

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)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / Italy)
SHIMURA K. (Japon / Japan)
SHIRATA A. (Japon / Japan)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / India)
SONWALKAR T.N. (Inde / India)
TAKAHASHI R. (Brésil / Brazil)
TAZIMA Y. (Japon / Japan)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / Czech Republic)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / China)
YAMASHITA O. (Japon / Japan)
YANAGAWA H. (Japon / Japan)

SOMMAIRE - CONTENTS

Articles scientifiques / Scientific papers

- Electrophoretic analysis of nonspecific esterases in silkworm (*Bombyx mori* L.) fat body during ontogenesis** 1
 Analyse électrophorétique des estérases non spécifiques du corps gras chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.) pendant l'ontogénèse 15
 T. A. STOYKOVA
- Breeding of new germplasms of silkworm (*Bombyx mori*) resistant to Zhenjiang (China) strain of densovirus (DNV-Z)** 21
 Obtention de nouvelles lignées de vers à soie (*Bombyx mori*) résistants à la souche Zhenjiang (Chine) du virus de la densovirose (DNV-Z) 29
 CHEN KEPING, LI MUWANG, YAO QING, LIN SHENYU & HOU CHENGXIANG
- Transgression of shell weight – a multigenic trait, through development of congenic breed in tropical silkworm, *Bombyx mori* L.** 33
 Amélioration du poids de la coque, un caractère multigénique, par la mise au point d'une lignée congénique chez le ver à soie tropical, *Bombyx mori* L. 43
 G. K. CHATTOPADHYAY, A. K. SENGUPTA, A. K. VERMA, S. K. SEN & B. SARATCHANDRA
- A comparative study on the metabolic rates in the pupae of the three voltine varieties of the tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury** 47
 Etude comparative des taux de métabolisme chez les nymphes de trois variétés à voltinisme différent chez le ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* Drury 53
 S. SATAPATHY & A. MITTRA
- Evaluation of combining ability in hybrids between low, medium and high cocoon weight polyvoltine and bivoltine breeds of silkworm, *Bombyx mori* L.** 57
 Evaluation de l'aptitude à la combinaison chez les hybrides entre les lignées de vers à soie *Bombyx mori* L. polyvoltines et bivoltines à poids de cocon faible, moyen et élevé 65
 RAVINDRA SINGH, D. RAGHAVENDRA RAO, V. PREMALATHA, B. K. KARIAPPA, K. P. JAYASWAL & R. K. DATTA
- Morpho-anatomical and pollen studies in mulberry germplasm** 69
 Etudes morpho-anatomiques et du pollen chez le mûrier 77
 A. TIKADER & A. ANANDA RAO

Rapports techniques / Technical reports

- Fabrication and evaluation of silkworm egg transportation boxes** 81
 Fabrication et évaluation de boîtes pour transporter les œufs de vers à soie 87
 VINOD B. MATHUR, VINEET KUMAR, G. P. SINGH & R. K. DATTA

Use of banana leaf as rearing bed and cover during young age silkworm, <i>Bombyx mori</i> Linn. rearing	91
Utilisation de la feuille de banane comme litière et couverture pendant l'élevage des premiers âges du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> Linn	97
G. P. SINGH, VINEET KUMAR & R. K. DATTA	
Indirect organogenesis through stem callus in mulberry variety Berhampore local	101
Organogénèse indirecte par des cals de la tige chez la variété de mûrier Berhampore locale	105
M. N. SRINIVASA, H. M. REVANASIDDAIAH, M. C. GAYATRI & R. KAVYASHREE	
Analysis of divergence in mulberry species through different clustering techniques	109
Analyse de la divergence chez les espèces de mûrier par différentes techniques de regroupement	117
A. TIKADER & A. ANANDA RAO	
The spiralling whitefly, <i>Aleurodicus dispersus</i> Russel (Homoptera : Aleyrodidae), a pest of mulberry in Karnataka	121
L'aleurode, <i>Aleurodicus dispersus</i> Russel (Homoptère : Aleyrodidae), un insecte nuisible au mûrier dans le Karnataka	129
M. GEETHA BAI, B. MARIMADAIAH, K. C. NARAYANASWAMY & T. RAMEGOWDA	
Note brève / Brief note	
A new record of <i>Dendrophthoe</i> spp. on mulberry plant and its infestation by <i>Delias eucharis</i> (Drury)	135
Signalement de <i>Dendrophthoe</i> spp. sur des plants de mûrier et de son infestation par <i>Delias eucharis</i> (Drury)	137
CHALUVACHARI, U. D. BONGALE, M. KRISHNA, R. S. MALLIKARJUNAPPA, M. S. ESWAR RAO & M. GEETHABAI	
Bibliographic / Bibliography	139
Sériciculture générale / General sericulture	140
Mûrier / Mulberry	143
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	147
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	150
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	151
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	153
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	154
Soie / Silk	155

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF NONSPECIFIC ESTERASES IN SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) FAT BODY DURING ONTOGENESIS

T. A. STOYKOVA

"Paisii Hilendarski" University of Plovdiv, Department of Genetics, Plovdiv 4000, Bulgaria.

Nonspecific esterases in silkworm fat body were investigated by means of electrophoresis using polyacrylamide and starch gels. Studies were made on the esterase spectra of sixteen races and eight inter-race hybrids during ontogenesis. The expression of ten loci was observed. The polymorphism of two loci was assumed. There was a tendency for gene expression dynamics during ontogenesis.

Key words : *Bombyx mori* L., electrophoresis, fat body esterases.

INTRODUCTION

Tissue and stage specificity of various isoenzymes in silkworm have been studied (Eguchi, 1968 ; Takeda *et al.*, 1990, 1993 ; Sugimoto *et al.*, 1992 ; Takashi *et al.*, 1996 ; Nagaoka *et al.*, 1997 ; Popov *et al.*, 1999). Most of them have been made on the esterases (Eguchi and Sugimoto, 1965 ; Eguchi and Yoshitake, 1966, 1967 ; Eguchi and Iwamoto, 1975 ; Krishnamutry *et al.*, 1984 ; Xu and Song, 1987 ; He, 1995 ; Raju and Krishnamurthy, 1995 ; Krishnamurthy and Umakanth, 1997 ; Stoykova *et al.*, 1998, 1999). Stage specificity of fat body esterases has not been properly investigated. Some data were described by Eguchi and Sugimoto (1965) ; Minina and Filippovich (1974) ; Egorova *et al.* (1977). In the present paper, data from more detailed investigations on the specificity of fat body esterases in different races and hybrids during ontogenesis are described and discussed.

MATERIALS AND METHODS

Using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and starch gels 800 specimens from different families of sixteen races designated as 19, 20, B 517, T106, T108, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, P14, P15, Tashkent 12, Tashkent 15, Tashkent 16 as well as the F1 inter-race hybrids P14×P15, P15 × P14, M1×M2, UK17×UK19, UK19×UK17, UK18×UK20 and UK20×UK18 have studied in different generations (years). The esterase spectra were estimated at different ontogenetic stages : second ; third ; fourth and fifth larval instars ; spinning period ; pupae 1-2, 5-6 and 8-10 day ; and imago. Individual samples as well as mixed ones from equalized number of specimens per race or hybrid were used for second, third and fourth larval instars. Only individual samples were used during later developmental stages.

The fat body was isolated through dissection, rinsed with distilled water, squashed with quartz sand in 0,8 M tris-phosphate buffer at pH=6,7 - for PAGE, or in distilled water - for starch gel electrophoresis, and left for extraction for 18 hours at 4°C. Then the samples were centrifuged for 45 minutes at 5000 rpm before PAGE and for 30 minutes at 4000 rpm before electrophoresis in starch gel. The fat body extracts were analysed for total protein concentration by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as a standard as follows : second instar - 0,2 µg/µl for individual

samples, 4,0 µg/µl for mixed samples ; third instar - 0,25 µg/µl for individual samples, 5,0 µg/µl for mixed samples ; fourth instar - 1,05 µg/µl for individual samples, 9,0 µg/µl for mixed samples ; fifth instar - 2,2 µg/µl for individual samples ; spinning period - 4,0 µg/µl for individual samples ; pupae 1-2 day, 5-6 day - 11,3 µg/µl for individual samples ; pupae 8-9 day - 5,0 µg/µl for individual samples ; imago - 2,8 µg/µl for individual samples. 10 µl of each sample being applied into the gel.

The electrophoretic separation involved using :

1. Polyacrylamide vertical gels, 6 % ; 6,5 % ; 7,5 % and 10 % (pH=8,9) at 4,5 mA/cm for 3 hours, together with concentrating gels (3,3 %) at pH=6,7, and 0,05 M tris-0,2 M glycine electrode buffer, at pH=8,3 ; and

2. Starch horizontal gels, 13 % at 2,5 mA/cm for 5 hours, 0,05 M tris-EDTA-borate gel buffer, at pH=8,1 and 0,3 M sodium-borate electrode buffer at pH=8,9 (Smithies, 1955, modified by Dobrovolov, 1973).

The nonspecific esterases were visualized in :

1. 1 M phosphate buffer at pH=7,0 by PAGE. 1- and 2-naphthylacetate were used as substrates and Fast Blue BB salt as a dye. The stained plates were fixed in a 14 % trichloroacetic acid for 2 hours and stored in 7 % acetic acid.

2. 1,1 M tris-chloride buffer at pH=8,0 by starch gel electrophoresis. 1- and 2- naphthylacetate were added as substrates and Fast red TR salt as a dye. The starch plates were differentiated in 5 % acetic acid.

RESULTS

1. PAGE:

A total of twelve fat body esterase bands were observed by 7,5 % PAGE at various ontogenetic stages of tested breed and hybrids. They were designated as FBES A, FBES B, FBES C, FBES D, FBES E, FBES F, FBES G, FBES H1, FBES H2, FBES H3, FBES I and FBES J1 (Fig. 1).

In mixed samples of the second instar fat body, FBES A, FBES B, FBES E and FBES I were detected. FBES A and FBES E were the most intensively stained at this period. Fraction FBES I was also clearly visible, though being diffusion (Fig. 2.). FBES B - was very weak. The lack of this esterase band from the individual spectrum of silkworm fat body was probably due to the very low concentration. The rest esterase bands were very slight.

In mixed samples of the third instar fat body, FBES D, FBES F and FBES G were visualized in addition. The last two fractions were very weak. In the individual spectrum FBES A, FBES B, FBES D, FBES E, FBES G and FBES I were also slightly seen, most intensive being FBES E and FBES I. All the rest esterase fractions were difficult to be proved by taking pictures, because of their weak appearance (Fig. 3.). The lack of FBES F from the individual spectrum was probably due to the very low concentration as well.

In mixed and individual samples of the fourth instar fat body, FBES A, FBES B, FBES D, FBES E, FBES F, FBES G and FBES I were expressed.

In individual spectrum of the fifth instar (1-3 day and 4-7 day) we visualized the bands described in the previous period. FBES D, FBES E, FBES F and FBES I were clear and intensive (Fig. 4.). A single band - FBES J1 - with varying intensity, was detected in some specimens from some races and hybrids in the fat body from the fifth larval instar to imago.

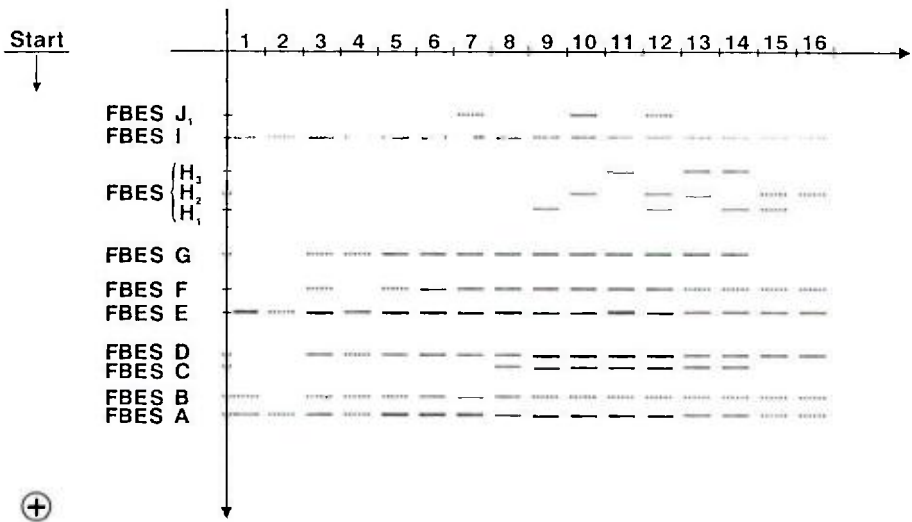


Fig. 1

Fig. 1. Esterase spectra of silkworm fat body in PAGE and changes in ontogenesis :

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

Fig. 1. Spectre estérase dans le corps gras du ver à soie obtenu par PAGE et changements au cours de l'ontogénèse :

1-2 - 2^{ème} âge larvaire; 3-4 - 3^{ème} âge larvaire; 5 - 4^{ème} âge larvaire; 6 - 5^{ème} âge larvaire 1-3 jours; 7 - 5^{ème} âge larvaire 4-7 jours; 8 - larve pendant le filage; 9-10 chrysalide 1-2 jours; 11-12 - chrysalide 5-6 jours; 13-14 chrysalide 8-10 jours; 15-16 imago; 1 et 3 mélanges; 2, 4, 5 + 16 individus.

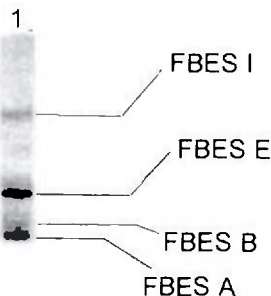


Fig. 2. Esterase spectra of silkworm fat body in 7.5 % PAGE, 2nd larval instar : 1 - M1, mixed probes.

Fig. 2. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 7,5 %, 2^{ème} âge larvaire : 1 - M1, mélanges.

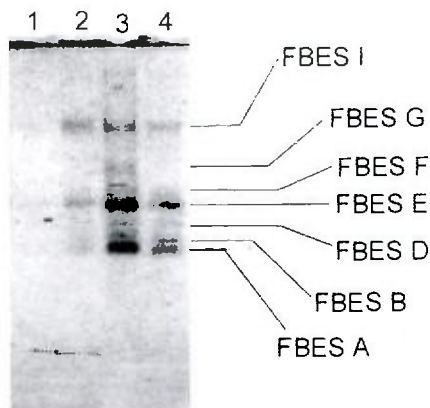


Fig. 3. Esterase spectra of silkworm fat body in 7.5 % PAGE, 3rd larval instar: 1-2 - P15×P14 ; 3 - T108 ; 4 - M1 ; 1 - individual probes ; 2 ÷ 4 - mixed probes.

Fig. 3. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 7,5 %, 3^{ème} âge larvaire ; 1-2- P15×P14 ; 3 - T108 ; 4 - M1 ; 1 - individus ; 2 ÷ 4 mélanges.

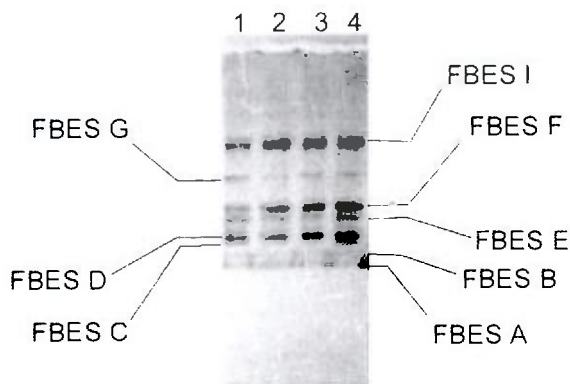


Fig. 4. Esterase spectra of silkworm fat body in 7.5 % PAGE, 5th larval instar (2,3) and spinning period (1,4): 1-2 - T106 ; 3-4 - T108.

Fig. 4. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 7,5 %, 5^{ème} âge larvaire (2,3) et période de filage (1,4) : 1-2 - T106 ; 3-4 - T108.

In the spinning period, FBES C began to be visualized (Fig. 4.). This fraction was very strong through the first half of the pupae period.

The expression of FBES H1, FBES H2 and FBES H3, started from the pupae 1-2 day. These slight bands could be seen in pairs, or separately, in the individual esterase spectrum of various breeds and hybrids. From the beginning of the pupae stage to the pupae 5-6 day - FBES A, FBES C, FBES D, FBES E, FBES F and FBES G - were very strong and intensive (Fig. 5.). FBES B was slightly seen. FBES J1 was visualized in some individual spectra (Fig. 6a and 6b.).

All fat body esterases became weaker in the end of the pupation - pupae 8-10 day (Fig. 7.).

In the spectrum of imago fractions, FBES A, FBES B and FBES H1, FBES H2 and FBES H3 were very weak, and for that reason, it was difficult to be proved. FBES C and FBES G were absent. The most intensive visually were the esterase bands from the spectrum of the spinning larvae and pupae from 1-2 day to 5-6 day.

