metre square.
 - a) An office (O) adjoins this room - 17.5 metre square.
 - b) The entrance to the main feeding room is at the other end - 25 metre square.

The outside wall of the drawer room has a fibre glass - filon type covering (F/g) for light entrance measuring 15,000 x 400 mm wide.

The floor plan of the main feeding room shows the structure of the feeding racks (F/r). These uprights 76 x 50 mm are secured in part to the tanalith treated upright poles which support the roof. Steel angled brackets are installed against the additional uprights at floor level.

The ends of the feeding racks closest to the wet wall panel are covered with plastic shade cloth netting 40 %.

The feeding area of the racks is fitted with wooden cross sections to support the shade cloth netting 70 % on which the colonies are reared. There are three tiers. The first level is 400 mm above the floor. The maximum height of the third level is 1 600 mm.

A wet wall panel is mounted within the south wall as per plan (W/w). The panel has a wooden frame with bird mesh wire netting 10 mm apertures covering the panel on either side. The inner section is filled, not compacted, with wood wool (pine fibre strips not shavings). Wooden cross beams 20 mm are inserted to prevent the wood wool from sagging. The finished panel is 100 mm thick.

The wet wall is sprayed when the outside temperature rises above 29 °C and in conjunction with the extraction fan (E/f) mounted in the opposite wall this creates a cooling effect to maintain the temperature between 25 -28 °C.

A heating unit with suitable distribution box and fan is mounted below the exhaust fans in the main feeding room and connected to plastic ducting 300 mm in diameter when inflated running along

the floor underneath two of the feeding racks. The ducting is perforated at regular intervals with 30 mm openings on each side.

A separate plastic duct is connected and runs along the floor in the drawer room. When required thermostatically controlled heating is supplied as the night temperature drops below 25°C.

A more uniform temperature prevents irregular larval development and the caring and feeding operations are more effective.

COMMENTS

The framework for the roofing which comprises the tanalith treated poles equidistantly spaced, is the major feature of this design. There is no steel structure required which reduces the cost of a similar size feeding shed.

PLAN D'UNE MAGNANERIE POUR VERS A SOIE

J. REED & A. SNYMAN

Tsakani Silk Farm, P.O. Box 538, Hazyuiew 1242, Afrique du Sud.

INTRODUCTION

L'élevage du ver à soie dans le but de la production de cocons soyeux a été établi dans une zone de développement sélectionnée dans le nord-est de l'Afrique du Sud.

Cette région au climat subtropical convient à la production de feuilles de mûrier. En taillant de manière planifiée des mûriers plantés en bloc, on dispose de suffisamment de feuilles tous les huit à neuf mois. L'élevage du ver à soie à grande échelle est un nouveau type d'entreprise agricole en Afrique du sud, il nécessite donc une supervision attentive.

Jusqu'à 10 générations de vers à soie ont été soignées et nourries pendant une saison, qui débute à la fin du mois de juillet et s'achève vers la fin du mois de mai de l'année suivante.

A travers l'Afrique du sud, les températures journalières durant le printemps, l'été et l'automne sont convenables pour l'élevage des vers à soie. Cependant, les températures nocturnes durant ces mêmes périodes sont beaucoup plus basses.

Compte tenu de ces aspects là, on a conçu une magnanerie bien fonctionnelle.

CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION

La surface du sol de la magnanerie fait 632,52 mètres carré. Le toit est supporté par des chevrons de pin laminé de 250 x 76 mm, et des pannes de bois de 114 x 76 mm. Degré de pente du toit = 7.5 degrés. Les supports verticaux de ces poutres sont des poteaux en caoutchouc traité au thanalithe (*Eucalyptus* spp). Ces poteaux sont équidistants de cinq mètres sur toute la surface du sol, en incluant les murs extérieurs.

Chaque poteau est encastré dans une base de béton. Les poteaux situés dans les coins de la magnanerie sont renforcés par des traverses liées aux poteaux adjacents. La base des poteaux exposés à l'intérieur est protégée par une enceinte de métal de 100 mm de hauteur au niveau du sol.

Le toit est en tôle ondulée, ou fait de n'importe quel autre matériel adapté. Sous la tôle ondulée, une isolation en sisal a été installée. Des ventilateurs (V) ont été posés sur le toit. Le sol est recouvert d'un bloc de béton de 150 mm sur un sol compact complété par une flottaison en acier.

Le sol se prolonge à l'extérieur de la magnanerie sur une largeur de 1 000 mm.

Le sol descend en pente douce vers le centre, sur la longueur, permettant ainsi à l'eau de s'écouler de chaque section jusqu'au caniveau de drainage (G).

Le châssis des murs est constitué d'un grillage de métal aux motifs en "diamant", avec des plaques de polystyrène ou un autre habillage isolant adéquat. Après les avoir montés, les deux cotés sont recouverts de toile de jute à l'intérieur et à l'extérieur. Les murs achevés ont une épaisseur de 120 mm. Toutes les portes doubles sont en acier.

La magnanerie est divisée en trois parties principales :

1. Pièce à tiroirs (D/r) - 125 mètres carré
2. Pièce principale de nourrissage (Mf/r) - 375 mètres carré

3. Pièce de tri des cocons (C/r) - 82,5 mètres carré
 - a) Un bureau (O) est adjacent à cette pièce - 17,5 mètres carré
 - b) L'entrée de la pièce principale de nourrissage est située à l'opposé - 25 mètres carré

Le mur extérieur de la pièce à tiroirs a une vitre en plexiglass (F/g), mesurant 15 000 x 400 mm de longueur, pour la pénétration de la lumière.

Le plan du sol de la pièce principale de nourrissage montre la structure des claies de nourrissage (F/r). Les montants de 76 x 50 mm sont rattachés en partie aux poteaux traités au tanalith qui maintiennent le toit. Des tasseaux en acier renforcent les montants supplémentaires au niveau du sol.

Les extrémités des claies de nourrissage les plus proches du panneau humide sont recouvertes par un filet de plastique fin, à 40 %.

Les casiers de nourrissage ont des encoches permettant de maintenir un filet fin, à 70 %, sur lequel les animaux sont élevés. Il y a trois niveaux. Le premier niveau est à 400 mm du sol. La hauteur maximale du troisième niveau est de 1 600 mm.

Un panneau humide est monté à l'intérieur du mur sud, comme indiqué sur le plan (W/ w). Le panneau est constitué d'un encadrement en bois avec un grillage aux trous de 10 mm, ce grillage couvre le panneau de chaque côté. La partie intérieure est remplie (non compactée) de fibres de bois (fibres de pin en bandes et non en copeaux). Des traverses de 20 mm sont insérées pour empêcher les fibres de bois de s'affaisser. Le panneau achevé a une épaisseur de 100 mm.

On pulvérise de l'eau sur le panneau humide lorsque la température extérieure monte au-dessus de 29°C et en connexion avec les ventilateurs (E/f) montés au mur opposé, cela crée un effet rafraîchissant pour maintenir la température entre 25 et 28°C.

Un chauffage avec un bon conduit de distribution et un radiateur est monté en-dessous des ventilateurs aspirants dans la pièce principale d'élevage et est connecté à un conduit de plastique de 300 mm de diamètre qui passe le long du sol, sous deux des claies de nourrissage. Le conduit est percé à intervalles réguliers de chaque côté et les ouvertures font 30 mm.

Un conduit de plastique séparé est connecté et longe le sol de la pièce aux tiroirs. Lorsque cela est nécessaire, une chaleur contrôlée par thermostat est fournie lorsque la température nocturne descend en-dessous de 25°C.

Une température plus uniforme empêche un développement larvaire irrégulier et les opérations de soins et de nourrissage sont plus efficaces.

COMMENTAIRE

La charpente du toit dont les poteaux sont traités au tanalith et espacés à égale distance est la caractéristique principale de ce plan. Il ne nécessite pas une structure en acier, ce qui réduit le coût de la magnanerie.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	523
General sericulture	
Mûrier	526
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	531
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	536
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	538
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	545
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	547
Silkworms: silk glands	
Soie	548
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

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

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

Sériciculture générale

General sericulture

Sericulture in Colombia.