We specified differences between breeds regarding : expression and combination of the fractions FBES H1, FBES H2 and FBES H3 ; and presence and absence of the fraction FBES J1, which are the

reasons for the differences observed between F1 hybrids (Table I). In all investigated generations of UK 20 we visualized FBES H1 only ; in 19, 20, M2, Tashkent 12, Tashkent 15, P14×P15, P15×P14, M1×M2, M2×M1, UK18×UK20 and UK20×UK18 - we visualized FBES H1 and FBES H2 - separately, or in combination ; in T106, M1, UK17, UK19, Tashkent 16, UK17×UK19, UK19×UK17 - we observed a total of three bands FBES H1, FBES H2 and FBES H3 - separately, or in various combinations, in pairs. In the successive generations of P14, P15, B517, T108 and UK18, we determined differences regarding the expression and combination of the fractions of the zone FBES H (Table I). In all analyzed generations of 19, M1, M2, Tashkent 15, as well as, M1×M2 and M2×M1, in the spectra of some specimens, we visualized the fraction FBES J1, with varying intensity ; in P14, 20, B517, T108, UK17, UK20, Tashkent 12, Tashkent 16, P14×P15, UK17×UK19, UK19×UK17, UK18×UK20 and UK20×UK18 - we did not detect that band. In the successive generations of P15, T106, UK19, UK18, as well as, of P15×P14 - we observed differences regarding the expression of FBES J1 (Table I).

The comparative electrophoretic analysis in 6 %, 6.5 %, 7.5 %, and 10 % polyacrylamide gel indicated that, the most appropriate for examination of the fat body esterase spectrum, is the separation in 7.5 % gel. By lower concentration, some of the esterase bands expressed themselves as diffusions, and the bands of the zones FBES H and FBES I bring together, and it is difficult to be separated one from another (especially in 6 % gel) (Fig. 6b). In 10 % gel - fractions FBES C and FBES D are probably merged and, by that reason, could not be distinguished as two separate ones, but one intensive band is observed in the respective zone ; fractions FBES A, FBES B, FBES G are missing (Fig. 8.). For that reason, 10 % PAGE is also ineffective for investigation of the fat body esterase spectrum of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L., although under separation in 10 % gel, it is observed an effect of better concentration of some of the esterase bands (for example FBES I), in view of what they are more distinct.

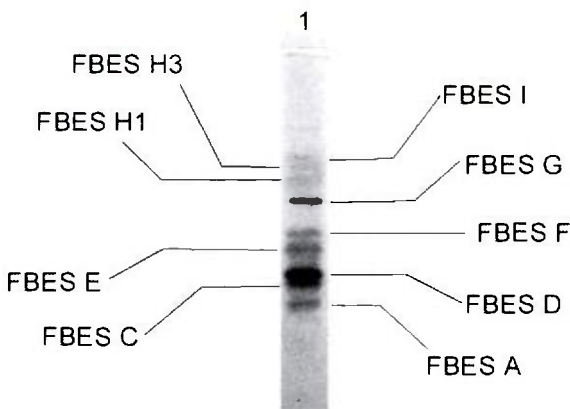


Fig. 5. Esterase spectra of silkworm fat body in 7.5 % PAGE, pupae 1-2 day : 1 - UK19.

Fig. 5. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 7,5 %, chrysalide 1-2 jours : 1 -UK19.

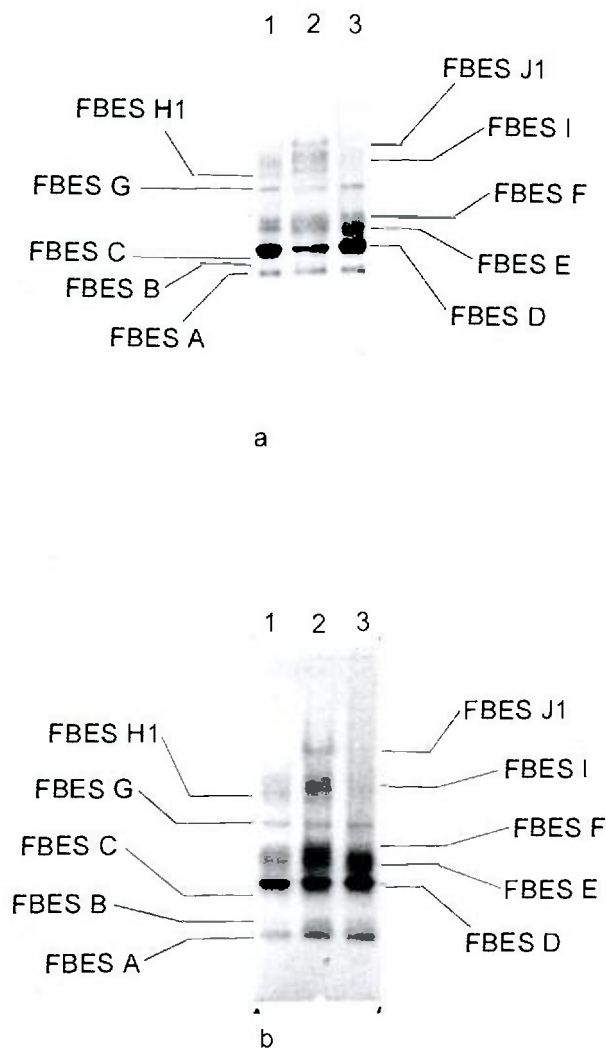


Fig. 6. Esterase spectra of silkworm fat body in 7.5 % PAGE, (a) and 6 % PAGE (b), pupae 5 - 6 day : 1 - T108 ; 2 - 3 - M1×M2.

Fig. 6. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 7,5 % (a) et à 6 % (b), chrysalide 5-6 jours: 1 - T108 ; 2-3 M1×M2.

2. Starch gel :

A total of five esterase bands with anode mobility were detected at various stages by the starch gel electrophoresis : FBES As, FBES Bs, FBES Cs, FBES Ds, FBES Es (Fig. 9.).

No esterase fractions were visualized in the individual and mixed fat body extracts of the second instar. In the mixed samples of larvae of the third instar, FBES As was seen very weakly. This esterase fraction was lacking from the individual spectra, probably, for the very low concentration (Fig. 10).

In mixed and individual extracts of the fourth instar fat body, FBES As was observed - very slight in the individual extracts.

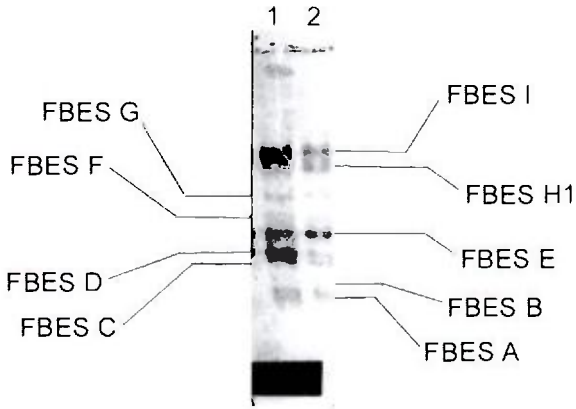


Fig. 7. Esterase spectra of silkworm fat body in 6.5 % PAGE, pupae 8-10 days : 1-2 - UK18.

Fig. 7. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 6,5 %, chrysalide 8-10 jours : 1-2 - UK18.

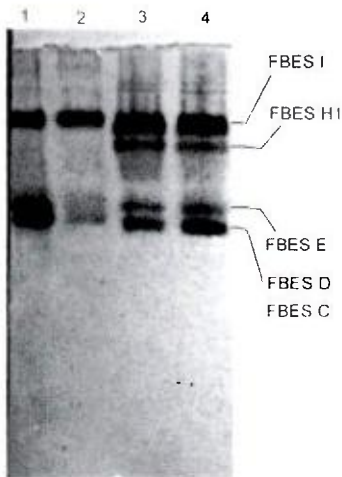


Fig. 8. Esterase spectra of silkworm fat body in 10 % PAGE, 5th larval instar (1,2) and pupae 8-10 day (3,4) : 1-2 - T108 ; 3-4 - P14.

Fig. 8. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur PAGE à 10 %, 5^{ème} âge larvaire (1,2) et chrysalide 8-10 jours (3,4) : 1-2 - T108 ; 3-4 - P14.

In the fifth instar (1-3 day and 4-7 day), FBES Cs began to be visualized. This esterase was very weak, and therefore it was difficult to be registered.

In the spinning period FBES As, FBES Bs, FBES Cs, and FBES Ds were expressed.

Through that method of electrophoresis, we visualized the greatest number of esterase fractions at the stage of pupae (1-2 day and 5-6 day) as well. In that period, FBES As, FBES Bs, FBES Cs, FBES Ds and FBES Es were visualized. Most intensive was FBES As. All the other fractions were weaker and with a diffusion expression (Fig. 10). FBES Ds and FBES Es were very slightly seen.

Table I. Esterase phenotypes of FBES H1-3 and FBES J1 bands : (-) - absent expression ; (+) - expression

Tableau I. Phénotypes estérase des bandes FBES H1-3 et FBES J1 : (-) - expression absente ; (+) - expression

Breeds and hybrids	Generation (year)	Esterase bands / Bandes estérase			
		FBES H			
		FBES H1	FBES H2	FBES H3	FBES J1
<i>Lignées et hybrides</i>	<i>Génération (année)</i>				
P14	1997	+	+	-	-
	1998	+	+	-	-
	1999	-	+	-	-
P15	1997	+	+	-	+
	1998	+	-	-	+
	1999	+	-	-	-
19	1997	+	+	-	+
	1998	+	+	-	+
	1999	+	+	-	+
20	1997	+	+	-	-
	1998	+	+	-	-
	1999	+	+	-	-
B517	1997	-	-	+	-
	1998	+	-	+	-
	1999	+	-	+	-
T106	1998	+	+	+	+
	1999	+	+	+	-
T108	1997	+	-	-	-
	1998	+	+	+	-
	1999	+	-	+	-
M1	1997	+	+	+	+
	1998	+	+	+	+
	1999	+	+	+	+
M2	1998	+	+	-	+
	1999	+	+	-	+
UK17	1998	+	+	+	-
	1999	+	+	+	-
UK19	1998	+	+	+	+
	1999	+	+	+	-

Table I. (continued).

Tableau I. (Suite).

Breeds and hybrids	Generation (year)	Esterase bands / Bandes estérase			
		FBES H			
		FBES H1	FBES H2	FBES H3	FBES J1
<i>Lignées et hybrides</i>	<i>Génération (année)</i>				
UK18	1998	+	+	-	+
	1999	-	+	-	-
UK20	1998	+	-	-	-
	1999	+	-	-	-
Tashkent 12	1999	+	+	-	-
Tashkent 15	1999	+	+	-	+
Tashkent 16	1998	+	+	+	-
P14×P15	1997	+	+	-	-
	1998	+	+	-	-
P15×P14	1997	+	+	-	+
	1998	+	+	-	-
	1999	+	+	-	-
M1×M2	1999	+	+	-	+
M2×M1	1999	+	+	-	+
UK17×UK19	1999	+	+	+	-
UK19×UK17	1999	+	+	+	-
UK18×UK20	1999	+	+	-	-
UK20×UK18	1999	+	+	-	-

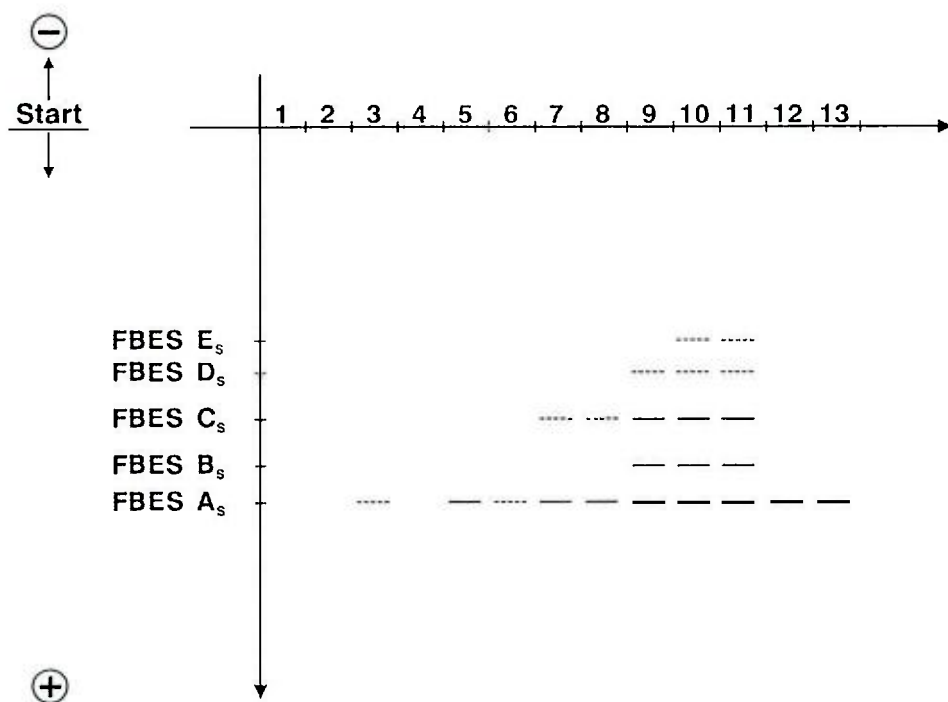


Fig. 9. Esterase spectra of silkworm fat body in starch gel and changes in ontogenesis :

1-2 - 2nd larval instar ; 3-4 - 3rd larval instar ; 5-6 - 4th larval instar ; 7 - 5th larval instar 1-3 day ; 8 - 5th larval instar 4-7 day ; 9 - spinning larvae ; 10 - pupae 1-2 day ; 11 - pupae 5-6 day ; 12 - pupae 8-10 day ; 13 - imago ; 1, 3 and 5 - mixed probes ; 2, 4, 6 et 13 individual probes.

Fig. 9. Spectre esterase du corps gras du ver à soie sur un gel d'amidon et changements au cours de l'ontogénèse :

1-2 - 2^{ème} âge larvaire ; 3-4 - 3^{ème} âge larvaire ; 5-6 - 4^{ème} âge larvaire ; 7 - 5^{ème} âge larvaire 1-3 jours ; 8 - 5^{ème} âge larvaire 4-7 jours ; 9 - larve pendant le filage ; 10 - chrysalide 1-2 jours ; 11 - chrysalide 5-6 jours ; 12 - chrysalide 8-10 jours ; 13 - imago ; 1, 3 et 5 mélanges ; 2, 4, 6 et 13 - individus.

The FBES A_s fraction was visualized only in the fat body spectrum of pupae 8-10 day and imago (Fig. 9.).

No esterase fractions with cathode mobility were detected in the fat body spectra.

No sex related differences were observed by PAGE and by starch gel electrophoresis either.

DISCUSSION

The results of our study by PAGE suggest that the nonspecific esterases in the silkworm fat body were probably coded by ten loci : Fbes A, Fbes B, Fbes C, Fbes D, Fbes E, Fbes F, Fbes G, Fbes H, Fbes I, Fbes J. Products of five of them were visualized by starch gel electrophoresis as well.

Three fractions were observed in the zones FBES H (FBES H1, FBES H2 and FBES H3). Their combined presence in some electrophoretic spectra support the hypothesis of a triallele codominant

polymorphism - Fbes H1, Fbes H2, and Fbes H3). In the spectra of the different genotypes homozygous and heterozygous, a total of three bands were expressed separately, or in combination, in pairs. Only one band is situated in the spectra of some specimens, in the zones FBES J (FBES J1). Its varying intensity and its absence from some individual spectra may indicate the incidence of biallele polymorphism with a 'null' allele (FBES Jo). In the spectra of the 'null' homozygous the esterase activity in the zone FBES J is missing, and in the spectra of heterozygous - the fraction FBES J1 is weaker. The rest esterase loci were monomorphic in the studied races and F1 hybrids of *Bombyx mori* L.

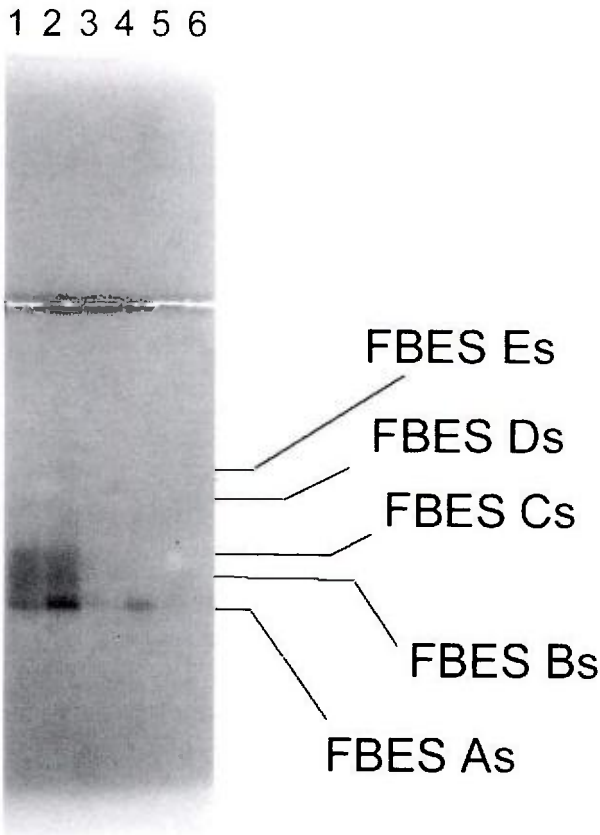


Fig. 10. Esterase spectra of silkworm fat body in 13 % starch gel, 3rd larval instar (6), 4th larval instar (5), 5th larval instar (3,4), pupae 1-2 day (2), pupae 5-6 day (1) : 1-5 - P15×P14; 6-P14, individual probes.

Fig. 10. Spectre estérase du corps gras du ver à soie sur gel d'amidon à 13 % , 3^{ème} âge larvaire (6), 4^{ème} âge larvaire (5), 5^{ème} âge larvaire (3,4), chrysalide 1-2 jours (2), chrysalide 5-6 jours (1) : 1-5 - P15×P14 ; 6 - P14, individus.

The differences, observed between breeds, regarding the expression of the fractions of the zones FBES H and FBES J, are probably a result from the different origin. The differences in FBES H1, FBES H2, FBES H3 and FBES J1 phenotypes between successive generations of the same breed are probably caused by the selection that was carried out. Through the elimination of specimens with undesired biotechnological characteristics it is possible to eliminate a given allele from the gene-pool of a single generation. As a result of this the corresponding phenotype will be missing in the next generation of the breed. This is the probable reason for the esterase phenotype differences observed between successive generations of one and the same breed.

The results obtained by us differ from these obtained by Eguchi and Sugimoto (1965), who, by means of thin-layer electrophoresis in the agar gel, visualized six esterase isoenzymes in the fat body spectrum. These differences are probably a consequence of the utilization of different electrophoresis techniques, and the investigation of breeds with different origin. Egorova *et al.* (1977), ascertained polymorphism of the esterase isoenzymes from the different mulberry silkworm tissues, including from the fat body, what corresponds to the polymorphism assumed by us.

There was a tendency for gene expression dynamics during ontogenesis. The latter is in agreement with the findings of Eguchi and Sugimoto (1965). FBES C, FBES D, FBES F, FBES G and FBES J1 manifested stage specificity. The expression of fractions FBES H in the fat body spectrum was also stage-specific.

Observed distinctness and intensity of the esterase fractions in the spectra of spinning larvae and pupae for 1-2 day to 5-6 day, proving indirectly an increased esterase activity in the fat body during that period of the ontogenesis, is probably connected with the cell functional activity of the fat body during the larva - pupa transformation period. During the larval development (the period of active feeding), in the trophocytes, forming the fundamental mass of cells in the fat body, there are synthesized plasma and basic substances (proteins, carbohydrates and fats). These substances are used during the endogenetic nutrition period - in the course of the processes, connected with metamorphosis at the pupae stage, as well as, for sustaining the adult life and for normal functioning of its tissues and organs during the imago period. Kutuzova *et al.* (1985), proved the existence of the hormonal, genetically determined induction of the fat body esterases of *Bombyx mori* L.

Comparing the results, obtained through electrophoresis in a polyacrylamide gel and in a starch gel, we can conclude that by PAGE, it is visualized a greater number of esterase fractions, and with better distinctness. We consider that PAGE as more appropriate for examination of nonspecific esterases in mulberry silkworm fat body.

REFERENCES

- DOBROVOLOV I. (1973). Micro starch gel electrophoresis. Proc. of the Inst. of Oceanography and Fisheries, Varna, 12, 157-162 (in Bulgarian).
- EGOROVA T., VASSILEVA L., SANKINA T., NASIRILLAIEV U., PHILLIPPOVICH Y. (1977). Enzymatic activity of soluble proteins in different silkworm races (*Bombyx mori* L.). J. Gen. Biology, 38, 3, 447-463 (in Russian).
- EGUCHI M. (1968). Changes in zymograms of some dehydrogenases and hydrolases in several organs of the silkworm *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera: Bombycidae*) during metamorphosis., Appl. Ent. and Zool., 3 (4), 189-197.
- EGUCHI M., SUGIMOTO T. (1965). Changes in esterase zymograms in the silkworm, *Bombyx mori* L. During development. J. Ins. Physiol., 11, 1145-1149.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1966). Genetic studies on isozymes of the integument esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan J. Genetics, 41 (4), 267-273.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1967). Relationship of nonspecific esterase zymograms in different tissues. J. Sericult. Sci. Japan, 36 (3), 193-198.
- EGUCHI M., IWAMOTO A. (1975). Changes in protease, esterase and phosphatases in the alimentary canal of the silkworm during metamorphosis, Insect Biochem., 5, 495-507.

- HE J.L. (1995). Studies on the inheritance of a deletion type of the blood esterase isoenzymes in the silkworm *Bombyx mori* L., *Sericologia*, 35, 1, 17-24.
- KRISHNAMURTHY N., RAMESH S., RAJASEKARASETTY M. (1984). Developmental profiles in the isozymes of α and β -esterases in the embryogenesis of silkworm *Bombyx mori*, *Curr. Sci. (India)*, 53, 5, 281-284.
- KRISHNAMURTHY N., UMAKANTH R. (1997). Contribution of esterase isozymes during mating in silkworm *Bombyx mori*, *Indian-Journal of Sericultural*, 36 : 1, 11 - 16; 29 ref.
- KUTUZOVA N., SHAMSHINA T., GOLUBEVA E., TISHTENKO G., HEIPHETZ A. (1985). Hormonal regulation of activity of acid phosphatase and esterase in silkworm fat body. *Biochemistry of Insects*, 71 - 79 Moscow (in Russian).
- LOWRY O., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275.
- MINIMA M., PHILLIPPOVICH Y. (1974). Multiple forms of ferments and regulation of their activity in the tissues of the silkworm *Bombyx mori* L. in the process of ontogenesis. *Ann. Moscow Pedagog. Inst.* 16, 9 - 90 (in Russian).
- NAGAOKA S., SUGIMOTO Y., YARA M., KOGA K. (1997). Changes in the activities of aldolase and other enzymes for carbohydrate metabolism during embryonic and postembryonic development of *Bombyx mori*., *Arch. Insect Biochem. and Physiol.*, 36 (2), 139 - 148.
- POPOV P., STOYKOVA T., DIMITROV B. (1999). Genetic control, tissue and stage specificity of superoxide dismutases in the silkworm (*Bombyx mori*), *Cytobios*, 100, 111-118.
- RAJU P., KRISHNAMURTHY N. (1995). Ontogenetic differentiation of alpha and beta esterase in univoltine, bivoltine and trimoultar races of silkworm, *Annals of Tropical Research (Philippines)*, 17 (1 - 4), 45 - 53.
- SMITHIES O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels. *Biochem. J.*, 61, 4, 626 - 641.
- STOYKOVA T., POPOV P., GREGOV D., PANAYOTOV M. (1998). Genetic control of nonspecific esterases in mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) silk glands during ontogenesis, *Sericologia*, 38 (2), 237 - 242.
- STOYKOVA T., POPOV P., GREKOV D. (1999). Electrophoretic analysis of nonspecific esterases in silkworm (*Bombyx mori* L.) male genital organs during ontogenesis, *Sericologia*, 39 (4), 515 - 523.
- SUGIMOTO Y., NISHIMURA F., KUSAKABE T., NAGAOKA S., HORI K., KOGA K. (1992). Interchange in the type of aldolases during embryogenesis *Bombyx mori*., *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 61(2), 165 - 171.
- TAKASHI S., YAMAMOTO Y., ZHAO X., WATABE S. (1996). *Bombyx* acid cysteine proteinase. *Invertebrate Reproduction and Development*, 30 (1 - 3), 265 - 281.
- TAKEDA S., AZUMA M., EGUCHI M. (1990). Alkaline phosphatase isozymes of the silkworm midgut : Polymorphism in the enzyme activity, antigen and electroforetogram., *J. Seric. Sci., Jpn.*, 56 (2), 127 - 134.
- TAKEDA S., AZUMA M., ITHO M., EGUCHI M. (1993). The strain difference and analysis of polymorphic nature of membrane-bound alkaline phosphatase in the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*., *Comp. Biochem. Physiol.*, 104 B (1), 81 - 89.
- XU J., SONG H. (1987). A study on esterase isozyme of silkworm (*Bombyx mori*) embryo, *Sericologia*, 27 (2), 309 - 314.

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES ESTERASES NON SPECIFIQUES DU CORPS GRAS CHEZ LE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) PENDANT L'ONTOGENESE

T. A. STOYKOVA

"Paisii Hilendarski", University of Plovdiv, Department of Genetics, Plovdiv 4000, Bulgarie.

On a analysé les estérases non spécifiques dans le corps gras du ver à soie par électrophorèse en utilisant des gels de polyacrylamide et d'amidon. Les études portent sur les spectres des estérases de seize races et huit hybrides inter-races pendant l'ontogénèse. On observe l'expression de 10 loci. On constate un polymorphisme pour deux loci. Il y a une tendance à une dynamique d'expression des gènes pendant l'ontogénèse.

INTRODUCTION

La spécificité des tissus et des stades de plusieurs iso-enzymes a été étudiée chez le ver à soie (Eguchi, 1968 ; Takeda et coll., 1990, 1993 ; Sugimoto et coll., 1992 ; Takashi et coll., 1996. Nagaoka et coll., 1997 ; Popov et coll., 1999). La plupart des études ont eu lieu sur les estérases (Eguchi et Sugimoto, 1965 ; Eguchi et Yoshitake, 1966, 1967 ; Eguchi et Iwamoto, 1975 ; Krishnamurthy et coll., 1984 ; Xu et Song, 1987 ; He, 1995 ; Raju et Krishnamurthy, 1995 ; Krishnamurthy et Umakanth, 1997 ; Stoykova et coll., 1998, 1999). La spécificité des estérases du corps gras en fonction du stade n'a pas été vraiment étudiée. Certaines données ont été présentées par Eguchi et Sugimoto (1965) ; Minina et Filippovich (1974) ; Egorova et coll., (1977). Dans cet article, les données provenant de recherches plus détaillées sur la spécificité des estérases du corps gras pendant l'ontogénèse chez différentes races et hybrides sont décrites et discutées.

MATERIELS ET METHODES

Huit cent spécimens de différentes familles de seize races désignées comme 19, 20, B 517, T106, T108, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, P14, P15, Tashkent 12, Tashkent15, Tashkent 16 ainsi que les hybrides F1 inter-races P14 × P15, P15 × P14, M1 × M2, UK 17 × UK19, UK19 × UK17, UK18 × UK20 et UK20 × UK18 ont été étudiés pendant différentes générations (années) en utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et des gels d'amidon. Les spectres estérase sont estimés pendant différents stades ontogéniques : second, troisième, quatrième et cinquième âges larvaires ; période de filage ; nymphes de 1 à 2 jours, 5 à 6 jours et 8 à 10 jours ; et imago. Des échantillons individuels ainsi que des échantillons mélangés d'un nombre égal de spécimens par race ou hybride sont utilisés pour les deuxième, troisième et quatrième âges larvaires. Seuls des échantillons individuels sont utilisés pendant les derniers stades du développement.

Le corps gras est isolé par dissection, rincé avec de l'eau distillée, écrasé avec du sable de quartz dans un tampon trisphosphate à 0,8 M au pH de 6, 7 pour la PAGE ou dans de l'eau distillée pour l'électrophorèse sur gel d'amidon et laissé en extraction pendant 18 heures à 4° C. Puis les échantillons sont centrifugés pendant 45 minutes à 5000 tpm avant la PAGE et pendant 30 minutes à 4000 tpm avant l'électrophorèse sur gel d'amidon. Les extraits du corps gras sont analysés par rapport à la

concentration en protéines totales d'après la méthode de Lowry et coll., (1951) avec de l'albumine de serum de bovin comme référence, de la manière suivante :

- deuxième âge – 0,2 µg / µl pour les échantillons individuels, 4 µg / µl pour les échantillons mixtes ;
 - troisième âge – 0,25 µg / µl pour les échantillons individuels, 5 µg / µl pour les échantillons mélangés ;
 - quatrième âge – 1,05 µg / µl pour les échantillons individuels, 9 µg / µl pour les échantillons mélangés ;
 - cinquième âge – 2,2 µg / µl pour les échantillons individuels ;
 - période de filage – 4 µg / µl pour les échantillons individuels ;
 - nymphes 1 à 2 jours, 5 à 6 jours – 11,3 µg / µl pour les échantillons individuels ;
 - nymphes de 8 à 9 jours – 5 µg / µl pour les échantillons individuels ;
 - imago – 2,8 µg / µl pour les échantillons individuels.
- 10 µl de chaque échantillon est appliqué dans le gel.

La séparation électrophorétique comprend l'utilisation de :

1. Gels verticaux de polyacrylamide à 6 % ; 6,5 % ; 7,5 % et 10 % (pH = 8,9) à 4,5 mA/cm pendant 3 heures, avec des gels de concentration (3,3 %) au pH de 6,7 et un tampon d'électrode tris-glycine 0,2 M à 0,05 M, au pH de 8,3.

2. Des gels horizontaux d'amidon, 13 % à 2,5 mA/cm pendant 5 heures, un tampon de gel tris-borate - EDTA à 0,05 M au pH de 8,1 et un tampon d'électrode de borate de sodium à 0,3 M au pH de 8,9 (Smithies, 1955, modifié par Dobrovolsky, 1973).

Les estérases non-spécifiques sont visualisées dans :

1. un tampon phosphate 1 M au pH de 7 par PAGE. Du naphthylacetate 1 et 2 est utilisé comme substrat et du sel Fast Blue BB comme colorant. Les plaques colorées sont fixées dans l'acide trichloroacétique à 14 % pendant 2 heures et stockées dans de l'acide acétique à 7 %.

2. un tampon tris-HCl 1,1 M au pH de 8 pour électrophorèse sur gel d'amidon. Du naphthylacétate 1 et 2 est ajouté comme substrat et du sel Fast Red TR comme colorant. Les plaques d'amidon sont décolorées dans de l'acide acétique à 5 %.

RESULTATS

1. PAGE :

Un ensemble de douze bandes estérase du corps gras est observé par PAGE à 7,5 % à plusieurs stades chez les lignées et les hybrides testés. Elles sont désignées FBES A, FBES B, FBES C, FBES D, FBES E, FBES F, FBES G, FBES H1, FBES H2, FBES H3, FBES I et FBES J1 (Fig. 1).

Chez les échantillons mélangés du corps gras du deuxième âge, on peut détecter FBES A, FBES B, FBES E et FBES I. FBES A et FBES E sont les plus intensément colorées pendant cette période. La fraction FBES I est aussi clairement visible, bien qu'elle soit diffuse (Fig. 2). FBES B est très faible. L'absence de cette bande estérase dans les spectres individuels du corps gras du ver à soie est probablement due à la concentration très faible. Les autres bandes estérase sont très légères.

Chez les échantillons mélangés du corps gras du 3^{ème} âge, on peut en plus visualiser FBES D, FBES F et FBES G. Les deux dernières fractions sont très faibles. Dans le spectre individuel, on peut aussi légèrement voir FBES A, FBES B, FBES D, FBES E, FBES G et FBES I, les plus intenses étant FBES E et FBES I. Tout le reste des fractions estérases est difficile à prouver en prenant des photos,

parce que leur coloration est faible (Fig. 3). L'absence de FBES F du spectre individuel est probablement aussi due à la très faible concentration.

Chez les échantillons mélangés et individuels du corps gras du quatrième âge, FBES A, FBES B, FBES D, FBES E, FBES F, FBES G et FBES I s'expriment.

Dans le spectre individuel du cinquième âge (1 à 3 jours et 4 à 7 jours) nous visualisons les bandes décrites pendant la période précédente. FBES D, FBES E, FBES F et FBES I sont claires et intenses (Fig. 4). Une bande unique – FBES J1 – à l'intensité variée, est détectée chez certains spécimens de certaines races et hybrides dans le corps gras du cinquième âge à l'imago.

Pendant la période de filage, on peut commencer à visualiser FBES C (Fig. 4). Cette fraction est très forte pendant la première moitié de la période nymphale.

L'expression de FBES H1, FBES H2 et FBES H3, commence chez les pupes de 1 à 2 jours. Ces bandes légères peuvent être vues en paires, ou séparément, dans le spectre individuel de plusieurs lignées et hybrides. Du début du stade nymphal jusqu'à ce que les nymphes soient âgées de 5 à 6 jours FBES A, FBES C, FBES D, FBES E, FBES F et FBES G sont très fortes et intenses (Fig. 5). On voit légèrement FBES B. FBES J1 est visualisée dans certains spectres individuels (Fig. 6a et 6b).

Toutes les estérases du corps gras deviennent plus faibles à la fin de la pupaison, c'est à dire quand les nymphes ont entre 8 et 10 jours (Fig. 7).

Dans le spectre des fractions de l'imago, FBES A, FBES B et FBES H1, FBES H2 et FBES H3 sont très faibles, et pour cette raison, elles sont difficiles à prouver. FBES C et FBES G sont absentes. Celles qui sont le plus intenses visuellement sont les bandes estérase du spectre des larves qui filent et des nymphes de 1 à 2 jours et de 5 à 6 jours.