Sériciculture en Colombie.

2000 Indian Silk, Vol. 39(5), 26-27. (E)

Analysis on the growth and decline of mulberry moth in 1998 and its prevention and control.

Analyse de la croissance et du déclin du papillon du mûrier en 1998 et de sa prévention.

BAI X. *et al.*

Huzhou General Station of Sericultural Management, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 20-23. (C,e)

Development and technical advancement of mulberry sapling production in the past fifty years.

Développement et progrès techniques de la production de plants de mûrier pendant les cinquante dernières années.

CHENG Q.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 1-4. (C,e)

Adoption of new seri-technologies under sub-tropical conditions.

Adoption de nouvelles technologies séricoles sous des conditions sub-tropicales.

FOTADAR R.K. *et al.*

Research Extension Centre, Kathua 184101, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(4), 11-14. (E)

Studies on the factors affecting fluctuation of cocoon price.

Etudes sur les facteurs affectant la fluctuation des prix des cocons.

GU G., FAN Z.

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

2000 Canye Kexue, Vol. 26(2), 99-104. (C,e)

Quicken the step of the checker cocooning frames popularization to improve the cocoon quality.

Accélérer la cadence de la popularisation des structures d'encabanage en damier pour améliorer la qualité des cocons.

LIU W., TANG X.

Zhejiang Provincial Silk Corp., China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 29-30. (C,e)

Fundamental research trends of sericulture in the 21st century.

Tendances de la recherche fondamentale en sériciculture au 21^e siècle.

LU C., XIANG Z., HUANG J.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2000 Canye Kexue, Vol. 26(2), 105-114. (C,e)

Tamil Nadu - Problems of women in sericulture - A case study.

Tamil Nadu. Problèmes des femmes en sériciculture - Une étude de cas.

MRIDULA REDDY D., KAMALAMMA N.

Department of Family Resource Management, College of Home Science, ANGR Agricultural University, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(5), 19-22. (E)

Registration of host plant and silkworm germplasm.

Enregistrement de germoplasmes de plante hôte et de ver à soie.

MUKHERJEE P.

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur, Tamil Nadu, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(2), 5-7. (E)

Saga of muga silk.

Saga de la soie muga.

MUKHOPADHYAY S.K.

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(4), 18-19. (E)

Management of pesticide caused crisis in sericulture.

La gestion des pesticides cause des crises dans la sériciculture.

PAI I.K.

Department of Zoology, Goa University, Goa, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(5), 13-14. (E)

Suggestion on the output and quality improvement of silkworm eggs in parent silkworm area.

Suggestion pour la production et l'amélioration de la qualité des oeufs de vers à soie dans les zones d'élevage des races parentales.

PANG F. *et al.*

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 39-40. (C)

Study on processing technology of mulberry fermented beverage.

Etude sur les procédés technologiques des boissons de mûrier fermentées.

PANS., WANG K., LIU R.

1999 Shipin Gongye Keji, Vol. 5, 35-37.

Brilliant achievement made in the past fifty years.

Brillantes réalisations faites pendant les cinquante dernières années.

WANG P.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 1-4. (C,e)

Transformation of quantity enlargement into quality improvement on sericultural production.

Transformation de l'accroissement quantitatif en amélioration qualitative de la production séricicole.

WANG P., ZHOU J.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 1-3. (C,e)

Analysis on the current situation of pebrine control in Zhejiang province.

Analyse de la situation actuelle du contrôle de la pébrine dans la province de Zhejiang.

WU Y., TAO T., WU H.

Zhejiang Corp. of Silkworm Eggs, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 9-10. (C,e)

Current situation and thinking of checker cocooning frames popularization in Zhejiang province.

Situation actuelle et réflexion pour la popularisation des structures d'encabanage en damier dans la province de Zhejiang.

XU C.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 41-42. (C)

Forum on restoration of Zhejiang sericulture for new century.

Forum sur la restauration de la sériciculture au Zhejiang pour le nouveau siècle.

XU J. *et al.*

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 1-8. (C)

Quality and efficiency, the main research objectives of moriculture.

Qualité et efficacité, les objectifs principaux de la moriculture.

YANG X. *et al.*

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 13-15. (C,e)

Investigation on the contamination of pebrine spore in the silkworm eggs production areas.

Recherche sur la contamination par les spores de pébrine dans les aires de production d'oeufs de vers à soie.

YAO S. *et al.*

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 33-34. (C)

Changes of Zhejiang sericultural areas and its development trend.

Changement des zones séricicoles au Zhejiang et leur tendance au développement.

ZHOU J.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 15-17. (C,e)

Studies on necessary technology and measures for high quality cocoon production.

Etudes sur les technologies et les mesures nécessaires pour la production de cocons de haute qualité.

ZHU L.

Department of Sericultural Science, Zhejiang University, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 5-10. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Studies on photosynthesis characteristics of mulberry trees.

Etudes sur les caractéristiques de photosynthèse des mûriers.

AN L. *et al.*

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 115-117. (C)

Relationship between the yield of spring leaves and the degree of shoot cutting for frost-injured Nongsang 8.

Relation entre le rendement en feuilles au printemps et le degré de taille des pousses pour le mûrier Nongsang 8, sensible au gel.

CHENG W. *et al.*

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(3), 42-43. (C)

The study of karyotype of cell chromosome of artificial triploid mulberry variety 9204.

L'étude du karyotype d'un triploïde artificiel de mûrier de variété 9204.

GUO H., MAIMAITI Y., YU M.

Xingjiang Hetian Sericulture Institute, Hetian 848000, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 65-70. (C,e)

Antihyperglycemic effects of *Morus nigra* and *Morus alba* in mice.

Effets antihyperglycémiques de *Morus nigra* et *Morus alba* chez la souris.

HOSSEINZADEH H., SADEGHI A.

1999 *Pharm. Pharmacol.*, Vol. 9(2), 63-65. (E)

Molecular characterization of a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry.

Caractérisation moléculaire d'un gène d'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase chez le mûrier.

JAIN A.K., VINCENT R.M., NESSLER C.L.

Department of Biology, Texas A&M University, College Station 77843-3258, USA.

2000 *Plant. Mol. Biol.*, Vol. 42(4), 559-569. (E)

Studies on the prevention technique of grain pest in sericultural farmers'house and its application.

Etudes sur la technique de prévention du parasitisme des graines dans les fermes séricicoles et son application.

JIANG H., HUANG G.

Tonglu Popularization Office of Agricultural Technique, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(1), 52-54. (C,e)

Horizontal layering of green wood of newly-planted mulberry to improve the mulberry cultivation and sapling raising.

Marcottage horizontal de bois vert de mûriers récemment plantés pour améliorer la culture et la production de plants.

JIANG Y.

Jintan Sericultural Station, Jiangsu Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 55-56. (C,e)

Effect of magnesium fertilizer on mulberry leaf output and quality.

Effet d'un fertilisant riche en magnésium sur la production et la qualité des feuilles de mûrier.

JIN Y., XIA J., ZHANG Z.

Shaoxing Agricultural School, Zhejiang Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 35-37. (C,e)

Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line.

Deux flavonoïdes des feuilles de *Morus alba* induisent une différenciation de la lignée cellulaire humaine de la leucémie promyélocytaire.

KIM S.Y., GAO J.J., KANG H.K.

2000 Biol. Pharm. Bull., Vol. 23(4), 451-455. (E)

Properties of the proteolytic enzymes from mulberry tree bark (*Morus alba* Linne).

Propriétés des enzymes protéolytiques des écorces de mûriers (*Morus alba* Linné).

KWON S.K., PARK S.W., CHOI W.Y.

1998 Han'guk Sikp'um Yongyang Hakhoechi, Vol. 11(5), 576-579.

Studied on labor-saving techniques for mulberry cultivation.

Etudes sur les techniques d'économie de travail pour la culture du mûrier.

LIN K., XU J., ZHOU J., LU T.

Haiyan Technical Extension Station of Sericulture Production, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 35-36. (C,e)

Incidence of may-june beetle (*Holotrichia Serrata*) in mulberry garden.

Incidence du scarabée *Holotrichia Serrata* dans les plantations de mûriers.

PHILIP T., MARY JOSEPH A.V.

Research Extension Centre, Angamaly, Kerala, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(4), 15. (E)

Nitrogenase tubercles on mulberry roots.

Tubercules de nitrogénase sur les racines de mûrier.

PILPENKO B.F. *et al.*

1998 Zhivotnovud. Nauki, Vol. supp.1, 7-9.

Experiment and result of mulberry shoot harvesting technique in late autumn.

Expérimentation et résultat de la récolte des pousses de mûrier en fin d'automne.

QIU B., YAN G., FANG Y., WEI G.

Shangyu Silk Company, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 50-51. (C,e)

Study on the browning during tissue culture of *Morus alba* L.

Etude sur le brunissement pendant la culture des tissus de *Morus alba* L.

QIU L. *et al.*

2000 Canye Kexue, Vol. 26(2), 118-119. (C)

Incidence of Tobacco cutworm on mulberry.

Incidence du ver du tabac sur les mûriers.

RAJAGOPAL REDDY C.

Department of Sericulture, Ananthapur, India.

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(3), 9-10. (E)

Isolation and characterization of bacteria from colonies exuded from "germ-free" mulberry shoots cultured *in vitro*.

Isolement et caractérisation de bactéries des colonies exsudées des pousses de mûrier "sans-germe" cultivées *in vitro*.

SATO M., WEI W., KAWAKITA H., YAMANOUCHI H.

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

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 147-152. (J,e)

Boron - Its role and management in mulberry.

Bore - Son rôle et son utilisation sur les mûriers.

SINGHVI N.R., SUBBASWAMY M.R., DATTA R.K.

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

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(2), 8-10. (E)

Study on the reason of mulberry leaf yellowing and its prevention.

Etude sur les causes du jaunissement des feuilles de mûrier et sa prévention.

SUN X., FANG D., LI C., SUN T.

Qingzhou Silkworm Breeding Station, Shandong Province, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(1), 38-40. (C,e)

***In vitro* response of commercially valuable cultivars of *Morus* species to thidiazuron and activated charcoal.**

Réponse *in vitro* au thidiazuron et au charbon activé des cultivars commercialement valables des variétés de mûrier.

TEWARI A., BHATNAGAR S., KHURANA P.

1999 *Plant Biotechnology*, Vol. 16(5), 413-417. (E)

***In vitro* response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stress.**

Réponse *in vitro* de génotypes de mûrier (*Morus* sp.) prometteurs, à la tolérance au sel et au stress osmotique.

TEWARY P.K. *et al.*

2000 *Plant Growth Regul.*, Vol. 30(1), 17-21. (E)

Control of mulberry beetle, *Abrus fortunei* (Baly).

Lutte contre le scarabée du mûrier, *Abrus fortunei* (Baly).

WEI H. *et al.*

1999 *Jaingxi Nongye Daxue Xuebao*, Vol. 21(4), 512-515.

Occurrence and control of three Geometers of mulberry tree.

Présence et lutte contre trois Géométrides du mûrier.

WU J. *et al.*

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(4), 39-40. (C)

Studies on the grafted sapling grade of mulberry tree and its grading standard.

Etude sur la qualité des plants de mûriers greffés et les standards de classification.

WU X. *et al.*

Haining General Station of Sericultural Management, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 30-32. (C,e)

Report of introducing a new mulberry variety Shengdong-1.

Rapport sur l'introduction d'une nouvelle variété de mûrier Shengdong-1.

XIA X., LIN K., WU X.

Station for Popularizing Agricultural Technique of Guodian Town, Haining City, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 23-24. (C,e)

Introduction to a new injurious insect *Nysius ericae* (Schilling) of mulberry field.

Présentation d'un nouvel insecte nuisible *Nysius ericae* (Schilling) des champs de mûrier.

YANG B.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 44. (C)

Isolation and identification of chitosan from *Morus alba* L.

Isolément et identification de chitosan à partir de *Morus alba* L.

YANG N., ZHEN X.

1999 Tianran Chanwu Yanjiu Yu kaifa, Vol. 11(5), 38-41.

Degradation products of chlorophyll in a silkworm excrement for therapeutic use.

Produits de dégradation de la chlorophylle dans les excréments de ver à soie pour usage thérapeutique.

YAO J. *et al.*

1999 Zhongcaoyao, Vol. 30(8), 568-571.

Degradation of silkworm excrement crude chlorophyll and synthesis of chlorin P6 amide derivatives.

Dégradation de la chlorophylle brute de l'excrément de ver à soie et synthèse des dérivés d'amide P6.

YAO J. *et al.*

1999 Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi, Vol. 30(9), 403-406.

The absorption of Cr and fluctuation of nutrients in mulberry seedlings treated by Cr³⁺ and Cr⁶⁺.

Absorption de chrome et fluctuation de la valeur nutritive chez les plants de mûrier traités avec Cr³⁺ et Cr⁶⁺.

ZHANG J., KUNO K.

Environmental and Natural Resource Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan.

2000 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(2), 139-145. (J,e)

Experiment and application of new mulberry variety Xinyiyuan.

Expérimentation et exploitation de la nouvelle variété de mûrier Xinyiyuan.

ZHANG Z.

Jiangyou Silk Company, Sichuan Province, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 33-34. (C,e)

Experiment on the termite killing in mulberry garden.

Essai d'élimination des termites dans les champs de mûriers.

ZHAO G.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 43-44. (C)

Studies on the nutrition characteristics of mulberry trees in the densely planted mulberry field.

Etudes sur les caractéristiques nutritionnelles des mûriers cultivés dans des plantations denses.

ZHAO W., JIANG Q.

Sericultural Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 28-29. (C,e)

Optimization of the conditions for mulberry genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Optimisation des conditions pour les transformations génétiques de mûrier avec *Agrobacterium tumefaciens*.

ZHONG M. *et al.*

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

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 16-18. (C,e)

Introduction to the weeds of mulberry field and its control.

Les mauvaises herbes dans les champs de mûriers et leur contrôle.

ZHOU L., WANG J., WU H.

Zhuji Silk Corp. China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 45-46. (C,e)

Soil acidification under mulberry groves in the Jia-Hu plain of Zhejiang.

Acidification du sol sous les plantations de mûriers dans la plaine de Jia-Hu dans le Zhejiang.

ZHOU Q., ZHANG Y.

1999 Turang Tongbao, Vol. 30(5), 206-207, 211.

Bombyx mori : élevage, nutrition, pathologie

Bombyx mori: rearing, feeding, pathology

Effects of KK42, an imidazole derivative, on rearing and reproductive performance of *Bombyx mori* L. during the hot, wet season.

Effets de KK42, un dérivé d'imidazole, sur l'élevage et les performances reproductives de *Bombyx mori* L. pendant la saison chaude et humide.

BANERJEE K., DEB D.C.

1999 Insect Sci. Its appl., Vol. 19(1), 85-90. (E)

A new treatment method for reducing non-colored eggs by acid treatment after refrigeration.

Une nouvelle méthode pour réduire les oeufs non-colorés par traitement à l'acide après réfrigération.

CAI Y.

Jiaxing Silkworm Egg Production Station, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 25-26. (C,e)

Character of parent eggs and its hybrid of new summer and autumn silkworm race Xia7 x Xia6.

Caractéristiques des oeufs parentaux et des hybrides d'une nouvelle race de ver à soie Xia7 x Xia6 pour l'élevage d'été et d'automne.

CAO J., XIA J., YE A.

Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 45-46. (C,e)

Toxicity and residual duration of a pesticide "Bifenthrin" on the larvae of *Bombyx mori*.

Toxicité et longévité résiduelle du pesticide "Bifenthrin" sur les larves de *Bombyx mori*.

CHEN X. *et al.*

The Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Science, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 28-29. (C,e)

Analysis on the causes of nuclear polyhedrosis of late mid-autumn silkworm in Huzhou in 1998.

Analyse des causes de la polyédrose nucléaire des vers à soie à la mi-automne, en 1998, à Huzhou.