Nous avons remarqué des différences entre les lignées à propos de : l'expression et de la combinaison des fractions FBES H1, FBES H2 et FBES H3 ; et la présence et l'absence de la fraction FBES J1, qui sont les raisons pour lesquelles on observe des différences entre les hybrides F1 (Tableau I). Chez toutes les générations de UK20, nous ne visualisons que FBES H1 ; chez 19, 20, M2, Tashkent 12, Taskent 15, P14 × P15, P15 × P14, M1 × M2, M2 × M1, UK18 × UK20 et UK20 × UK18 – nous visualisons FBES H1 et FBES H2 séparément ou ensemble ; chez T106, M1, UK17, UK19, Tashkent 16, UK17 × UK19, UK19 × UK17 – nous observons un total de trois bandes FBES H1, FBES H2 et FBES H3 – séparément ou en combinaisons variées, en paires. Chez les générations successives de P14, P15, B517, T108 et UK18, nous constatons des différences à propos de l'expression et de la combinaison des fractions de la zone FBES H (Tableau I). Chez toutes les générations analysées de 19, M1, M2, Tashkent 15 ainsi que, de M1 × M2 et M2 × M1, dans le spectre de certains spécimens nous visualisons la fraction FBES J1 avec une intensité variée ; chez P14, 20, B517, T108, UK17, UK20, Tashkent 12, Tashkent 16, P14 × P15, UK17 × UK19, UK19 × UK17, UK18 × UK20 et UK20 × UK18 – nous n'avons pas détecté cette bande. Chez les générations suivantes de P15, T106, UK19, UK18 ainsi que chez P15 × P14, nous observons des différences à propos de l'expression de FBES J1 (Tableau I).

L'analyse électrophorétique comparative dans des gels de polyacrylamide à 6 %, 6,5 %, 7,5 % et 10 % indique que, pour l'examen du spectre estérase du corps gras, la séparation dans un gel à 7,5 % est la plus appropriée. Avec une concentration plus faible, certaines des bandes estérase sont diffuses et les bandes des zones FBES H et FBES I se chevauchent, et il est difficile de les séparer l'une de l'autre (surtout dans un gel à 6 %) (Fig. 6b). Dans un gel à 10 %, les fractions FBES C et FBES D sont probablement mêlées et pour cette raison, ne peuvent pas être distinguées comme deux fractions séparées, mais on observe une bande intense dans la zone respective : les fractions FBES A, FBES B, FBES G sont absentes, (Fig. 8). Pour cette raison, la PAGE 10 % est aussi inefficace pour étudier le spectre estérase du corps gras du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L., bien qu'avec une séparation dans un gel à 10 %, on observe un effet de meilleure concentration de certaines bandes estérases (par exemple FBES I), de sorte qu'elles sont plus distinctes.

2. Gel d'amidon :

On détecte un total de cinq bandes estérases avec une mobilité anodique à des stades variés avec l'électrophorèse sur gel d'amidon : FBES As, FBES Bs, FBES Cs, FBES Ds, FBES Es (Fig. 9).

On ne visualise pas de fractions estérase dans les extraits du corps gras individuels et mélangés du deuxième âge. Chez les échantillons mélangés du 3^{ème} âge, on voit très faiblement FBES As. Cette fraction estérase est absente du spectre individuel, probablement à cause de la très faible concentration (Fig. 10).

Dans les extraits mixtes et individuels du corps gras du quatrième âge, on observe que FBES As est très légère dans les extraits individuels.

Au 5^{ème} âge (1 à 3 jours et 4 à 7 jours), FBES Cs commence à être visualisée. Cette estérase est très faible, et il est donc difficile de l'observer.

Pendant la période de filage FBES As, FBES Bs, FBES Cs et FBES Ds s'expriment.

Avec cette méthode d'électrophorèse, nous visualisons le plus grand nombre de fractions estérase au stade nymphal (1 à 2 jours et 5 à 6 jours). Pendant cette période, on visualise FBES As, FBES Bs, FBES Cs, FBES Ds et FBES Es. La plus intense est FBES As. Toutes les autres fractions sont plus faibles et avec une expression diffuse (Fig. 10). FBES Ds et FBES Es peuvent être vues très légèrement.

La fraction FBES As ne peut être visualisée que dans le spectre du corps gras des nymphes de 8 à 10 jours et de l'imago (Fig. 9).

On ne détecte pas de fractions estérase à mobilité cathodique dans le spectre du corps gras.

On n'observe pas de différence liée au sexe avec la PAGE ni avec l'électrophorèse sur gel d'amidon.

DISCUSSION

Les résultats de notre étude par PAGE suggèrent que les estérases non spécifiques dans le corps gras du ver à soie sont probablement codées par dix loci : Fbes A, Fbes B, Fbes C, Fbes D, Fbes E, Fbes F, Fbes G, Fbes H, Fbes I, Fbes J. Les produits de cinq d'entre eux sont aussi visualisés par une électrophorèse sur gel d'amidon.

Ces fractions sont observées dans les zones FBES H (FBES H1, FBES H2 et FBES H3). Leur présence combinée dans certains spectres électrophorétiques soutient l'hypothèse d'un polymorphisme codominant triallélique – (Fbes H1, Fbes H2 et Fbes H3). Dans le spectre des différents génotypes homozygotes et hétérozygotes, un ensemble de trois bandes s'exprime séparément, ou en combinaison, ou en paires. Une bande unique est observée dans le spectre de certains spécimens dans les zones FBES J (FBES J1). Son intensité variable et son absence de certains spectres individuels pourrait indiquer l'incidence d'un polymorphisme bialléle avec un allèle nul (FBES Jo). Dans le spectre de l'homozygote nul, l'activité estérase dans la zone FBES J manque, et dans le spectre de l'hétérozygote – la fraction FBES J1 est plus faible. Le reste des loci estérase sont monomorphiques dans les races étudiées et chez les hybrides F1 de *Bombyx mori* L.

Les différences, observées entre les lignées, à propos de l'expression des fractions des zones FBES H et FBES J, résultent probablement de leur origine différente. Les différences chez les phénotypes FBES H1, FBES H2, FBES H3 et FBES J1 entre les générations successives de la même lignée viennent probablement de la sélection qui a été entreprise. Il est possible d'éliminer un allèle donné du pool génique d'une génération unique grâce à l'élimination des spécimens aux caractéristiques biotechnologiques indésirables. Il en résulte que le phénotype correspondant manquera dans la génération suivante de la lignée. C'est sûrement la raison qui explique les différences de phénotype des estérases observées entre les générations successives d'une même lignée.

Les résultats que nous avons obtenus diffèrent de ceux obtenus par Eguchi et Sugimoto (1965) qui, au moyen d'une électrophorèse en couche mince sur un gel agar, ont visualisé six iso-enzymes estérases dans le spectre du corps gras. Ces différences sont probablement la conséquence de

l'utilisation de différentes techniques d'électrophorèse et de l'étude de lignées d'origine différente. Egorova et coll. (1977) ont établi le polymorphisme des iso-enzymes estérases de différents tissus du ver à soie du mûrier, y compris du corps gras, qui correspond au polymorphisme que nous avons présumé.

Il y a une tendance à une dynamique d'expression des gènes pendant l'ontogenèse. Cela correspond aux observations d'Eguchi et Sugimoto (1965). FBES C, FBES D, FBES F, FBES G et FBES JI ont une spécificité en fonction du stade. L'expression des fractions FBES H dans le spectre du corps gras est aussi spécifique en fonction du stade.

L'aspect distinct et l'intensité observés des fractions estérases dans le spectre des larves qui filent et des nymphes pendant les jours 1 à 2 et 5 à 6, prouvent indirectement une augmentation de l'activité estérase dans le corps gras pendant cette période de l'ontogenèse, qui est sûrement liée à l'activité fonctionnelle de la cellule du corps gras pendant la période de transformation de larve en nymphe. Pendant le développement larvaire (la période de nourrissage actif) il y a des substances de base synthétisées (protéines, hydrates de carbone et graisses) dans les throphocytes, qui forment l'essentiel de la masse des cellules dans le corps gras. Ces substances sont utilisées pendant la période de nutrition endogénétique — au cours des processus liés à la métamorphose pendant le stade nymphal, ainsi que pour l'entretien pendant la vie adulte et pour le fonctionnement normal des tissus et des organes chez l'imago. Kutuzova et coll., (1985) ont prouvé l'existence d'une induction hormonale déterminée génétiquement, des estérases du corps gras de *Bombyx mori* L.

En comparant les résultats obtenus par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide et sur un gel d'amidon, nous pouvons conclure qu'avec la PAGE, on peut visualiser un plus grand nombre de fractions estérases, et de manière plus distincte. Nous estimons que la PAGE est plus appropriée pour l'examen des estérases non spécifiques dans le corps gras du ver à soie du mûrier.

BREEDING OF NEW GERMPLASMS OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) RESISTANT TO ZHENJIANG (CHINA) STRAIN OF DENSONUCLEOSIS VIRUS (DNV-Z)

CHEN KEPING, LI MUWANG, YAO QING, LIN SHENYU & HOU CHENGXIANG

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

A recessive gene, nsd-Z, which confers resistance to denisonucleosis virus of the Zhenjiang (China) strain (DNV-Z), was transferred to several excellent commercial silkworm races, and was made homozygous. Six new germplasms have been bred. They are completely resistant to DNV-Z, and their economic characters are similar to their parents.

Keywords: Silkworm (*Bombyx mori*), resistance, breeding, Zhenjiang (China) strain denisonucleosis virus (DNV-Z).

Densonucleosis virus (DNV) disease was discovered in 1976. It comprises several strains, such as Ina virus, Saku virus, Yamanashi virus and Zhenjiang (China) virus (DNV-Z). As distinguished by Watanabe *et al.*, (1986) Ina virus belongs to the DNV-1 type, and Saku virus and Yamanashi virus belong to the DNV-2 type. Iwashita *et al.*, (1983) discussed the chemical characteristics of DNV-Z and Qian *et al.* (1985) demonstrated that it is similar to Saku virus. It was reported that a recessive gene, *nsd-1*, which is located at 8.3 cM on chromosome 21, controls the non-susceptibility to DNV-1. Another gene that also controls the non-susceptibility to DNV-1 is dominant, and has been shown not to be located on chromosome Z, 2, 12 or 17. *nsd-2*, a recessive gene conferring resistance to DNV-2, was shown to be different from *nsd-1*, and the mechanism of non-susceptibility to DNV-2 was also analysed. Hu *et al.*, (1984) demonstrated that a third recessive gene, *nsd-Z*, controls the non-susceptibility to DNV-Z. This gene is located on chromosome 15. Using susceptible races and non-susceptible races as the breeding materials, Huang (1986) discussed a breeding model to develop strains resistant to DNV-Z. We have been engaged in the breeding of silkworm races that are non-susceptible to DNV-Z for several years. First, we chose silkworm races with good economic characters and determined whether or not they carried non-susceptibility to DNV-Z. Secondly, we sought the best way to breed silkworm races resistant to DNV-Z by means of transferring the *nsd-Z* gene to commercial silkworm races. Now, we have obtained six new germplasms whose economic characters are at the level of the commercial races.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials:

Silkworm races:

Stock of silkworm races, including 21 Chinese and 21 Japanese bivoltine races, are preserved in the Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. The commercial races include Qingsong, Haoyue, Qiufeng, Baiyu, 871 and 872.

2. Methods:

1. DNV-Z preparation:

Dried silkworm mid gut containing DNV-Z was ground with distilled water until it turned into a dense solution. The solution was filtered with gauze, and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes. After adding an equal volume of 7% acetic acid to the supernatant, the solution was incubated at 25° C for 40 minutes, followed by adjustment to pH 7.0 and progressive dilution to 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001% solutions of tissue.

2. Method of feeding:

Bioassays were conducted at 25°C. Newly hatched larvae were fed with mulberry leaves which had been smeared with a DNV-Z suspension for 24 hours, followed by rearing on uncontaminated fresh mulberry leaves.

3. Method of investigation:

Normally, the silkworms that were susceptible to DNV-Z could not survive through the third instar, and developed very slowly. A few silkworms could develop into the fourth instar, but died before the fifth instar. All sick silkworms were checked for densovirus by immunoperoxidase-staining methods.

3. Obtaining commercial races homozygous for *nsd-Z*:

Forty-two preserved silkworm races were fed with DNV-Z. Among them, a few individuals of six races were resistant to DNV-Z. Therefore, six basic races resistant to DNV-Z, including two Chinese strains and four Japanese strains, were obtained which owed resistance to the *nsd-Z* gene. The two Chinese strains were named D₁, D₃, and the four Japanese strains were named D₂, D₄, D₆, D₈. The economic characters of D₁ and D₂ were better than the other 4 strains, and they were used as male parents to transfer the *nsd-Z* gene to commercial races. Based on the population genetics, the *nsd-Z* genotype and genetic constitution of each generation are listed in Table I.

Because of it being recessive, the *nsd-Z* gene would be lost if the methods of selection were not efficient during the back-crossing to improve the resistance of commercial races. Therefore, in order to ensure that the *nsd-Z* gene would not be lost, we used a single male moth, which carried the *nsd-Z* gene, to mate successively with two females of different races from the B₁ generation. In other words, the male moth was mated to a female moth of a commercial race first, then mated to another female moth of D₁ (or D₂). The eggs from the two females were reared separately, and the offspring of back-crossing to D₁ (or D₂) were fed with DNV-Z to test for the presence of *nsd-Z*. If all of those individuals died, the offspring obtained from the same male crossed to the commercial race was discarded. On the contrary, if 50% of the offspring obtained from the back-crossing to D₁ (or D₂) could survive, the offspring obtained from the same male moth crossed to the commercial race were reared (as shown in table II). At the same time, economic characters of each batch were tested and the inferior batches were discarded.

Economic characters of D₁ and D₂ were good, and interbatch selection was adopted at the same time, so that selfing was adopted in the B₄ generation. The offspring were fed with DNV-Z, and 25% of them were resistant to DNV-Z. The surviving individuals with similar or high economic characters were selected and used for single batch rearing, which was adopted to select the excellent batches.

RESULTS AND DISCUSSION

1. DNV-Z resistance of the silkworm races preserved in SRI-CAAS:

Among forty-two tested stock races, only six races survived after feeding with DNV-Z contaminated mulberry leaves. In no case were all individuals of those six races resistant to DNV-Z indicating that the stocks were not genetically uniform. However, as demonstrated by feeding with

DNV-Z, the offspring of the surviving individuals and the hybrids were resistant to DNV-Z, suggesting that both homozygous and heterozygous individuals were present in the population, and that resistance was genetically based. Therefore, we obtained six fundamental races and named them D₁, D₃ (Chinese strains) and D₂, D₄, D₆ and D₈ (Japanese strains).

2. Breeding of new silkworm races non-susceptible to DNV-Z:

Using D₁ (or D₂) as the resistant parent, we adopted an approach of mating one male moth successively to two female moths of different races insect to ensure that the *nsd-Z* gene would not be lost during back-crossing. The moths of each batch of the B₄ generation were selfed, and their offspring were fed with DNV-Z. The survivors meant that they were resistant to DNV-Z disease. These were selected according to the level of economic characters. Hence, new germplasm was obtained. As shown in Table III, due to the selection of excellent individuals in each generation, the economic characters of the new germplasm were similar to or better than those of the commercial races.

Table I. The genotype and genetic constitution of each backcross generation.

Tableau I. Constitution génotypique et génétique de chaque génération de croisement de retour.

Offspring generation	Genotype of offspring	Genetic constitution D1 or D2 in offspring	Genetic constitution of commercial race in offspring
<i>Génération de la descendance</i>	<i>Génotype de la descendance</i>	<i>Constitution génétique de D1 ou D2 dans la descendance</i>	<i>Constitution génétique de la race commerciale dans la descendance</i>
B ₀ (F ₁)	Nsd-Z/nsd-Z	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
B ₁	Nsd-Z/nsd-Z+1Nsd-Z/Nsd-Z	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{4}$
B ₂	Nsd-Z/nsd-Z+3Nsd-Z/Nsd-Z	$\frac{1}{8}$	$\frac{7}{8}$
B ₃	Nsd-Z/nsd-Z+7Nsd-Z/Nsd-Z	$\frac{1}{16}$	$\frac{15}{16}$
⋮	⋮	⋮	⋮
B _n	Nsd-Z/nsd-Z+ (2 ⁿ - 1) / Nsd-Z/Nsd-Z	(1/2) ⁿ⁺¹	1 - (1/2) ⁿ⁺¹

* Nsd-Z: susceptible to DNV-Z gene / sensible au gène DNV-Z.

* nsd-Z: nonsusceptible to DNV-Z gene / insensible au gène DNV-Z.

With subsequent testing their offspring with virus, the offspring of the resistant parents, new germplasms and the hybrids of new germplasms were completely resistant to DNV-Z, but the offspring of commercial races were susceptible.

3. As shown in Table IV, the economic characters of several hybrid combinations, which were generated by using the new, DNV-Z resistant germplasm as parents, were similar or superior to the control races.