CHENG D., FENG J., JIN W.

Huzhou Institute of Sericultural Research, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 36-37. (C,e)

Test and evaluation on the toxicity of nineteen insecticides to the silkworm (*Bombyx mori*).

Test et évaluation de la toxicité pour le ver à soie (*Bombyx mori*) de dix-neuf insecticides.

CHENG Z., SHEN W., ZHU M., PAN X.

Huzhou Institute of Agricultural Sciences, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 25-27. (C,e)

Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* cry-II-type crystal protein gene.

Clonage d'un nouveau gène de protéine cristalline de type cry-II de *Bacillus thuringiensis*.

CHOI S.K., SHIN B.S., KONG E.M., RHO H.M., PARK S.H.

Laboratory of Microbial and Bioprocess Engineering, KRIBB, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea.

2000 *Curr. Microbiol.*, Vol. 41(1), 65-69. (E)

Harmfulness and measures for control of the innerside stained cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*.

Préjudice et mesures pour éviter les cocons tachés de vers à soie, *Bombyx mori*.

DING J.

Department of Sericultural Science, Zhejiang University, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(2), 45-46. (C,e)

Effect of several chemical on the control of NPV disease.

Effet de plusieurs produits chimiques contre la maladie due au virus de la polyédrose nucléaire.

FENG J., CHENG D., SHEN Y.

Huzhou Institute of Sericultural Research, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(4), 30-31. (C,e)

Silkworm moth eclosion box for quality seed production.

Boîte pour l'éclosion des papillons de vers à soie pour une production de graines de qualité.

GURURAJ C.S., HURKADLI H.K., VEERESHY S.

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

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(3), 14, 17. (E)

Metabolic profile of the target tissues in silkworm, *Bombyx mori* infected with BmNPV.

Profil métabolique des tissus cibles chez le ver à soie, *Bombyx mori* infecté par le BmNPV.

GURURAJ C.S., SEKHARAPPA B.M., SARANGI S.K.

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

1999 *Indian J. Seric.*, Vol. 38(2), 89-94. (E)

Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Uréase de plante hôte dans l'hémolymphe du ver à soie, *Bombyx mori*.

HIRAYAMA C., SUGIMURA M., SAITO H., NAKAMURA M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi, Tsukuba, 305-8634, Ibaraki, Japan.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(10), 1415-1421. (E)

A preliminary report on acid treatment of cold stored hibernating parent eggs of Su5 et Su6.

Un rapport préliminaire sur le traitement à l'acide d'oeufs hibernants des variétés Su5 et Su6 gardés au froid.

JIANG L. et al.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 127-128. (E)

Experiment on the effect of Rongxing diet to silkworm.

Effets de l'aliment Rongxing sur les vers à soie.

JIN W., YAO Y., SHEN J., CHEN D., MA X.

Huzhou Institute of Sericultural Research, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(3), 47-48. (C,e)

Experiments of different drying method for male cocoons.

Expérimentations de différentes méthodes de séchage pour les cocons mâles.

LI X., CHEN X.

Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 26-27. (C,e)

First report on the experiment rearing of male silkworm (*Bombyx mori*).

Premier rapport expérimental sur l'élevage de vers à soie mâles (*Bombyx mori*).

LIAO R. *et al.*

Sericultural Station of Nanxi Town, Jinzhai County, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 24-25. (C,e)

Popularizing the checker cocooning frame for cocoon quality improvement.

Popularisation du contrôle des structures d'encabanage pour l'amélioration de la qualité des cocons.

MA X., FEI J., CHENG G.

Huzhou General Station of Sericultural Management, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(1), 5-8. (C,e)

Effect of feeding of nickel chloride on the economic traits of the polyvoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet de l'apport de chlorure de nickel sur les caractéristiques économiques du ver à soie polyvoltin, *Bombyx mori* L.

MAGADUM S.B., HOOLI M.A., MAGDUM V.B.

1997 Res. Bull. Panjab Univ., Sci., Vol. 47(1/4), 135-139. (E)

Studies on the artificial diet of silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes sur l'aliment artificiel du ver à soie, *Bombyx mori* L.

MIAO Y., WU C., XU J.

1999 Zhejiang Nongye Daxue Xuebao, Vol. 25(3), 315-317.

A new method for pebrine detection.

Une nouvelle méthode pour détecter la pébrine.

PRASAD B.C. *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(3), 18-19. (E)

Properties of disinfectants for use in silkworm rearing tools and houses.

Propriétés des désinfectants utilisés pour les outils et les locaux d'élevage de vers à soie.

QIU X., NIE X.

1999 jiaingxi Nongye Daxue Xuebao, Vol. 21(4), 536-539.

Rotary mountage and its advantages.

L'encabanage rotatif et ses avantages.

RAJAN R.K. *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(4), 4-6. (E)

Juvenilomimic compounds for enhanced productivity in silkworm, *Bombyx mori* L. - A screening.

Mimétiques d'hormone juvénile pour augmenter la productivité chez le ver à soie *Bombyx mori* L. Un criblage.

SASHINDRAN NAIR K., VIJAYAN V.A., NAIR J.S., TRIVEDI K.

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

1999 Indian J. Seric., Vol. 38(2), 119-124. (E)

Induction of resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, into a susceptible bivoltine silkworm breed.

Induction de la résistance au virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* chez une race de ver à soie bivoltine sensible.

SEN R., AHSAN M.M., DATTA R.K.

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

1999 *Indian J. Seric.*, Vol. 38(2), 107-112. (E)

How to improve the quality of mulberry silkworm seeds?

Comment améliorer la qualité des graines de vers à soie du mûrier ?

SHAREEF S.N., SEKHARA REDDY D.S.

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

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(4), 16-17. (E)

Effect of different temperature on the growth and development of older larva of three feedings a day.

Effet de différentes températures sur la croissance et le développement de larves âgées, alimentées trois fois par jour.

SHEN Y. *et al.*

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(2), 26-28. (C)

Studies on the fumigant Shennong No 1 for disinfection in silkworm rearing.

Etudes sur le fumigant Shennong No 1 pour la désinfection des élevages de vers à soie.

SHI L. *et al.*

Department of Sericultural Science, Zhejiang University, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(1), 21-24. (C,e)

Relevance of sex-limited silkworm breeds to indian sericulture.

Pertinence des lignées de vers à soie limitées au sexe pour la sériculture indienne.

SINGH R. *et al.*

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

2000 *Indian Silk*, Vol. 39(3), 11-13. (E)

Effect of antibiotic-vitamin mixture on larval, cocoon and reproductive parameters of silkworm, *Bombyx mori*.

Effet du mélange antibiotique-vitamine sur la larve, le cocon et les paramètres reproductifs du ver à soie, *Bombyx mori*.

THIRUVALLUVAN M., NAGENDRAN N.A.

1999 *Geobios*, Vol. 26(4), 205-207. (E)

Effects of Applaud on the growth of silkworm.

Effets de l' Applaud sur la croissance du ver à soie.

VASSARMIDAKI M.E., HARIZANIS P.C., KATSIKIS S.

Laboratory of Sericulture-Apiculture, Agricultural University of Athens, Greece.

2000 *J. Econ. Entomol.*, Vol. 93(2), 290-292. (E)

Silkworm disease incidence and its control.

Incidence des maladies des vers à soie et leur contrôle.

WU P.

Jiaxing Xiuzhou District Sericulture Station, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(4), 46-47. (C,e)

Analysis on the factors affecting one day hatching rate of bluish eggs.

Analyse des facteurs affectant le taux d'éclosion sur un jour des oeufs bleutés.

XIONG C.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 37-38. (C)

Studies on the feeding habit of silkworm (*Bombyx mori* L.) to artificial diet.

Etudes sur les habitudes alimentaires du ver à soie (*Bombyx mori* L.) avec l'aliment artificiel.

XU J. *et al.*

Zhejiang University, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 11-14. (C,e)

Introduction to the characters of a new silkworm race Xue 613 x Chunri for spring rearing.

Caractéristiques d'une nouvelle race de ver à soie Xue 613 x Chunri pour l'élevage de printemps.