4. Huang (1986) had established a model of breeding silkworm races that are resistant to DNV-Z. It is: nonsusceptible race (A) is mated to susceptible race (B), then $(A \times B) F_2$ are fed with DNV-Z, and the nonsusceptible individuals are crossed to race B again. After several rounds of mating, a silkworm race, that is resistant to DNV-Z, can be obtained, and its economic characters are similar to race B. However, this method has low efficiency. Our method of successively mating one male to two female moths of different races was highly efficient for selecting the desired genes, although it required more work, particularly when improving the economic characters of the race that carried a desirable recessive gene. When such a desirable recessive gene is transferred into other races in which the economic characters are superior, it could be retained, and at the same time other characters could be improved quickly.

Table II. Production of half-sib lines to select the individuals carrying the nsd-Z gene.

Tableau II. Production de lignées demi-sœurs pour sélectionner les individus portant le gène nsd-Z.

Genotype of the male silkworm after B1 generation	Genotype of the offspring from backcrossing to D1 (or D2) and the proportion of silkworms non susceptible to DNV-Z (percent)	Genotype of the offspring from backcrossing to a commercial race and resulting preservation
<i>Génotype du ver à soie mâle après la génération B1</i>	<i>Génotype de la descendance du croisement de retour avec D1 (ou D2) et proportion de vers à soie insensibles à DNV-Z (pourcentage)</i>	<i>Génotype de la descendance provenant du croisement de retour avec une race commerciale et conservation en résultant</i>
<i>Nsd-Z/nsd-Z</i>	<i>Nsd-Z/nsd-Z ; nsd-Z/nsd-Z 50 % resistant / résistant à 50 %</i>	<i>Nsd-Z/nsd-Z ; Nsd-Z/Nsd ; preserved / conservé</i>
<i>Nsd-Z/Nsd-Z</i>	<i>NSD-Z/nsd-Z ; Nsd-Z/nsd-Z Susceptible / sensible</i>	<i>Nsd-Z / Nsd-Z ; Nsd-Z/Nsd-Z ; discarded / rejeté</i>

Table III. Economic characters of the parents and the new germplams resistant to DNV-Z.

Tableau III. Caractères économiques des parents et nouveaux germoplasmes résistant à DNV-Z.

Race	Duration of 5 th larvae (D: H)	Duration of feeding period (D: H)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Ratio of cocoon shell (%)	Ratio of cocoon mortality (%)	Larva-pupa survival rate (%)
	<i>Durée du 5^{ème} âge (J: H)</i>	<i>Durée de la période de nourrissage (J: H)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Taux de mortalité des cocons (%)</i>	<i>Taux de survie larve-nymphé (%)</i>
831D (D1) *	9: 00	27: 06	1.833	0.438	23.88	1.16	96.34
798D (D2) *	9:06	27: 12	1.721	0.407	23.66	2.25	95.43
Qingsong	9:00	27: 18	1.773	0.426	24.03	4.03	93.67
QingsongD*	8: 18	27: 00	1.860	0.442	23.76	2.10	94.45
Haoyue	9: 06	28: 00	1.673	0.385	23.01	2.33	95.34
HaoyueD*	9: 00	27: 12	1.740	0.392	22.52	1.81	96.58
871	8: 18	27: 06	1.820	0.425	23.35	2.18	94.46
871D*	8: 18	27: 00	1.800	0.420	23.40	2.84	96.13
872	8: 18	27: 06	1.798	0.420	23.35	4.26	91.40
872D*	8: 18	27: 12	1.856	0.440	24.03	4.96	93.63
Qiufeng	8: 00	26: 18	1.851	0.440	23.80	3.08	92.75
QiufengD*	8: 06	27: 00	1.747	0.408	23.36	1.18	96.39
Baiyu	8: 06	26: 12	1.612	0.380	23.41	1.60	93.64
BaiyuD*	8: 12	26: 18	1.650	0.376	22.78	0.91	95.82

* Resistant to DNV-Z: / Résistant à DNV-Z.

Table IV. Economic characters of the hybrids of the new germplams and hybrids of their parents.

Tableau IV. Caractères économiques des hybrides des nouveaux germoplasmes et des hybrides de leurs parents.

Hybrids	Cocoon crop per 10 ⁴ 4 th instar larva	Cocoon shell weight per 10 ⁴ 4th instar larva	Cocoon weight	Cocoon shell weight	Ratio of cocoon shell	Ratio of cocoon mortality	Larva-pupa survival rate	Reared in 1999
Hybrides	Récolte de cocons pour 10 ⁴ larves du 4 ^{ème} âge (kg)	Poids de la coque pour 10 ⁴ larves du 4 ^{ème} âge (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyense (%)	Taux de mortalité des cocons (%)	Taux de survie larve-pupe (%)	Elevés en 1999
Qiufeng × Baiyu **	18.87	4.459	1.870	0.442	23.63	3.18	95.46	
QiufengD × BaiyuD*	19.01	4.401	1.820	0.421	23.15	2.65	96.40	
Qingsong × Haoyue**	20.032	5.086	2.091	0.523	25.02	3.03	94.27	spring / printemps
Qingsong × Haoyue D*	21.036	4.987	2.020	0.503	24.89	3.80	95.42	
871 × 872**	20.012	4.847	2.042	0.495	24.32	1.98	96.13	
871D × 872D*	20.507	4.991	2.084	0.507	24.34	1.10	97.32	
Qiufeng × Baiyu**	16.87	3.831	1.725	0.400	22.93	6.87	92.53	
QiufengD × BaiyuD*	17.56	4.063	1.750	0.405	23.14	5.06	93.75	
871 × 872**	17.32	4.093	1.825	0.431	23.63	5.96	92.75	autumn / automne
871D × 872D*	17.85	3.997	1.850	0.414	22.43	5.60	93.02	

* Hybrid of new germplam, resistant to DNV-Z. / * Hybride au nouveau germoplasme résistant à DNV-Z.

** Control races / ** Races témoins.

REFERENCES

- ABE H., WATANABE H. & EGUCHI R. (1987) Genetical relationship between non-susceptibilities of the silkworm, *Bombyx mori*, to two denonucleosis viruses. J. Seric. Sci. Jpn, 56(3) 443-444.
- ABE H., YOKOYARUA T., OSHIKI T. & KOBAYASHI M. (1993) Analysis of the mechanism of non-susceptibility to the denonucleosis virus (densovirus) type-2 in the silkworm *Bombyx mori* using a genetic mosaic, J. Seric. Sci. Jpn. 62(1): 38-44.
- EGUCHI R., FURUTA Y. & NINAKI O. (1986) Dominant non-susceptibility to denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*, J. Seric. Sci. Jpn 55(2): 177-178.
- EGUCHI R., NINAKI O. & NARA W. (1991) Genetical analysis on the non-susceptibility to denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* J. Seric. Sci. Jpn 60(5) 384-389.
- HU X. F. QIAN Y. J. & WANG H. L. (1984) Studies on infectivity of silkworm denonucleosis virus to some silkworm races. Acta Sericology Sinica, 10(2): 87-90.
- HUANG L. Q. (1986) Studies on the method of breeding silkworm strains that can resist the disease of denonucleosis virus. Acta Sericology Sinica, 12(1): 25-29.
- IWASHITA Y., CHAO Y. S. (1983) The development of a denonucleosis virus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori*, of China. Acta Sericology Sinica 9(4): 219-222.
- KAVASE S. (1989) Denonucleosis viruses of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 58(4): 295-301.
- QIAN Y. J., GUO X. J., HU X. F., WATANABE H. (1985) The serological relationship of *Bombyx mori* denonucleosis virus from China and Japan. Acta Sericology Sinica, 11(4): 241-242.
- QIAN Y. J., HU X. F., WANG Y. X., GUO X. J., ZHANG Y. Z., WANG H. L. (1989) Serological diagnosis of the denonucleosis disease of *Bombyx mori*. Acta Sericology Sinica, 15(4): 217-222.
- QIN J., YI W. Z. (1996) Genetic linkage analysis of *nsd-Z*, the non-susceptibility gene of *Bombyx mori* to the Zhenjiang (China) strain denonucleosis virus. Sericologia, 36(2): 241-248.
- WATANABE H., MAEDA S. (1981) Genetically determined non-susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* to infection with a denonucleosis virus. J. Invertebr. Pathol, 38: 370-373.
- WATANABE H., KAWASE S., SHIMIZU T. & SEKI H. (1986) Difference in serological characteristics of denonucleosis viruses in the silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 55(1): 75-76.

OBTENTION DE NOUVELLES LIGNEES DE VERS A SOIE (*BOMBYX MORI*) RESISTANTS A LA SOUCHE ZHENJIANG (CHINE) DU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE (DNV-Z)

CHEN KEPING, LI MUWANG, YAO QING, LIN SHENYU & HOU CHENGXIANG

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

Un gène récessif, nsd-Z qui confère une résistance au virus de la densonucléose de la souche Zhenjiang (Chine) (DNV-Z) a été transféré chez plusieurs races de vers à soie commerciales excellentes à l'état homozygote. Six nouvelles lignées ont été obtenues. Elles sont complètement résistantes à DNV-Z et leurs caractères économiques sont similaires à ceux de leurs parents.

La maladie due au virus de la densonucléose (DNV) a été découverte en 1976. Elle comprend plusieurs souches, telles que le virus Ina, le virus Saku, le virus Yamanashi et le virus Zhenjiang (Chine) (DNV-Z). Comme l'ont distingué Watanabe et coll., (1986), le virus Ina appartient au type DNV-1 et les virus Saku et Yamanashi appartiennent au type DNV-2. Iwashita et coll., (1983) ont étudié les caractéristiques chimiques de DNV-Z et Qian et coll., (1985) ont montré qu'il est similaire au virus Saku. On a signalé que le gène récessif, *nsd-1*, qui est situé à 8,3 cM sur le chromosome 21, contrôle l'insensibilité à DNV-1. Un autre gène qui contrôle aussi l'insensibilité à DNV-1 est dominant et on a montré qu'il n'est pas situé sur les chromosomes Z, 2, 12 ou 17. On a montré que *nsd-2*, un gène récessif conférant la résistance à DNV-2 est différent de *nsd-1* et le mécanisme d'insensibilité à DNV-2 a aussi été analysé. Hu et coll., (1984) ont montré qu'un troisième gène récessif, *nsd-Z* contrôle l'insensibilité à DNV-Z. Ce gène est situé sur le chromosome 15. En utilisant des races sensibles et insensibles comme matériels de lignage, Huang (1986) a proposé un mode de lignage pour mettre au point des souches résistantes à DNV-Z. Nous travaillons depuis plusieurs années sur le lignage de races de vers à soie insensibles à DNV-Z. En premier lieu, nous avons choisi des races de vers à soie avec de bons caractères économiques et déterminé si oui ou non elles portent l'insensibilité à DNV-Z. En deuxième lieu, nous avons cherché le meilleur moyen pour obtenir des races de vers à soie résistantes à DNV-Z en transmettant le gène *nsd-Z* à des races de vers à soie commerciales. Nous avons maintenant obtenu six nouveaux germoplasmes dont les caractères économiques sont équivalents à ceux des races commerciales.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels :

Races de vers à soie :

Les lignées pures de vers à soie utilisées, comprennent 21 races bivoltines chinoises et 21 japonaises, et sont conservées à l'Institut de Recherche Séricicole, de l'Académie Chinoise des Sciences Agricoles. Les races commerciales comprennent Qingsong, Haoyue, Qiufeng, Baiyu 871 et 872.

2. Méthodes :

1. Préparation de DNV-Z :

De l'intestin moyen séché de ver à soie contenant du DNV-Z est broyé avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'il forme une solution dense. La solution est filtrée au travers d'une gaze, puis centrifugée à 3500 tpm pendant 20 minutes. Après avoir ajouté un volume égal d'acide acétique à 7 % au surnageant, la solution est incubée à 25° C pendant 40 minutes, puis le pH est ajusté à 7,0 et une dilution progressive de la solution à 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % et 0,0001 % est effectuée.

2. Méthode de nourrissage :

Des évaluations biologiques sont réalisées à 25° C. Les larves nouvellement écloses sont nourries pendant 24 heures avec des feuilles de mûrier enduites d'une suspension de DNV-Z, et sont ensuite élevées avec des feuilles de mûrier fraîches non contaminées.

3. Méthode de recherche :

Normalement, les vers à soie qui sont sensibles à DNV-Z ne survivent pas au-delà du troisième âge et se développent très lentement. Quelques vers à soie se développent au quatrième âge mais ils meurent avant le cinquième âge. On vérifie tous les vers à soie malades pour voir s'ils ont le virus de la densonucléose en utilisant des méthodes de coloration à l'immuno péroxydase.

3. Obtention de races commerciales homozygotes pour *nsd-Z* :

Les quarante deux races de vers à soie conservées sont nourries avec DNV-Z. Parmi elles, quelques individus provenant de six races sont résistants à DNV-Z. Ainsi, six lignées de base résistantes à DNV-Z, dont deux souches chinoises et quatre souches japonaises, sont obtenues qui doivent leur résistance au gène *nsd-Z*. Les deux souches chinoises sont nommées D₁, D₃ et les quatre souches japonaises sont nommées D₂, D₄, D₆, D₈. Les caractères économiques de D₁ et D₂ sont meilleurs que ceux des quatre autres souches et elles sont utilisées comme parents mâles pour transmettre le gène *nsd-Z* aux races commerciales. Le génotype *nsd-Z* et la constitution génétique de chaque génération, d'après la génétique de la population, sont présentés dans le Tableau I.

Comme il est récessif, le gène *nsd-Z*, serait perdu pendant le croisement de retour destiné à améliorer la résistance des races commerciales si les méthodes de sélection n'étaient pas efficaces. Ainsi, pour s'assurer que le gène *nsd-Z* ne se perde pas, nous avons utilisé un papillon mâle unique, qui porte le gène *nsd-Z*, pour l'accoupler successivement avec deux femelles de races différentes de la génération B₁. En d'autres termes, le papillon mâle est accouplé à un papillon femelle d'une race commerciale en premier lieu, puis accouplé à un autre papillon femelle de D₁ (ou D₂). Les œufs des deux femelles sont élevés séparément, et la descendance du croisement de retour avec D₁ (ou D₂) est nourrie avec du DNV-Z pour tester la présence de *nsd-Z*. Si tous ces individus meurent, la descendance obtenue avec le même mâle qui a été croisé avec la race commerciale est rejetée. Par contre, si 50 % de la descendance obtenue à partir du croisement de retour avec D₁ (ou D₂) survit, la descendance obtenue à partir du même papillon mâle croisé avec la race commerciale est élevée (voir tableau II). Au même moment, les caractères économiques de chaque lot sont testés et les lots inférieurs sont rejetés.

Les caractères économiques de D₁ et D₂ sont bons, et on procède à une sélection entre les lots au même moment de sorte que l'intra-croisement est adopté à la génération B₄. La descendance est nourrie avec DNV-Z et 25 % sont résistants à DNV-Z. Les individus qui survivent avec des caractères économiques similaires ou meilleurs sont sélectionnés et utilisés pour un élevage en lot unique, qui est adopté pour sélectionner des lots excellents.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résistance à DNV-Z des races de ver à soie conservées au SRI-CAAS :

Parmi les quarante deux races stockées testées, seules six races survivent après avoir été nourries avec des feuilles de mûrier contaminées par DNV-Z. Les individus de ces six races ne sont en aucun cas tous résistants à DNV-Z, ce qui indique que les stocks ne sont pas uniformes génétiquement. Cependant, comme le montre le nourrissage avec du DNV-Z, la descendance des individus qui survivent et les hybrides sont résistants à DNV-Z, ce qui suggère qu'il y a à la fois des individus homozygotes et hétérozygotes présents dans la population et que la résistance est génétique. Nous avons donc obtenu six races fondamentales et nous les avons nommées D1, D3 (races chinoises) et D2, D4, D6 et D8 (souches japonaises).

2. Lignage des nouvelles races de ver à soie insensibles à DNV-Z :

En utilisant D1 (ou D2) comme parent résistant, nous avons choisi d'accoupler un papillon mâle successivement à deux papillons femelles de races différentes afin de s'assurer que le gène *nsd-Z* ne se perde pas pendant le croisement de retour. Les papillons de chaque lot de la génération B4 sont croisés entre eux et leur descendance est nourrie avec DNV-Z. Cela signifie que les survivants sont résistants à la maladie du DNV-Z. Ceux-ci sont sélectionnés en fonction de leurs caractères économiques. Ainsi, on obtient un nouveau germoplasme. Comme le montre le Tableau III, grâce à la sélection d'excellents individus à chaque génération, les caractères économiques du nouveau germoplasme sont similaires ou meilleurs que ceux des races commerciales.

En testant leur descendance par rapport au virus, la descendance des parents résistants, de nouveaux germoplasmes et les hybrides des nouveaux germoplasmes sont complètement résistants à DNV-Z mais la descendance des races commerciales est sensible.

3. Comme on peut le voir dans le Tableau IV, les caractères économiques de plusieurs combinaisons d'hybrides, qui sont obtenues en utilisant le nouveau germoplasme résistant à DNV-Z, sont similaires ou supérieures aux races témoins.

4. Huang (1986) a établi un mode de lignage de races de vers à soie qui sont résistantes à DNV-Z. C'est le suivant : une race insensible (A) est accouplée avec une race sensible (B), puis F_2 ($A \times B$) est nourrie avec du DNV-Z et les individus insensibles sont à nouveau croisés avec la race B. Après plusieurs séries d'accouplements, une race de ver à soie, résistante au DNV-Z peut être obtenue et ses caractères économiques sont similaires à ceux de la race B. Cependant, cette méthode est peu efficace. Notre méthode qui consiste à accoupler successivement un mâle à deux papillons femelles de races différentes est hautement efficace pour sélectionner les gènes désirés bien que cela demande plus de travail, particulièrement pour améliorer les caractères économiques de la race qui porte un gène récessif désirable. Quand un tel gène récessif désirable est transmis à d'autres races aux caractères économiques supérieurs, il peut être maintenu, et on peut en même temps améliorer d'autres caractères rapidement.

TRANSGRESSION OF SHELL WEIGHT - A MULTIGENIC TRAIT, THROUGH DEVELOPMENT OF CONGENIC BREED IN TROPICAL SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

G.K. CHATTOPADHYAY*, A.K. SENGUPTA, A.K. VERMA, S.K. SEN &
B. SARATCHANDRA

Silkworm Breeding, Genetics and Molecular Biology Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

*Exploitation of heterosis for the improvement of both quantitative and qualitative traits in sericulture is a matter of practice using multivoltine × bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) strains or vice-versa. The highly heterogenic genepool in tropical silkworm strains produce hybrids with variable performances. Therefore, in the present experiment, a different breeding approach has been adopted for the first time in sericulture by developing successively syngenic line, recurrent backcross line (RBL) and congenic line (Con. L) or near isogenic line (NIL) causing transgression of cocoon shell weight (SCSW), the target character in all the lines in comparison to the original population i.e. CB5 (GP). The target character in congenic or near isogenic line is very close to bivoltine - the donor parent (JPN9LmO). Single cocoon filament length being the most important linked character has also increased substantially keeping larval marking, cocoon colour, cocoon shape and voltinism as that of multivoltine - the receptor parent (CB5Lm-5). Such breeds having higher yield and better silk quality may directly be released for commercial exploitation bypassing conventional hybridization.*

Keywords : Syngenic line, recurrent backcross line (RBL), congenic line (Con. L) or near isogenic line (NIL).

INTRODUCTION

Hybridization is the most common method employed for crop and livestock improvement, and this is true for silkworms too. This practice has made resuscitation in the field of sericulture. It is known that heterotic hybrids, in general, show greater vigour, faster growth and development, better yield, higher tolerance to diseases, higher adaptability in unfavourable environmental situations and uniform, stable crops. In sericulture, it is observed that low yielding silkworm breeds mostly tropical in origin, e.g. multivoltine races (generally laying non-hibernating eggs) have much higher germload tolerance. On the other hand, high yielding silkworm races, i.e. uni/bivoltine breeds laying hibernating eggs which are temperate in origin having high quality silk and high yield potential under temperate situation show low germload tolerance and low adaptability (Chattopadhyay and Chatterjee, 1990) when reared under tropical situation. This has become a major impediment in adopting bivoltine sericulture in tropical countries like India. In general, inter-regional hybrids as single crosses are more preferred than poly hybrids (Sengupta *et al.*, 1971 ; Sengupta and Datta, 1973 ; Raju and Krishnamurthy, 1984 ; Bhargava *et al.*, 1993 ; Rao *et al.*, 1998 ; Sengupta *et al.*, 1999). Hybridization,

* Author for correspondence.

as such, is in vogue, the key problem in India is the highly heterogenic genepool resulting in higher quantitative and qualitative variation in hybrids leading to a deficiency in the desired result.

To surmount this difficulty we present in this paper, a backcross breeding approach in sericulture, that is the development of congenic line (Young *et al.*, 1988 ; Zeven *et al.*, 1983) which showed transgression (Allard, 1960) for single cocoon shell weight (SCSW) i.e. silk content in the cocoon, the most desired character along with the improvement of other linked economic characters like single cocoon weight (SCW), cocoon shell percentage (SR %) and single filament length in comparison to the original population i.e. CB5 (GP).

MATERIALS AND METHODS

The silkworm breeds JPN9 (bivoltine) and CB5 (multivoltine) were obtained from the germplasm (GP) bank of Central Sericulture Research Institute, Berhampore, West Bengal. Both the breeds were reared at 22-28° C temperature with a relative humidity (RH) 70-90 % during all the rearing seasons except in March to July when only CB5 was reared at 27-32°C with a R.H. 50 to 60 %. In all rearing periods, larvae were fed on fresh leaves of an improved and popular local mulberry variety (S1) of *Morus alba*, three times a day. The breeds were exposed under 12 hrs. light : 12 hrs. dark photoperiod under rearing. Continuous selection was done phenotypically (larval marking, cocoon colour and shape), physiologically like moulting duration during different stages of development (IInd, IIIrd and IVth) and maturation period for spinning. On this basis some lines were separated from CB5 (GP) and JPN9 (GP) to develop syngenic lines.

All chemicals were bought from E. Merck, India, Mumbai for isozyme banding pattern study of some important enzymes i.e., amylase, esterase, alkaline and acid phosphatase etc. to develop syngenic lines and also for further screening. From each line 20 to 25 larvae on 5th day of Vth instar were taken and kept for one hr. starvation. Before the collection of digestive juice individually, each larva was exposed to chloroform vapour for a brief time. The moment the larva started vomiting, digestive juice was collected into a chilled eppendorf tube coated with 1 % EDTA to preserve the enzymatic activities. The samples were centrifuged at 2511 × g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was collected in EDTA coated tube and stored immediately at -20°C till further use.

By puncturing the pro-legs of fifth day old fifth instar larvae by sterilised needle, the haemolymph samples were collected separately from each larva of each line in chilled eppendorf tubes coated with 0.1 % phenylthiourea (PTU) to prevent the melanization. The injured pro-legs were sealed immediately by liquid paraffin to stop further bleeding and to keep them alive for rearing and screening. The supernatant was collected in 0.1 % PTU coated eppendorf tube, after the same centrifugation as for the digestive juice and immediately stored at -20°C for future use.

Ten µl of each sample was electrophoresed on a 7.7 % polyacrylamide gel following PHARMACIA Laboratory techniques by using Pharmacia Vertical Gel Electrophoretic system GE-24. Electrophoresis was carried out with an initial current density of 1 mA followed by 2.5 mA at 500 volts for 3 hours until the tracing dye reaches the bottom of the gel. Different substrate reactions were done at the end for different enzymes already mentioned and were documented in Gel Documentation System (GDS7600 - UVP Ltd., U.K.).

The alive larvae possessing the isozyme banding homogeneity for each enzyme were selected together in each line from successive generation and allowed for sib mating for 15 generations to develop syngenic lines (Fig.1). After fixation as syngenic lines, CB5Lm-5 (receptor parent) and JPN9LmO (donor parent) renamed after 15 generation were used for introgression of genes for high shell weight by crossing between receptor and donor parents i.e., CB5Lm-5 × JPN9LmO. Only these cocoons were selected from the cross (F1) having higher single cocoon shell weight i.e. closer to donor parent measured by Sartorius balance, IP-65, Japan, and other phenotypical characters like larval marking, cocoon shape, colour and voltinism, etc. as receptor parent. Thereafter, consecutive backcrosses were conducted for 10 to 15 generations in a similar fashion and finally sib mating was

performed between male and female moths emerged from larvae having maximum homogeneity like receptor parent and higher single cocoon shell weight, closer to donor parent resulting in RBL (Fig. 2). As the target character did not appear in RBL, a second cross was made between donor parent and RBL as a receptor parent and same protocol for development of RBL (Fig. 2) was followed in order to develop congenic line which expressed the target character as donor parent (JPN9LmO). Afterward, mass rearing was conducted in different seasons for assessing the quantitative characters of these lines.

The six quantitative characters considered are i) weight (g) of a single cocoon (SCW), ii) weight (g) of a single cocoon shell (SCSW),

iii) cocoon shell percentage (SR %) calculated as follows :

$$\frac{\text{Single cocoon shell weight (SCSW)}}{\text{Single cocoon weight (SCW)}} \times 100$$

iv) Yield/10,000 larvae (Kg) calculated as,

$$\frac{\text{Total weight (kg) of cocoons harvested}}{\text{Total number of larvae kept after IIIrd moult}} \times 10,000$$

v) Single cocoon filament length (m) and

vi) Denier (a number indicating weight in g. of 9000 meters of silk filament) calculated as,

$$\frac{\text{Single cocoon filament weight (g)}}{\text{Single cocoon filament length (m)}} \times 9000 \text{ m}$$

RESULTS AND DISCUSSION

The introgression of gene(s) for higher cocoon shell weight- a multigenic trait from donor parent, JPN9LmO to the receptor parent CB5Lm-5 by crossing, continuous backcrossing with receptor and sib mating after eleven generations resulted in RBL and congenic line. The congenic line depicted very significant improvement ($p < 0.001$) to a desired level that is very close to donor parent JPN9LmO for single cocoon shell weight-target character in the present experiment when t-test was performed keeping CB5 (GP) as control (Table I) through transgression (Fig. 4). This line also showed improvement in other linked economical characters like single cocoon weight (SCW), SR % (in both the cases significant at 0.1 % level) and single filament length compared to CB5 (GP), CB5Lm-5 & RBL (Fig. 3 & 5, Table I). The improvement could be noticed even at the phenotypic level of cocoon size among the developed lines (Fig. 6). Since yield is a multiplicative end product of all these attributes also showed higher values (Table I).

The gene pool of tropical silkworm is highly heterogenic. Therefore, it becomes difficult to trace the level of introgression of gene or genes during the development of RBL and congenic line. So, through the present breeding experiment, it was tried to decrease the heterogeneity in genepool and to aggregate favourable gene or genes keeping aside the unfavourable gene(s) by developing syngenic lines. As a result, it was possible to introgress the genes for high shell weight, known to be controlled by polygenes (Tazima, 1964) from the donor parent to receptor through the development of congenic line by keeping other characters close to those of the receptor parent (Fig. 4, Table I). The transgression of single cocoon shell weight in congenic line was confirmed by analysis of frequency

distribution (Fig. 4) and t-test of the same character with control (Table 1). The improvement of this particular parameter i.e. SCSW along with SCW and SR % in the same line were found to be much higher than CB5 (GP), CB5Lm-5, RBL and very close to bivoltine donor parent (JPN9LmO). However, the introgression of any quantitative character depends on a number of factors : the heritability of the trait, the number of genes involved, the interactions of the genes and the distribution of the genes over the genome (Ooijen, 1992).

The present experiment clearly indicates the possibility of introgression of the desired genes from the donor parent through repeated backcrossing for 11-15 generations followed by sib mating that resulted in the formation of RB line. The RB line did not produce the shell weight to the desired level, therefore, the RB line was once more backcrossed with bivoltine donor parent (JPN9LmO) followed by recurrent backcrossing with RBL using it as a receptor parent for 11 generations and finally sib mating was done to establish congenic line.

Table I. Comparison of rearing performance of CB5 (GP), CB5Lm-5, RBL and Congenic line.

Tableau I. Comparaison de la performance d'élevage de CB5 (GP), CB5Lm-5, du RBL et de la lignée Congénique.

Name of the line	Fecundity	Yield/10,000 larvae (kg)	S.C.W. (g)	S.S.W. (g)	S.R. (%)	Filament length (m)	Denier
<i>Nom de la lignée</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Rendement / 10 000 larves (kg)</i>				<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre</i>
CB5 (GP)	491	9.772	1.058	0.154	14.72	382	2.09
CB5Lm-5	517	9.961	1.392	0.197	14.28	432	2.30
JPN9	535	8.115	1.226	0.247	20.07	734	1.94
RBL	461	12.652	1.543***	0.242***	15.83***	495	2.27
Con. L. / Lignée congéni.	460	15.21	1.452***	0.296***	20.45***	650	2.23

***Significant at 0.1 % ($p < 0.001$) / *** Significatif à 0,1 % ($p < 0,001$)

SCW : Single Cocoon Weight /Poids d'un cocon.

S.S.W : Single Shell Weight /Poids d'une coque.

S. R : Silk Ratio / Richesse Soyeuse.

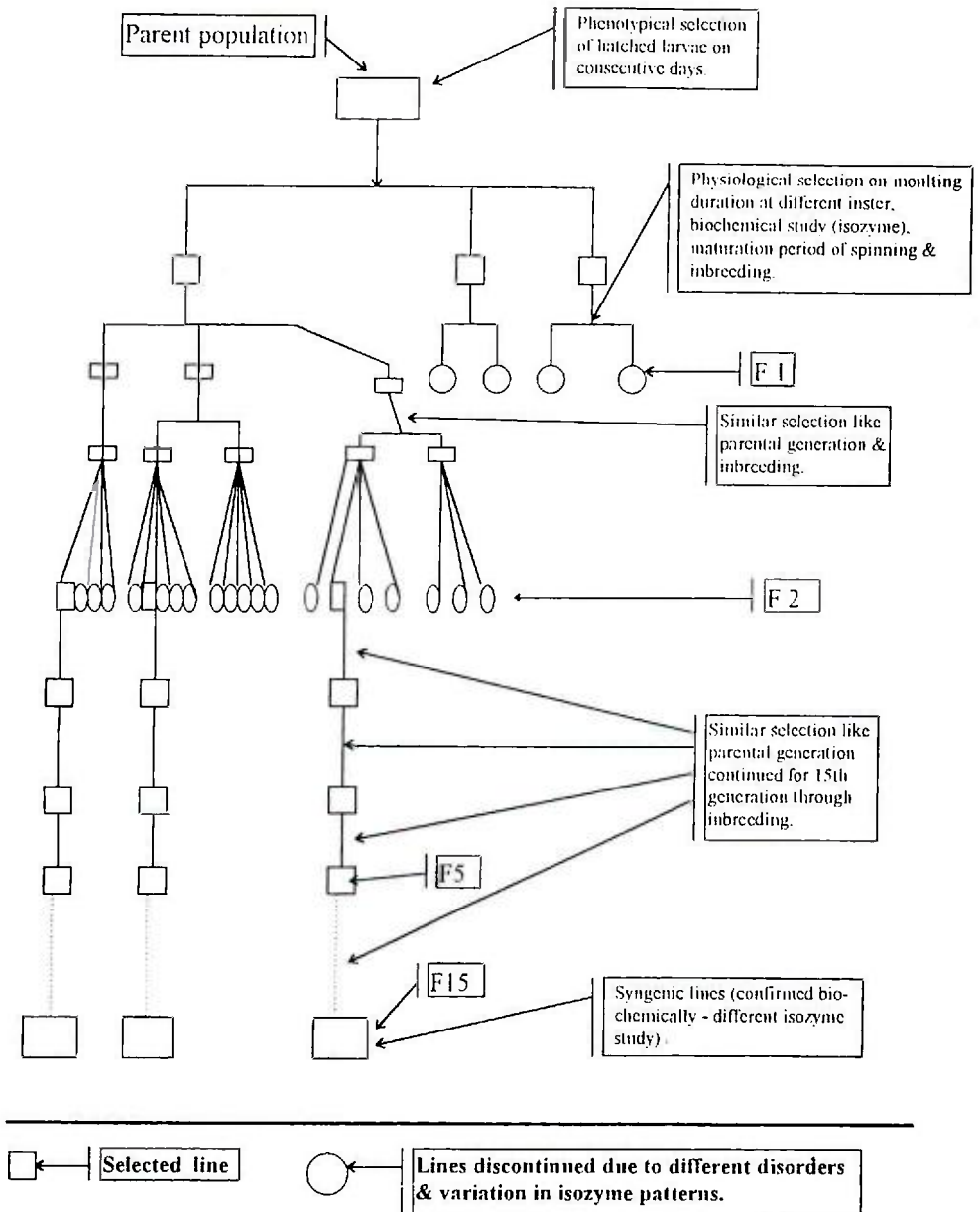


Fig. 1 : Scheme for developing syngenic lines.
Fig. 1 : Plan de mise au point de lignées syngéniques.