YAO S. *et al.*

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 35-36. (C)

Structure of cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori*.

Structure du virus de la polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori*.

YU X. *et al.*

1999 Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao, Vol. 31(5), 563-566.

Toxicity test of new insecticide Dagongchen to *Bombyx mori* silkworm.

Test de toxicité du nouvel insecticide Dagongchen pour le ver à soie *Bombyx mori*.

ZHANG X., WU P.

People's Government of Huangwan, Haining City, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 40-41. (C,e)

Discussion on the standard of entering refrigeration for the spring produced eggs for autumn rearing.

Discussion sur la réfrigération standard des oeufs produits au printemps pour l'élevage d'automne.

ZHU B.

Huzhou Tasang Silkworm Egg Production Station, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(4), 44-45. (C,e)

Relationship between the cocoon reelability and the mounting conditions of checker cocooning frames.

Relation entre la dévidabilité du cocon et les conditions de mise en place des structures d'encabanage.

ZHU L. *et al.*

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

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(2), 7-9. (C,e)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Integration of *Bombyx mori* R2 sequences into the 28S ribosomal RNA genes of *Drosophila melanogaster*.

Intégration des séquences R2 de *Bombyx mori* dans les gènes d'ARN ribosomique 28S de *Drosophila melanogaster*.

EICKBUSH D.G., LUAN D.D., EICKBUSH T.H.

2000 *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 20(1), 213-223. (E)

Tissue/stage-dependent expression of a cloned *Bombyx mandarina* QM homologue.

Expression tissu/stade-dépendante d'un homologue cloné de QM de *Bombyx mandarina*.

HWANG J.S. *et al.*

National Sericulture and Entomology Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, South Korea.

2000 *Biomol. Eng.*, Vol. 16(6), 211-215. (E)

Analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus bro genes.

Analyse des gènes bro du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

KANG W. *et al.*

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 53-55.

Construction of silkworm RAPD molecular linkage map.

Construction d'une carte de liaison moléculaire RAPD de ver à soie.

LI B., LU C., ZHOU Z.Y., XIANG Z.H.

Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing, China.

2000 *I Chuan Hsueh Pao*, Vol. 27(2), 127-132. (C)

Comparison of two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

Comparaison de deux protéines liant l'ADN, DBP et LEF-3, un virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

MIKHAILOV V.S., ZEMSKOV E.A., MAEDA S.

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 45-48.

Germ-line transformation of pink bollworm (*Lepidoptera: Gelechiidae*) mediated by the piggyBac transposable element.

Transformation de la lignée germinale du ver du coton (*Lepidoptera : Gelechiidae*) par l'élément transposable piggyBac.

PELOQUIN J.J., THIBAUT S.T., STATEN R., MILLER T.A.

Department of Entomology, UC Riverside, Riverside, CA, USA.

2000 *Insect Molecular Biology*, Vol. 9(3), 323-333. (E)

Cloning and sequence alignment of EcoR I 1.9kb fragment of silkworm mitochondrial DNA.

Clonage et alignement de séquence du fragment EcoR I de 1.9kb de l'ADN mitochondrial de ver à soie.

SHEN X., ZHAO Q., ZHANG Z., LI Y., HE J.

Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 87-90. (C,e)

Genetic mapping of virus resistances in *Bombyx mori* and *B. mandarina*.

Carte génétique des résistances aux virus chez *Bombyx mori* et *B. Mandarina*.

SHIMADA T.

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 68-71.

Extrachromosomal transposition of the transposable element Minos occurs in the embryos of the silkworm *Bombyx mori*

Transposition extrachromosomique de l'élément transposable Minos dans les embryons du ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMIZU K. *et al.*

Department of Biological Science, Konan University, Kobe, Japan.

2000 *Insect Molecular Biology*, Vol. 9(3), 277-281. (E)

Molecular cloning of feline interferon cDNA by direct expression and its mass production using silkworm.

Clonage moléculaire de l'ADNc d'interféron félin par expression directe et sa production en masse en utilisant le ver à soie.

UEDA Y. *et al.*

1999 *RIKEN Rev.*, Vol. 22, 20-21.

High-level expression of human butyrylcholinesterase gene in *Bombyx mori* and biochemical-pharmacological characteristic study of its product.

Expression importante du gène humain de la butyrylcholinestérase chez *Bombyx mori* et étude des caractéristiques biochimiques et pharmacologiques de ses produits.

WEI W., QIN J., SUN M.

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China.

2000 *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 60(1), 121-126. (E)

Analysis of *Bombyx mori* genome.

Analyse du génome de *Bombyx mori*.

YASUKOCHI Y.

2000 *Kagaku to Seibutsu*, Vol. 38(2), 126-130.

A preliminary study on DNA polymorphism of *Bombyx mandarina* M. in China.

Une étude préliminaire sur le polymorphisme de l'ADN de *Bombyx mandarina* M. en Chine.

YU H., LU C., ZHOU Z., XIANG Z.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 94-98. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Purification and characterization of a major esterase BesB from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation d'une estérase majeure BesB de l'hémolymph du ver à soie, *Bombyx mori*.

ARAI H., OKIDO T., FUJII H., DOIRA H.

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 121-130. (J,e)

Juvenile hormone biosynthesis by *corpora allata* of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin.

Biosynthèse de l'hormone juvénile par le *corpora allata* de la larve du ver de la tomate, *Lacanobia oleracea*, et régulation par l'allatostatin et l'allatotropin de *Manduca sexta*.

AUDSLEY N., WEAVER R.J., EDWARDS J.P.

Central Science Laboratory, Sand Hutton, YO41 1LZ, York, UK.

2000 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30(8-9), 681-689. (E)

Induction of subcellular malic dehydrogenase activity in fat body cells of diapausing pupae of wild tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae).

Induction de l'activité de la déshydrogénase malique subcellulaire dans les cellules du corps adipeux des chrysalides diapausantes du ver à soie tasar sauvage *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae).

CHAUDHURI A., KRISHNAN N., RAY A.K.

2000 *Curr. Sci.*, Vol. 78(2), 179-184. (E)

Some properties of trehalase from pupae of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood.

Des propriétés de la tréhalase des chrysalides de ver à soie muga, *Antheraea assama* Westwood.

CHOUDHURY A., UNNI B.G., MAHANTA H.C.

1999 *Geobios*, Vol. 26(4), 163-166. (E)

Effect of sensory organs extirpating partly on the artificial diet feeding habit of silkworm (*Bombyx mori*).

Effet de la destruction partielle des organes sensoriels sur le comportement alimentaire du ver à soie (*Bombyx mori*) avec aliment artificiel.

CUI W., LI W., HU Z., XU J.

Department of Sericulture, Shandong Agriculture University, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(3), 15-17. (C,e)

NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*.

Caractérisation NMR d'un équilibre dépendant du pH entre deux conformations en solution de la protéine liant la phéromone de *Bombyx mori*.

DAMBERGER F. *et al.*

Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule Honggerberg, Zurich, Switzerland.

2000 Protein Sci., Vol. 9(5), 1038-1041. (E)

Do thyroid hormones function in insects?

Les hormones thyroïdiennes fonctionnent-elles chez les insectes ?

DAVEY K.G.

Department of Biology, York University, M3J 1P3, Toronto, Ontario, Canada.

2000 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 30(8-9), 877-884. (E)

The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask.

Les modes d'action des hormones juvéniles : des questions que nous devons poser.

DAVEY K.G.

Department of Biology, York University, Ontario, M3J 1P3, Toronto, Canada.

2000 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 30(8-9), 663-669. (E)

Effect of thyroxine feeding during the fifth instar on the silkworm development and cocoon production.

Effet de la prise de thyroxine pendant le cinquième stade larvaire sur le développement du ver à soie et la production de cocon.

FAN J., KONG Y., YU J., TANG X., HE F.

Jiaxin Agricultural School, China.

1999 Bulletin of Sericulture, Vol. 30(3), 21-23. (C,e)

Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth.

Le développement central de stimuli à la phéromone sexuelle est régulé par l'hormone juvénile chez un papillon mâle.

GADENNE C., ANTON S.