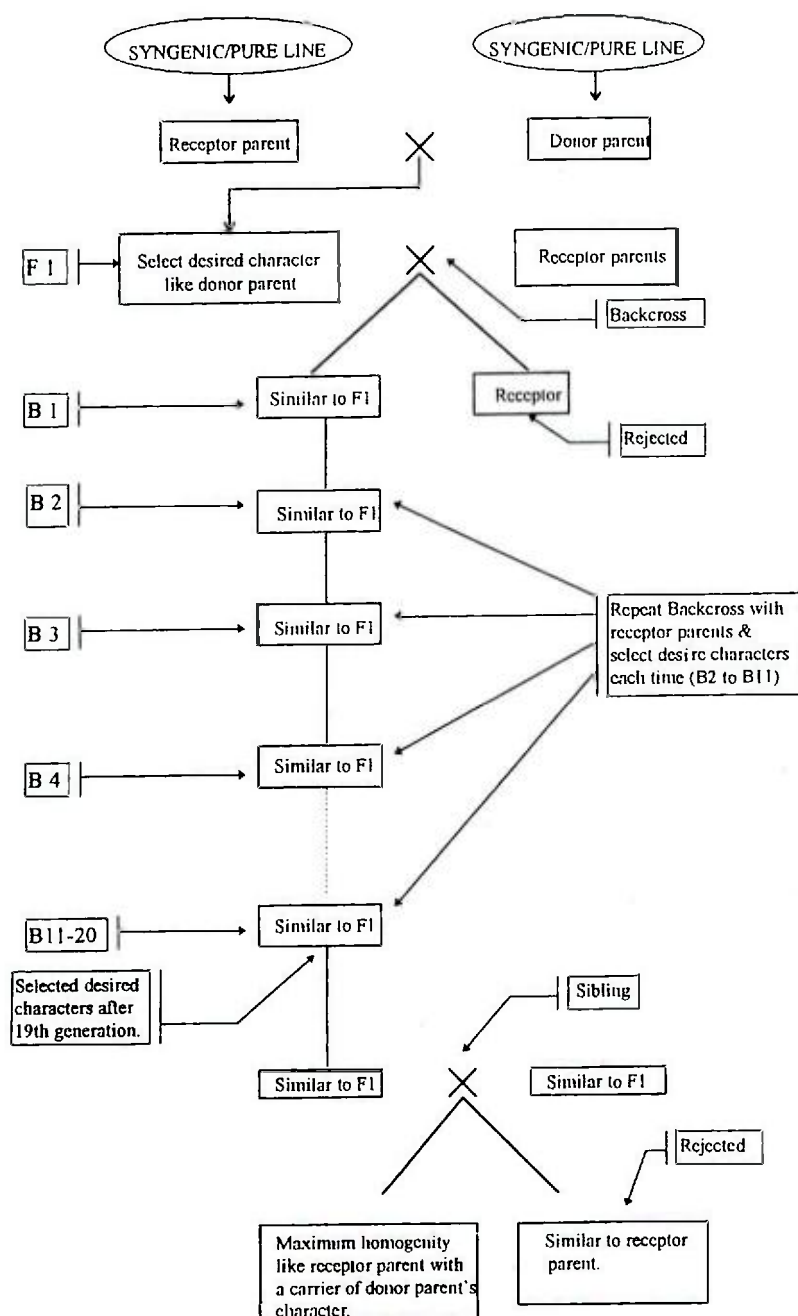


Fig. 2 : Scheme for developing recurrent backcross line.

Fig. 2 : Plan de mise au point d'une lignée de croisement de retour récurrente.

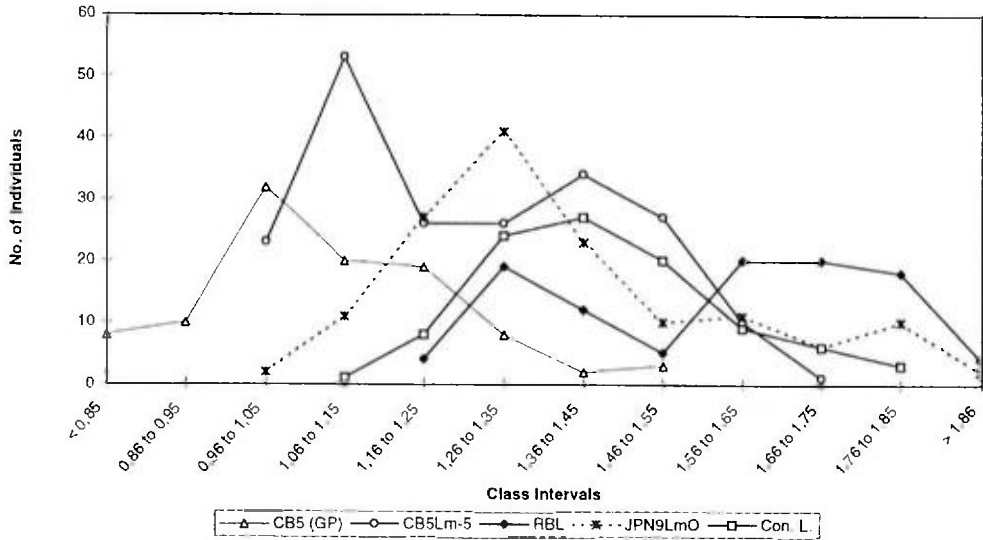


Fig. 3 : Improvement of cocoon weight through transgression.

Fig. 3 : Amélioration du poids du cocon par la transgression.

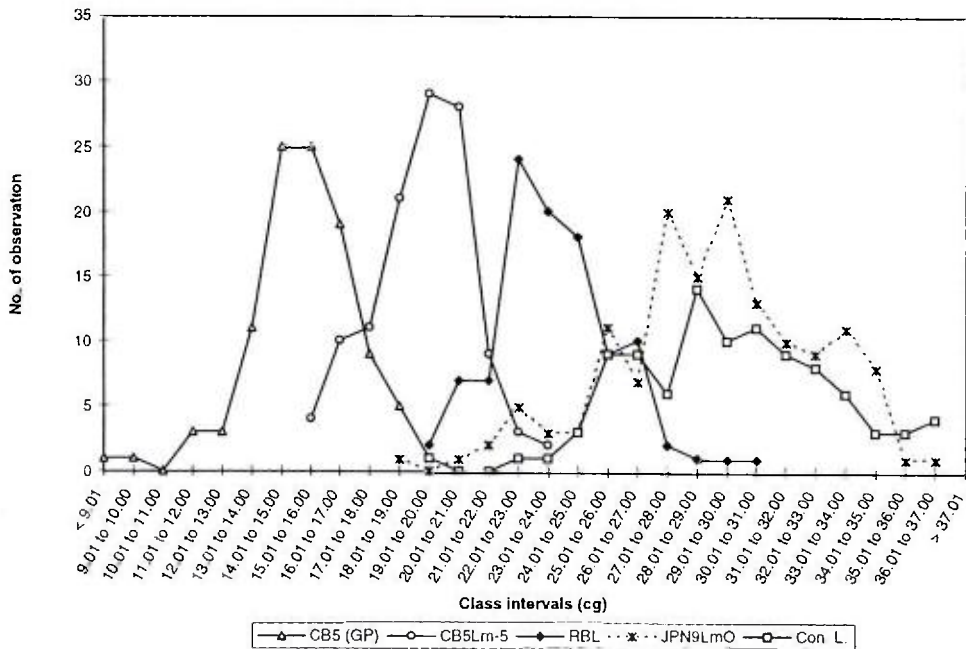


Fig. 4 : Improvement of single cocoon shell weight through transgression.

Fig. 4 : Amélioration du poids de la coque par la transgression.

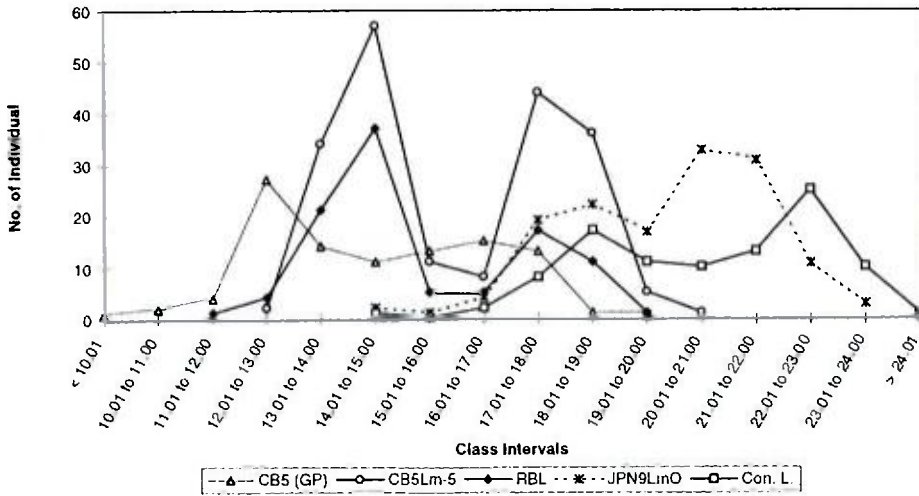


Fig. 5 : Improvement of S. R. % through transgression.

Fig. 5 : Amélioration de la richesse soyeuse par la transgression.

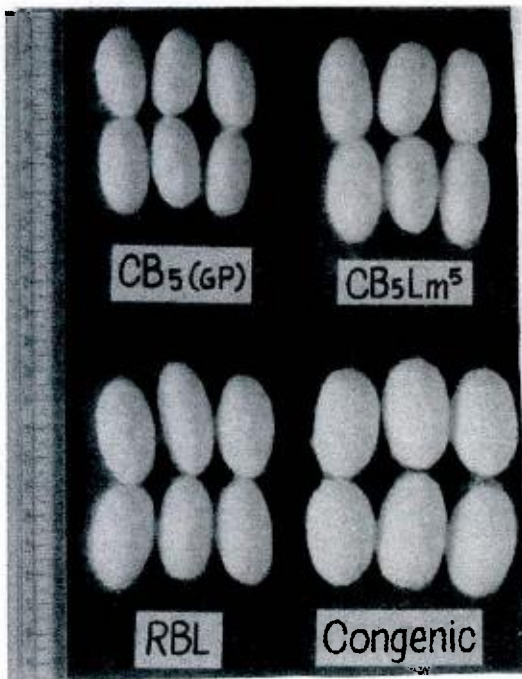


Fig. 6. Improvement of cocoon size in different lines.

Fig. 6. Amélioration de la taille du cocon chez différentes lignées.

The possible genetic explanation for the retention of the genes from the donor parent in the congenic line can very well be explained as has been proposed that "when genes are transferred to a cultivar by backcrossing during the production of NILs, genes from the donor parent may be retained due to two causes - (1) after several backcrosses, a gene that is independent of the gene being transferred may still be present by chance (Allard, 1960) and (2) in addition, a segment of the donor chromosome surrounding the transferred gene is likely to be retained due to linkage. The retention of donor genes due to this linkage has been termed as "Linkage drag" (Zeven *et al.*, 1983 and Brinkman and Frey, 1977). The length of the chromosome segment transferred depends on several factors such as the site of the locus on the chromosome and the number of backcrosses (Stam and Zeven, 1981). Congenic line can provide good quantity and quality of silk like bivoltine keeping the multivoltinism intact in tropical condition. Therefore, as such the line may be used commercially bypassing the conventional hybridization technique.

CONCLUSION

The backcross method is well established and widely used to develop NIL or Con. L for disease resistant or high protein content, high oil content etc., in plant breeding taking single gene into consideration. But dealing with multigenic trait is not reported earlier in animal or insect. For the first time, it has been tried to introgress a multigenic trait - Higher cocoon shell weight from the donor to the receptor through the development of congenic or near isogenic line. This breed could directly be released at commercial level bypassing age-old hybridization practices.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are deeply indebted to Central Silk Board, Ministry of Textiles, Govt. of India to carry out the work under the project No. AIG002 entitled "Utilization of syngenic lines for improvement of shell weight and survival in silkworm, *Bombyx mori* L.". The assistance of Mr. T. K. Maitra, Mr. B. Dhar, Mr. S. Sheik, in data processing, making graphs and charts is also highly acknowledged.

REFERENCES

- ALLARD, R. W. (1960). Back cross breeding in Principles of Plant Breeding. John Wiley and Sons Inc., USA. pp. 152 - 165.
- BHARGAVA, S. K.; THIAGARAJAN, V. & DATTA, R. K. (1993). Hybrid vigour in the silkworm *Bombyx mori* L. G. it. Ent. 6, 449-453.
- BRINKMAN, M. A. AND FREY, S. K. (1977). Yield component analysis of oat isolone that produce different grain yields. Crop Science. 17, 165-168.
- CHATTOPADHYAY, G. K. & CHATTERJEE, S. N. (1990). Need for advanced genetical research in silkworm *Bombyx mori*, L. in Workshop manual - Cloning and characterization of animal genes, DBT Laboratory, Dept. of Biochemistry, Bose Institute, Calcutta, 7.1.14.
- OOIJEN, V. W. J. (1992). Accuracy of mapping quantitative trait loci in *Autogamous* sp. Theor. Appl. Genet. 84, 803-811.
- RAJU, P. J. & KRISHNAMURTHY, N. B., (1984). Evolution of high yielding multivoltine races of silkworm *Bombyx mori* by selective hybridization. Sericologia. 24 (3), 430.
- RAO, P. R. T.; GHOSH, B.; MOORTHY, S. M.; DAS, S. K.; ROY, G. C.; SENGUPTA, A. K. & SEN, S. K. (1998). Combining ability, gene action and heterosis through introgressive hybridization in *Bombyx mori* L. Perspective in Cytology and Genetics (Eds. G. K. Manna and S. C. Roy). AICCG Publ., Kalyani University. 9, 461-471.
- SENGUPTA, A. K.; DAS, S. K.; GHOSH, B. & RAO, P. R. T. (1999). A comprehensive package for the new mulberry silkworm hybrids. India Farming. 49(2), 22-25.

- SENGUPTA, K. . DATTA, R. K.; BISWAS, S. N. & SINGH, B. D (1971) Studies on the heretosis in multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) 1. Yield performance of F1 hybrids of Nistari and four multivoltine breeds. Ind. J. Seric. Vol. X. No. 1. 6-13.
- SENGUPTA, K. & DATTA, R. K. (1973) Studies on evolution of superior multivoltine breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. in XII-International Silk Congress, Barcelona (Spain). 1-16.
- STAM, P. & ZEVEN, A. C. (1981). The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers breed by back crossing. Euphytica. 30, 227 - 238.
- TAZIMA, Y. (1964). The Genetics of the Silkworm. Logoo Press, 174-195.
- YOUNG, N. D., ZAMIR, D., GANAL, M. W. & TANKSLEY, S. D., (1988). Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. Genetics. 120, 579 - 585.
- ZEVEN, A. C., KNOTT, R. K. & JOHNSON, R. (1983). Investigation of linkage drag in near isogenic lines of wheat by testing for seedling reaction to races of stem rust, leaf rust and yellow rust. Euphytica. 32 (2), 319 - 327.

AMELIORATION DU POIDS DE LA COQUE, UN CARACTERE MULTIGENIQUE, PAR LA MISE AU POINT D'UNE LIGNEE CONGENIQUE CHEZ LE VER A SOIE TROPICAL, *BOMBYX MORI* L.

G. K. CHATTOPADHYAY*, A. K. SENGUPTA, A. K. VERMA, S. K. SEN & B. SARATCHANDRA

Silkworm Breeding, Genetics and Molecular Biology Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore – 742 101, West Bengal, Inde.

*En sériciculture, l'exploitation de l'hétérosis pour l'amélioration des traits quantitatifs et qualitatifs est une pratique qui utilise les souches du ver à soie **Bombyx mori** L. polyvoltin × bivoltin ou vice-versa. Le pool de gènes fortement hétérogénique chez les souches de vers à soie tropicales donne des hybrides aux performances variables. Ainsi, dans cette expérience, pour la première fois en sériciculture, on a adopté une approche de lignage différente grâce à la mise au point successive d'une lignée syngénique, d'une lignée de croisement de retour récurrente (RBL) et d'une lignée congénique (Con. L.) ou d'une lignée presque isogénique (NIL) qui entraînent une amélioration du poids de la coque (SCSW), le caractère cible chez toutes les lignées, par comparaison à la population d'origine, CB5 (GP). Le caractère ciblé chez la lignée congénique ou presque isogénique est très proche de celui du bivoltin, le parent donneur (JPN9LmO). La longueur du filament du cocon, le caractère associé le plus important, a aussi considérablement augmenté tout en gardant les mêmes marquage larvaire, couleur de cocon, forme du cocon et voltinisme que ceux du polyvoltin, le parent récepteur (CB5Lm-5). De telles lignées au rendement plus élevé et à la meilleure qualité de soie pourraient être directement autorisées à être exploitées commercialement en évitant l'hybridation traditionnelle.*

INTRODUCTION

L'hybridation est la méthode la plus couramment utilisée pour l'amélioration des cultures et du bétail et cela est aussi vrai pour les vers à soie. Cette pratique a fait ressusciter la sériciculture. On sait que les hybrides hétérotiques, en général, ont une plus grande vigueur, une croissance et un développement plus rapides, un meilleur rendement, une tolérance plus élevée aux maladies, une meilleure adaptabilité dans des situations environnementales défavorables et donnent des récoltes uniformes et stables. En sériciculture, on observe que les lignées de vers à soie à rendement faible, d'origine principalement tropicale, par exemple les races polyvoltines (qui pondent généralement des œufs sans diapause) ont une tolérance aux germes bien plus élevée. D'autre part, les races de ver à soie à rendement élevé, c'est à dire les lignées mono / bivoltines pondant des œufs à diapause, qui sont d'origine tempérée et ont une qualité de soie élevée et un potentiel de rendement élevé dans des conditions tempérées ont une mauvaise tolérance aux germes et une mauvaise adaptabilité (Chattopadhyay et Chatterjee, 1990) quand on les élève dans des conditions tropicales. Cela est devenu un frein majeur à l'adoption de la sériciculture bivoltine dans les pays tropicaux comme l'Inde. En

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

général, on préfère les hybrides inter-régionaux en croisements uniques aux poly hybrides (Sengupta et coll., 1971 ; Sengupta et Datta, 1973 ; Raju et Krishnamurthy, 1984 ; Bhargava et coll., 1993 ; Rao et coll., 1998 ; Sengupta et coll., 1999). L'hybridation, en tant que telle, est en vogue, le problème clé en Inde est que le pool génique est très hétérogène, ce qui donne une variation quantitative et qualitative plus élevée chez les hybrides, et des résultats insuffisants.