INRA, Unité de Recherches en Santé Végétale, Centre de Recherches de Bordeaux, BP 81, 33883 cedex, Villenave d'Ornon, France.

2000 J. Insect Physiol., Vol. 46(8), 1195-1206. (E)

Sex linked period gene in the silkworm *Antheraea pernyi*: implication for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes.

Gène lié au sexe chez le papillon *Antheraea pernyi* : implication pour la régulation de l'horloge circadienne et l'évolution des chromosomes sexuels.

GOTTER A.L., LEVINE J.D., REPPERT S.M.

1999 Neuron, Vol. 24(4), 983-965. (E)

Temporal analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the fourth larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse temporelle de l'activité ecdystéroïdogène des glandes prothoraciques pendant le quatrième stade larvaire chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

GU S., WEN-HSIEN T., CHOW Y.

Department of Zoology, National Museum of Natural Science, 1 Kuan Chien Road, Taichung, Taiwan.

2000 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 30(6), 499-505. (E)

Effect of BmNPV infection on the digestive enzyme activity in the silkworm, *Bombyx mori* L.
Effet de l'infection au BmNPV sur l'activité de l'enzyme digestif chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.
GURURAJ C.S., SEKHARAPPA B.M., SARANGI S.K.

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

1999 *Indian J. Seric.*, Vol. 38(2), 102-106. (E)

Identification of [Arg(7)] corazonin in the silkworm, *Bombyx mori* and the cricket, *Gryllus bimaculatus*, as a factor inducing dark color in an albino strain of the locust, *Locusta migratoria*.
Identification de la corazonine [Arg(7)] chez le ver à soie, *Bombyx mori* et chez le criquet, *Gryllus bimaculatus*, comme un facteur induisant la couleur noire chez une souche albinos du criquet, *Locusta migratoria*.

HUA Y. *et al.*

Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericultural and Entomological
Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(6), 853-860. (E)

Ecdysteroid stimulates virus transmission in larvae infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

Des ecdystéroïdes stimulent la transmission virale chez des larves de *Bombyx mori* infectées avec le
virus de la polyédrose.

KANG K.D. *et al.*

2000 *J. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(1), 63-68. (E)

Filamentous actin is required for lepidopteran nucleopolyhedrovirus progeny production.

L'actine filamenteuse est nécessaire à la production de nucléopolyédrovirus de lépidoptères.

KASMAN L.M., VOLKMAN L.E.

Department of Plant and Microbial Biology, University of California, 251 Koshland Hall, Berkeley,
CA 94720-3102, USA.

2000 *J. Gen. Virol.*, Vol. 81(7), 1881-1888. (E)

Estradiol-17beta in *Bombyx mori*: possible significance and its effect on silk production.

La 17-beta estradiole chez *Bombyx mori*: signification possible et effets sur la production de soie.

KESHAN B., RAY K.

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

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(6), 1061-1068. (E)

Biological activity of two juvenoids and two ecdysteroids against three stored product insects.

Activité biologique de deux juvénoides et deux ecdystéroïdes contre trois insectes des produits
stockés.

KOSTYUKOVSKY M., CHEN B., ATSMI S., SHAAYA E.

Department of Stored Products, ARO, the Volcani center, 50250, Bet Dagan, Israël.

2000 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30(8-9), 891-897. (E)

**The synthesis of (2x,4E)-3-methyldeca-2,4-dienoic acid ethyl ester, a regulator of the growth
and development of the larvae of silkworm, *Bombyx mori*.**

La synthèse de l'ester éthylique de l'acide (2x,4E)-3-méthyldéca-2,4-dienoïque, un régulateur de
croissance et de développement chez la larve de ver à soie, *Bombyx mori*.

KUKOVINETS O.S. *et al.*

1999 *Bioorg. Khim.*, Vol. 25(10), 797-798.

Alkene ozonolysis and the study of reactions of polyfunctional compounds. 61/ New synthetic route to bombykol, pheromone of mulberry silkworm.

Ozonolyse et étude des réactions des composés polyfonctionnels. 61/ Nouvelle voie synthétique du bombykol, phéromone du ver à soie du mûrier.

KUKOVINETS O.S. *et al.*

1999 *Russ. J. Org. Chem.*, Vol. 35(8), 1156-1159.

Method of establishment of dot-ELISA for protein component detection from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Méthode dot-ELISA pour la détection de composants protéiques du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

LI W. *et al.*

1999 *Weishengwu Zazhi*, Vol. 19(3), 5-6.

Hemolysis of enterococci isolated from intestine of the silkworm, *Bombyx mori*.

Hémolyse d'entérocoques isolés à partir de l'intestin de ver à soie, *Bombyx mori*.

LU X., JIN W.

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

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(2), 15-17. (C,e)

Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkmoth species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*.

Trois protéines fixant la phéromone dans les sensilles olfactives chez deux espèces de papillons de vers à soie, *Antheraea polyphemus* et *Antheraea pernyi*.

MAIDA R., KRIEGER J., GEBAUER T., LANGE U., ZIEGELBERGER G.

Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen, Germany.

2000 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 267(10), 2899-2908. (E)

Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*.

Le glucose stimule la délivrance de bombyxine, un peptide voisin de l'insuline, chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

MASUMURA M., SATAKE S., SAEGUSA H., MAZOGUCHI A.

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya. 464-8602, Japan.

2000 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 118(3), 393-399. (E)

Protective role of uric acid against photooxidative stress in the silkworm, *Bombyx mori*.

Rôle protecteur de l'acide urique contre le stress de photo-oxydation chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

MATSUO T., ISHIKAWA Y.

1999 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 34(4), 481-484. (E)

Expression of ecdysteroid-regulated-genes is reduced specifically in the wing disk of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*.

L'expression des gènes régulés par l'ecdystéroïde est spécifiquement réduite dans le disque allaire chez le mutant sans ailes (fl) de *Bombyx mori*.

MATSUOKA T., FUJIWARA H.

2000 *Dev. Genes Evol.*, Vol. 210(3), 120-128. (E)

Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes.

Activation et fragmentation de la delta-endotoxine de *Bacillus thuringiensis* par des concentrations élevées d'enzymes protéolytiques.

PANG A.S., GRINGORTEN J.L., BAI C.

Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste Marie, ON, Canada.

1999 *Can. J. Microbiol.*, Vol. 45(10), 816-825. (E)

Differentiation of brain neurosecretory cells depending on ecdysteroid content of hemolymph during 5th instar larval stage of silkworm, *Bombyx mori*.

Différentiation des cellules neurosécrétrices du cerveau dépendant de la teneur en ecdystéroïde de l'hémolymphe pendant le cinquième stade larvaire du ver à soie, *Bombyx mori*.

PARLAK O., UNAL G.

1999 *Turk. J. Zool.*, Vol. 23(supp.2), 733-737.

Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*.

Purification et clonage moléculaire de protéines chimiosensorielles de *Bombyx mori*.

PICIMBON J.F. *et al.*

Institut für Physiologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany.

2000 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 44(3), 120-129. (E)

Effect of thyroxine on the nitrogenous end product of silkworm *Bombyx mori* L.

Effet de la thyroxine sur les produits finaux azotés du ver à soie *Bombyx mori* L.

RANI P.P., BHARATI D.

1999 *Philipp. J. Sci.*, Vol. 128(2), 145-150.

Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*.

Métabolisme des hydrates de carbone pendant le jeûne chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SATAKE S., KAWABE Y., MIZOGUCHI A.

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.

2000 *Arch. Insect Biochem.*, Vol. 44(2), 90-98. (E)

Occurrence of ommochrome-containing pigment granules in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*.

Présence de granules contenant de l'ommochrome dans le système nerveux central du ver à soie, *Bombyx mori*.

SAWADA H., NAKAGOSHI M., MASE K., YAMAMOTO T.

Biological Laboratory, Center for Natural Science, Kitasato 1-15-1, Sagami-hara City, 228-8555, Kanagawa, Japan.

2000 *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol. 125(3), 421-428. (E)

Carotenoids in the lipophorin of the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli* and the silkworm, *Bombyx mori*.

Caroténoïdes dans les lipophorines du ver de la patate douce, *Agrius convolvuli* et du ver à soie, *Bombyx mori*.

SHIRAI K., KANEKATSU R., KIGUCHI K.

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

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 131-138. (J,e)

Regulation of vitellogenesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

Régulation de la vitellogénèse chez la chenille de leucanie, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae).

SORGE D., NAUEN R., RANGE S., HOFFMAN K.H.

Bayer AG, Agrochemicals Division, Research Insecticides, D-51368, Leverkusen, Germany.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(6), 969-976. (E)

Genetic control of non specific esterases in the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.).

Contrôle génétique des estérases non spécifiques chez le ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.).

STOIKOVA T.

1997 *Nauchni Tr.-Plovdivski Univ. "Paisii Khilendarski"*, Vol. 33(6), 67-71.

Sensing of sex pheromone by *Bombyx mori*.

Détection de phéromone sexuelle par *Bombyx mori*.

SUGAWARA F.

2000 *Kagaku to Seibutsu*, Vol. 38(5), 320-321.

Synthesis of 2,2-diphenylpropionate derivatives and their effects on larval growth of the silkworm.

Synthèse des dérivés 2,2-diphenylpropionate et leurs effets sur la croissance larvaire du ver à soie.

TOYONURA N., KIM I.H., YOSHIDA T., SHIOTSUKI T., KUWANO E.

Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

2000 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 64(3), 610-612. (E)

Differential synthesis of storage proteins by various fat body tissues during development of female silkworm *Bombyx mori*.

Synthèse différentielle des protéines de stockage par divers tissus du corps adipeux de la femelle du ver à soie *Bombyx mori*, pendant le développement.

VANISHREE V., NIRMALA X., KRISHNAN M.

1999 *SAAS Bull. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 12, 69-89. (E)

Preparation of complex amino acids with silkworm pupa protein.

Préparation de complexes d'acides aminés avec des protéines de chrysalides de vers à soie.

WU J., CHEN J., MA J.

1999 *Shipin Kexue*, Vol. 20(9), 32-34.

Preparation of peptide from silkworm pupa protein with enzymic hydrolysis.

Préparation de peptides à partir de protéines de chrysalides de vers à soie par hydrolyse enzymatique.

XIONG Y., WANG H., CHEN H., YANG Y.

1999 *Hubei Dexue Xuebao, Ziran Kexueban*, Vol. 21(3), 287-290.

Expression of prophenoloxidase mRNA during silkworm hemocyte development.

Expression d'ARNm prophénoloxydase pendant le développement de l'hémocyte du ver à soie.

YAMAMOTO K. *et al.*

Laboratory of Protein Chemistry and Engineering, Kyushu University Graduate School of Bioresource Sciences, Fukuoka, Japan.

2000 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 64(6), 1197-1202. (E)

Neuroendocrine regulation of seasonal morph development in a bivoltine race (Daizo) of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Régulation neuroendocrinienne du développement saisonnier chez une race bivoltine (Daizo) de ver à soie, *Bombyx mori* L.

YAMANAKA A., TSURUMAKI J., ENDO K.
2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(5), 803-808. (E)

Response of the silkworm *Bombyx mori* to the addition of pteroylglutamic acid in synthetic diet. II-The distribution of tetrahydropteroylglutamic acid, methyl-tetrahydropteroylglutamic acid, and formyl-tetrahydropteroylglutamic acid in silkworm organs

Réponse du ver à soie, *Bombyx mori*, à l'addition d'acide ptéroylglutamique dans l'aliment artificiel. II- Distribution des acides tétrahydroptéroylglutamique, méthyl-tétrahydroptéroylglutamique et formyl-tétrahydroptéroylglutamique dans les organes.

ZHANG J., HUANG L., HAYAKAWA T., TSUGE H.

United Graduate School of Agricultural Sciences, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 91-96. (J,e)

Response of the silkworm, *Bombyx mori* to the addition of pteroylglutamic acid in synthetic diet. I- Essentiality of pteroylglutamic acid for larval growth and its distribution in larva and pupa bodies.

Réponse du ver à soie, *Bombyx mori* à l'addition d'acide ptéroylglutamique dans l'aliment artificiel. I- Nécessité de l'acide ptéroylglutamique pour la croissance larvaire et distribution dans le corps des larves et des chrysalides.

ZHANG J., HUANG L., HAYAKAWA T., TSUGE H.

United Graduate School of Agricultural Sciences, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 83-89. (J,e)

Structure of chitin and its derivatives and hydrolysis susceptibility by chitinase.

Structure de la chitine et de ses dérivés et sa sensibilité à l'hydrolyse par la chitinase.

ZHANG M., INUI H., HAGA A., HIRANO S.

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

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 97-103. (J,e)

Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: implications for life history traits.

Effet de la température et de la photopériode sur la biosynthèse de l'hormone juvénile et la maturation sexuelle chez le ver du coton, *Helicoverpa armigera*.

ZHOU X., COLL M., APPLEBAUM S.W.

Department of Entomology, The Hebrew University of Jerusalem, PO Box 12, 76100, Rehovot, Israël.

2000 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 30(8-9), 863-868. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

The influence of high temperature during embryonic period on growth and development and some economic characters of silkworm *Bombyx mori* L.

L'influence de la forte température pendant la période embryonnaire sur la croissance et le développement et les caractères économiques du ver à soie, *Bombyx mori* L.

CHEN P., ZHU Y., LU C., XIANG Z.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 75-80. (C,e)

Studies on the role of estrogen in reproduction in silkworm, *Bombyx mori* L. (race Nistari).

Etudes sur le rôle de l'oestrogène dans la reproduction chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. (Nistari). DAS S.

India.

1995 *PhD, Univ. of Calcutta*.

Sorbitol as an arrester of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Le sorbitol comme élément d'arrêt du développement embryonnaire des oeufs diapausants chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

HORIE Y., KANDA T., MOCHIDA Y.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(6), 1009-1016. (E)

Effects of heavy ions microbeams on embryogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*: morphological changes of the nuclei and cells after spot irradiation.

Effets des microfaisceaux d'ions lourds sur l'embryogenèse chez le ver à soie, *Bombyx mori* : changements morphologiques nucléaires et cellulaires après irradiation.

KIGUCHI K. *et al.*

1999 *J.A.E.R.I. Rev.*, Vol. 99(025), 53-55. (E)

Cloning and structural analysis of chorion Hc genes in *Bombyx mandarina*.

Clonage et analyse structurale des gènes Hc du chorion chez *Bombyx mandarina*.

KIL J.K. *et al.*

1999 *Korean J. Genetics*, Vol. 21(1), 49-57.

Sperm/DNA interaction: DNA binding proteins in sperm cell of silkworm *Bombyx mori*.

Intéraction sperme/ADN : protéines liant l'ADN dans les cellules du sperme du ver à soie *Bombyx mori*.

SHAMILA Y., MATHAVAN S.

Department of Genetics, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, India.

2000 *Mol. reprod. Dev.*, Vol. 56(2), 289-291. (E)

A study on biochemistry factors of occurrence of unfertilized eggs of silkworm.

Une étude sur des facteurs biochimiques d'obtention d'oeufs non fécondés de ver à soie.

SIMA Y., ZHONG S., LING J.

College of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

2000 *Canye Kexue*, Vol. 26(2), 71-74. (C,e)

Comparative studies of ecdysteroid metabolism between diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes comparatives du métabolisme de l'ecdystéroïde entre les oeufs diapausants et les oeufs non-diapausants du ver à soie, *Bombyx mori*.

SONOBE H. *et al.*

1999 *Zool. Sci.*, Vol. 16(6), 935-943. (E)

Artificial insemination using cryopreserved sperm in the silkworm, *Bombyx mori*.

Insémination artificielle utilisant le sperme cryoconservé chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

TAKEMURA Y., KANDA T., HORIE Y.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(4), 491-497. (E)

Characterization and stage-specific change of proteins during the embryonic development of silkworm *Bombyx mori*.

Caractérisation et changements spécifiques de l'âge des protéines pendant le développement embryonnaire du ver à soie *Bombyx mori*.

ZHONG B.X.

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

1999 *I Chuan Hsueh Pao*, Vol. 26(6), 627-633. (C)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Analyses of amino acid composition of silk glands in *Araneus diadematus*.

Analyses de la composition en acides aminés des glandes séricigènes chez *Araneus diadematus*.

CAO M., XIE J., CHEN P., CHEN W.

1999 *Shengming Kexue Yanjiu*, Vol. 3(2), 138-142.

Response of silk gland to estradiol 17-b in silkworm, *Bombyx mori* L. (Race Nistari).

Réponse de la glande séricigène à la 17-b oestradiol chez le ver à soie *Bombyx mori* L. (Race Nistari).

KESHAN B.

India.

1999 *PhD, Univ. of Calcutta*.

Estradiol 17-b in *Bombyx mori*: possible significance and its effect on silk production.

La 17-b oestradiol chez *Bombyx mori* : signification possible et effets sur la production de soie.

KESHAN B., RAY A.K.

2000 *J. Insect Physiol.*, Vol. 46(6), 1061-1068. (E)

Spider genes reveal flexible design.

Les gènes d'araignée révèlent une organisation flexible.

STOKSTAD E.

2000 *Science*, Vol. 287(5457), 1378. (E)

Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene.

Organisation fine du gène de la chaîne lourde de fibroïne de *Bombyx mori*.

ZHOU C.Z. *et al.*

Institut de Génétique et Microbiologie, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université Paris-Sud,
91405 Orsay Cedex, France.

2000 *Nucleic Acids Res.*, Vol. 28(12), 2413-2419. (E)

Soie

Silk

Structure and dynamics of silk fibroin studied with ^{13}C , ^{15}N and ^2H solid state NMR.

Structure et dynamique de la fibroïne de soie étudiée par NMR à l'état solide de ^{13}C , ^{15}N et ^2H .

ASAKURA T. *et al.*

2000 *Polym. Mater. Sci. Eng.*, Vol. 82, 145. (E)

Morphology of silk filaments after calcium-salt treatment.

Morphologie des filaments de soie après traitement au sel de calcium.

CHEN Y., SHENG J., HU., ZHANG J.

1999 *Fangzhi Xuebao*, Vol. 20(3), 140-142, 183.

Complex formation of silk fibroin with poly(acrylic acid).

Formation de complexes de fibroïne de soie avec des poly-acides acryliques.

GAO Q. *et al.*

2000 *Polym. J.*, Vol. 32(3), 269-274.(E)

Rheological study on aqueous solution of silk fibroin extracted from the middle division of *Bombyx mori* silkworm.

Etude rhéologique sur solution aqueuse de fibroïne de soie extraite à partir de la division centrale du ver à soie *Bombyx mori*.

HOSSAIN K.S., NEMOTO N., MAGOSHI J.

1999 *Nihon Reorogi Gakkaishi*, Vol. 27(2), 129-130.

Study on Berensu (Prussian Blue) deteriorating silk fibers of Edo-period Kosode.

Etude sur la détérioration des fibres de soie de la période Edo par Berensu (Bleu de Prusse).

ITO A., SINKAI T., SUGISITA R.

1999 *Bunkazai Hazon Shufuku Gakkaishi*, Vol. 43, 47-58.

Physiological functions of buckwheat protein and sericin as resistant proteins.

Fonctions physiologiques d'une protéine de blé noir et de la séricine comme protéines résistantes.

KATO N. *et al.*

2000 *Nippon Eyo, Shokuryo Gakkaishi*, Vol. 53(2), 71-75.

Influence of a structural transformation of fibroin molecules on the morphological dynamics of the jet-fiber transition.

Influence d'une transformation structurelle des molécules de fibroïne sur la dynamique morphologique de la transition bave-fibre.

KHOLMUMINOV A.A. *et al.*

1999 *Chem. Nat. Compd.*, Vol. 35(4), 477-478. (E)

Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk.

Transition bêta et séparation de phase induites par le stress lors du filage de la soie d'araignée.

KNIGHT D.P., KNIGHT M.M., VOLLRATH F.

Department of Zoology, South Parks Road, OX1 3PS, Oxford, UK.

2000 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 27(3), 205-210. (E)

Characterization of six polypeptides of 1.9-2.8 kDa isolated from cocoons of the silkworm, *Bombyx mori*.

Caractérisation de 6 polypeptides de 1,9 à 2,8 kDa isolés à partir des cocons du ver à soie, *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M., SUZUKI M., HIRANO H.

The Silk Science Research Institute of the Dainippon Raw Silk Foundation, Hyakunincho 3-25-1, Shinjuku-ku, 169-0073, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 153-158. (J,e)

Preparation of silk fibroin-chitosan membranes and the effect on macrophages.

Préparation des membranes de chitosan-fibroïne de soie et leurs effets sur les macrophages.

NAKAMURA T. *et al.*

1999 *Sen i Gakkaishi*, Vol. 55(8), 639-375.

Mechanical properties of single-brin silkworm silk.

Propriétés mécaniques de la soie simple-brin de ver à soie.

PEREZ-RIGUEIRO J. *et al.*

2000 *J. Appl. polym. Sci.*, Vol. 75(10), 1270-1277. (E)

Regenerated spider silk: processing, properties and structures.

Soie d'araignée régénérée : traitement, propriétés et structures.

SEIDEL A. *et al.*

2000 *Macromolecules*, Vol. 33(3), 775-780. (E)

A comparative study of physical properties of mulberry and tasar silk fabrics.

Une étude comparative des propriétés physiques des tissus de soie tasar ou de mûrier.

SHARMA I.C., MUKHOPADHYAY A., SINHA P.K.

1999 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 24(3), 193-196. (E)

Molecular deformation in spider dragline silk subjected to stress.

Déformation moléculaire chez la soie de la toile d'araignée soumise au stress.

SIRICHAISIT J., YOUNG R.J., VOLLRATH F.

1999 *Polymer* 2000, Vol. 41(3), 1223-1227. (E)

Formation of spherulites of wild silk fibroin.

Formation de sphérulites de fibroïne de soie sauvage.

TANAKA T. *et al.*

2000 *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, Vol. 41(1), 272. (E)

Hierarchical assembly of fibrous proteins.

Assemblage hiérarchique de protéines fibreuses.

VALLUZZI R. *et al.*

1999 *Annu. Tech. Conf. - Soc. Plast. Eng.*, Vol. 57(2), 2178-2179. (E)

Solid-state NMR determination of the secondary structure of *Samia cynthia ricini* silk.

Détermination par NMR à l'état solide de la structure secondaire de la soie de *Samia cynthia ricini*.

VAN BEEK J.D. *et al.*

Laboratory for Physical Chemistry, ETH Zürich, CH-8092 Zürich, Switzerland.

2000 *Nature*, Vol. 405(6790), 1077-1079. (E)

Comparative studies on some physical and mechanical properties of mulberry silk filament.

Etudes comparatives de quelques propriétés physiques et mécaniques du filament de soie.

VASUMATHI B.V. *et al.*

1999 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 24(3), 157-171. (E)

Spider dragline silk.

Soie de toile d'araignée.

WARNER S.B., POLK M., JACOB K.

1999 *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys.*, Vol. C39(4), 643-653. (E)

Structure and deterioration of silk fabrics of the edo period.

Structure et détérioration des tissus de soie de la période Edo.

YANAGI Y., KONDO Y., HIRABAYASHI K.

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

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(2), 105-109. (J,e)

Relationship between the cocon wrinkles and cocoon reelability.

Relation entre la dévidabilité et la rugosité du cocon.

YANG M., ZHU L., YAO J., MIN S.

Department of Sericultural Science, Zhejiang University, China.

1999 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 30(4), 27-29. (C,e)

Study on medicine release and antibacterial effects of medical fibroin membrane.

Etude sur le relargage de médicaments et les effets antibactériens d'une membrane de fibroïne.

ZHANG Y. *et al.*

1999 *Fangzhi Xuebao*, Vol. 20(6), 328-330.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4^{ème} édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Seric. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

* * *