Pour surmonter cette difficulté, nous présentons dans cet article une approche de lignage avec un croisement de retour, qui consiste en la mise au point d'une lignée congénique (Young et coll., 1988 ; Zeven et coll., 1983) qui présente une amélioration (Allard, 1960) pour le poids de la coque (SCSW), c'est à dire pour la teneur en soie du cocon, le caractère le plus désiré ainsi qu'une amélioration pour les autres caractères économiques associés comme le poids d'un cocon (SCW), la richesse soyeuse (SR %) et la longueur du filament par comparaison à la population d'origine, c'est à dire CB5 (GP).

MATERIELS ET METHODES

Les lignées de vers à soie JPN9 (bivoltine) et CB5 (polyvoltine) sont obtenues à la Banque Génétique (GP) de l'Institut Central de Recherche Séricicole, de Berhampore, dans le Bengale ouest. Les deux lignées sont élevées à une température de 22 à 28° C avec une humidité relative (RH) de 70 à 90 % pendant toutes les saisons d'élevage sauf de mars à juillet quand CB5 est élevé seul à 27-32° C avec une H. R. de 50 à 60 %. Pendant toutes les périodes d'élevage, les larves sont nourries avec des feuilles fraîches d'une variété de mûrier *Morus alba* locale populaire améliorée (S1) trois fois par jour. Les lignées sont exposées à une photopériode de 12 heures de lumière : 12 heures d'obscurité pendant l'élevage. On procède à une sélection continue sur le plan phénotypique (marquage larvaire, couleur et forme du cocon) et sur le plan physiologique (durée de la mue aux différentes étapes du développement, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} âges et période de maturation pour le filage). Sur cette base on sépare certaines lignées de CB5 (GP) et de JPN9 (GP) pour mettre au point des lignées syngéniques.

Tous les produits chimiques ont été achetés à E. Merck, à Mumbai, en Inde, pour l'étude des isozymes d'enzymes importantes comme l'amylase, l'estérase, la phosphatase alcaline et acide etc. pour mettre au point des lignées syngéniques et aussi pour les trier ultérieurement. On prélève 20 à 25 larves de chaque lignée le 5^{ème} jour du 5^{ème} âge et on les fait jeûner pendant une heure. Avant le recueil individuel du liquide digestif, chaque larve est exposée à des vapeurs de chloroforme pendant un temps bref. Au moment où les larves vomissent, on recueille le liquide digestif dans un tube eppendorf glacé enduit d'EDTA à 1 % pour conserver les activités enzymatiques. Les échantillons sont centrifugés à 2511 × g pendant 10 minutes à 4° C. Le surnageant est recueilli dans un tube enduit d'EDTA et stocké immédiatement à -20° C jusqu'à ce qu'il soit à nouveau utilisé.

En perçant les fausses pattes de larves du 5^{ème} jour du 5^{ème} âge avec une aiguille stérilisée, les échantillons d'hémolymphe de chaque larve de chaque lignée sont recueillis séparément dans des tubes eppendorf glacés enduits de phénylthiourée à 0,1 % (PTU) pour empêcher la mélanisation. Les pattes avant blessées sont refermées immédiatement avec de la paraffine liquide pour éviter qu'elles ne saignent plus et pour conserver les larves vivantes pour l'élevage et le tri. Le surnageant est recueilli dans un tube eppendorf enduit de PTU à 0,1 %, après la même centrifugation que pour le liquide digestif et immédiatement stocké à -20° C pour être utilisé ultérieurement.

Dix µl de chaque échantillon sont placés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 7,7 % en suivant les techniques du Laboratoire PHARMACIA en utilisant un système Electrophorétique de Gel Vertical Pharmacia GE-24. L'électrophorèse est réalisée avec une intensité de courant initiale de 1 mA suivie par 2,5 mA à 500 volts pendant 3 heures jusqu'à ce que le colorant témoin atteigne le bas du gel. A la fin, on procède à différentes réactions de substrats pour les différentes enzymes déjà mentionnées et elles sont répertoriées dans un Système de Documentation de Gel (GDS7600—UVP Ltd., U. K.).

Les larves vivantes possédant une homogénéité de bande de l'isozyme pour chaque enzyme sont sélectionnées ensemble dans chaque lignée pour chaque génération successive et on les accouple entre

frères sœurs pendant 15 générations pour obtenir des lignées syngéniques (Fig. 1). Après fixation comme lignées syngéniques, CB5Lm-5 (le parent récepteur) et JPN9LmO (le parent donneur), renommés après la 15^{ème} génération, sont utilisés pour l'introgression des gènes du poids de coque élevé en croisant les parents récepteur et donneur c'est à dire, CB5Lm-5 × JPN9LmO. Dans le croisement (F1), on ne sélectionne que les cocons au poids de coque élevé, c'est à dire ceux qui sont plus proches du parent donneur, mesures avec une balance Sartorius (IP-65), Japon et dont les autres caractères phénotypiques comme le marquage larvaire, la forme et la couleur du cocon et le voltinisme sont comme ceux du parent récepteur. Après cela, des croisements consécutifs de retour sont réalisés pendant 10 à 15 générations de la même manière et finalement on réalise un accouplement frères sœurs entre les papillons mâles et femelles ayant émergé des larves à l'homogénéité maximum, proche de celle du parent récepteur et dont le poids de coque est plus élevé, plus proche de celui du parent donneur, ce qui donne un croisement de retour (Fig. 2). Comme le caractère cible n'apparaît pas dans le croisement de retour, on procède à un deuxième croisement entre le parent donneur et le croisement de retour, utilisé comme parent récepteur et le même protocole de croisement de retour récurrent (Fig. 2) est suivi de manière à mettre au point une lignée congénique qui exprime le caractère cible comme le parent donneur (JPN9LmO). Après cela, on procède à un élevage en masse pendant différentes saisons pour évaluer les caractères quantitatifs de ces lignées.

Les six caractères quantitatifs pris en compte sont i) le poids (g) d'un cocon (SCW) ii) le poids (g) d'une coque (SCSW),

iii) la richesse soyeuse (% SR) qui est calculée comme suit :

$$\frac{\text{Poids d'une coque (SCSW)}}{\text{Poids d'un cocon (SCW)}} \times 100$$

iv) Le rendement / 10 000 larves (au poids en kg) est calculé comme suit,

$$\frac{\text{Poids total (kg) des cocons recueillis}}{\text{Nombre total de larves conservées après la 3ème mue}} \times 10000$$

v) Longueur d'un filament (m) et

vi) Titre (un nombre indiquant le poids en g de 9000 mètres de filament de soie) calculé comme suit :

$$\frac{\text{Poids du filament de cocon (g)}}{\text{Longueur du filament de cocon (m)}} \times 9000 \text{ m}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

L'introgression du gène(s) du poids de coque plus élevé - un trait multigénique du parent donneur JPN9LmO, transmis au parent récepteur CB5Lm-5 par croisement, le croisement de retour continu avec le récepteur et l'accouplement frères-sœurs après onze générations permettent d'obtenir un croisement de retour et une lignée congénique. Dans cette expérience, grâce à la transgression, la lignée congénique montre une amélioration très significative ($p < 0.001$) à un niveau désiré qui est très proche de celui du parent donneur JPN9LmO pour le caractère cible, le poids d'une coque, quand on réalise le test "t" en gardant CB5 (GP) comme témoin (Tableau I) (Fig. 4). Cette lignée montre aussi une amélioration des autres caractères économiques associés comme le poids d'un cocon (SCW), la richesse soyeuse (%) (dans les deux cas significatif au seuil de 0,1 %) et la longueur du filament comparés à CB5 (GP), CB5Lm-5 et au croisement de retour (Fig. 3 et 5, Tableau I). On a remarqué une amélioration même au niveau phénotypique pour la taille du cocon chez les lignées mises au point

(Fig. 6). Comme le rendement est un produit final multiplicateur de tous ces éléments, il montre aussi des valeurs plus élevées (Tableau I).

Le pool génique du ver à soie tropical est très hétérogène. Il devient donc difficile de retracer le niveau d'introgression d'un gène ou des gènes pendant la mise au point du croisement de retour et de la lignée congénique. Ainsi, avec cette expérience de lignage, on a essayé de baisser l'hétérogénéité du pool génique et de regrouper un gène ou des gènes favorables en mettant de côté le(s) gène(s) défavorables grâce à la mise au point de lignées syngéniques. Par conséquent, il a été possible d'introgresser les gènes du poids de coque plus élevé, que l'on sait être contrôlé(s) par les polygènes (Tazima, 1964) du parent donneur au parent récepteur grâce à la mise au point d'une lignée congénique, en gardant les autres caractères proches de ceux du parent récepteur (Fig. 4, Tableau I). La transgression du poids de la coque dans la lignée congénique est confirmée par l'analyse de la fréquence de distribution (Fig. 4) et par le test "t" avec le même caractère chez le témoin (Tableau I). Ces paramètres particuliers, c'est à dire le SCSW, le SCW et la richesse soyeuse (%) dans la même lignée se sont améliorés et s'avèrent être beaucoup plus élevés que ceux de CB5 (GP), de CB5Lm-5, du croisement de retour et très proches de ceux du parent donneur bivoltin (JpN9LmO). Cependant l'introgression de n'importe quel caractère quantitatif dépend d'un certain nombre de facteurs : l'hérédité du trait, le nombre de gènes impliqués, les interactions des gènes et la distribution des gènes dans le génome (Ooijen, 1992).

Cette expérience indique clairement la possibilité d'introgression des gènes désirés du parent donneur par le croisement de retour répété pendant 11 à 15 générations, suivi par l'accouplement frères-sœurs qui permettent la formation de la lignée de croisement de retour. La lignée de croisement de retour ne donne pas un poids de coque au niveau désiré, elle est donc à nouveau croisée en retour avec le parent donneur bivoltin (JPN9LmO) et ensuite on procède à un croisement de retour récurrent avec la lignée de croisement de retour, en l'utilisant comme parent récepteur pendant 11 générations et on procède finalement à un accouplement frères-sœurs pour mettre au point une lignée congénique.

L'explication génétique possible de la rétention des gènes du parent donneur dans la lignée congénique peut très bien s'expliquer comme on l'a suggéré par le fait que " quand les gènes sont transférés à un cultivar par un croisement de retour pendant la production de NILs, les gènes du parent donneur pourraient être retenus pour deux raisons — (1) après plusieurs croisements de retour, un gène qui est indépendant du gène transféré pourrait toujours être présent par hasard (Allard, 1960) et (2) de plus, un segment du chromosome donneur entourant le gène transféré est susceptible d'être retenu à cause de la liaison génétique. La rétention des gènes donneurs due à cette liaison génétique a été appelée " l'inconvénient de la liaison génétique " (Zeven et coll., 1983 et Brinkman et Frey, 1977). La longueur du segment de chromosome transféré dépend de plusieurs facteurs tels que le site du locus sur le chromosome et du nombre de croisements de retour (Stam et Zeven, 1981). La lignée congénique peut donner une soie de bonne quantité comme la soie bivoltine tout en conservant son polyvoltinisme dans les conditions tropicales. La lignée pourrait donc en tant que telle être utilisée au plan commercial en évitant la technique d'hybridation conventionnelle.

CONCLUSION

La méthode de croisement de retour est bien établie et largement utilisée dans le lignage des plantes pour mettre au point une NIL ou une lignée Congénique en prenant un seul gène en considération pour la résistance à la maladie ou pour obtenir une teneur en protéines élevée ou une teneur en huiles élevée. Mais jusqu'à présent, il n'a pas été signalé que l'on pouvait l'appliquer à un trait multigénique chez un animal ou un insecte. Pour la première fois, on a essayé d'introgresser un trait multigénique, le poids de coque plus élevé, du donneur au récepteur par la mise au point d'une lignée congénique ou presque isogénique. Cette lignée pourrait directement recevoir une autorisation d'exploitation commerciale sans avoir recours aux techniques anciennes de l'hybridation.

A COMPARATIVE STUDY ON THE METABOLIC RATES IN THE PUPAE OF THE THREE VOLTINE VARIETIES OF THE TROPICAL TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

S. SATAPATHY* & A. MITTRA**

School of Life Sciences, Sambalpur University Jyoti Vihar – 768 019, Sambalpur, Orissa, India.

A comparative study on the rates of O₂ consumption during development in uni, bi and tri-voltine pupae of the tropical tasar silkworm A. mylitta D. was conducted on day 60, 45, 30 and 15 prior to emergence (PED). The results indicated a gradual increasing trend in their rates of metabolism in all the three voltine pupae from PED 60 to PED 15 through PED 45 and 30. However, comparing the specific rates of O₂ consumption in each voltine variety for each of the days measured, indicated highly significant differences ($P < 0.001$) among all the three varieties. The lowest metabolic rate was observed in the univoltine, whereas the highest was observed in the trivoltine variety with reference to all the days of measurement. The result indicated an inverse relationship between O₂ consumption not only with pupal weight but also with the duration of the pupal life span.

Keywords: *Antheraea mylitta* D., cocoons, pupae, voltinism, metabolic rate, pre-emergence days (PED).

INTRODUCTION

Metabolism is an inherent trait of all living organisms. Metabolism is expressed in terms of O₂ consumed, heat produced or CO₂ liberated. O₂ is necessary in order to provide energy for life processes. The availability of O₂ imposes limits on distribution and survival of animals (Prosser, 1973).

Rate of O₂ consumption is influenced by activity, temperature, nutrition, body size, and stages in life cycle, sex, season and time of day as well as previous O₂ experience and genetic background. Basal metabolism represents the O₂ consumption for maintenance only. Animals with adequate glycogen and fat reserves maintain a fairly constant level of standard metabolism during prolonged starvation. Holometabolous insects show a gradual increase in metabolic rate during larval development then rapid drop in early pupal life followed by a rise prior to emergence as adults. This "U" shaped metabolic curve has been reported in many insects such as *Tenebrio*, *Drosophilla*, etc. (Dobzhansky *et al.*, 1935).

An important modifier of metabolism is the amount of environmental O₂. Many animals are metabolic conformers, i.e. they increase O₂ utilization in proportion to available O₂ and at normal atmospheric levels they do not metabolise to capacity (Prosser, 1973).

The rate of uptake of O₂ by an organism and efficient respiratory exchange depends on the gradient of concentration between the organisms and the layer of the medium that immediately

* Senior Research Officer, Central Silk Board, Govt. of India, Kerai, Sundargarh, Orissa, India.

** Address for correspondence: School of Life Sciences, Sambalpur University, Jyoti Vihar – 768019, Sambalpur, Orissa, India.

surrounds it, i.e. moist respiratory surface and continuous replacement of O₂ that is taken up from the medium (Barrington, 1981). Works on insect respiration have been done by many workers like Jolly and Ferrari, 1960; Axelsson, 1977; Mackey, 1970; Bursell and Taylor, 1980; Edward and Wightman, 1984; Coelho and Moore, 1989; Punzo and Thomson, 1990 in the past and reviewed by workers like Buek, 1962 and Miller, 1966.

The Tasar Silk worm *A. mylitta* a non-mulberry sericigenous species is mostly confined to tropical belts of India where physical factors like temperature, humidity, wind velocity, photoperiod, etc. fluctuate widely during different seasons. It passes through a period of slow development during pupal phase. O₂ requirement during this phase of development has not been studied in this species particularly in relation to voltinism. This species exhibits at least three distinct patterns of life cycle so far as the time duration of one generation is concerned. This is referred to as voltinism. The three voltine varieties are quite conspicuous and distinct in relation to the duration of this stage of development during the pupal phase of its life cycle. The duration of pupal phase in the three voltine varieties, i.e. uni, bi and tri are about 10 months, 7 months and 5 months, respectively (Jolly *et al.*, 1968; Behura and Panda, 1980).

The pupal phase in any holometabolous insect is a stage of slow and gradual biochemical as well as morphogenetic changes. Both synthesis and degradation of several cellular and molecular components continue during this period, solely from the reserve materials, which are already present. Histolysis of the pre-existing tissues and histogenesis for preadult structures is a slow and important on going event during the late pupal phase of development. A comparative biochemical study of the haemolymph in bivoltine and trivoltine pupae of *A. mylitta* during development has been studied (Mohanty and Mittra, 1988).

Information on the respiratory physiology of *A. mylitta* during pupal stages and particularly in relation to voltinism is scanty till date. Measurements of larval metabolism and larval energetics in this species had earlier been done in this laboratory (Mohanty and Mittra, 1992). An attempt has therefore been made in the present work to measure the O₂ consumption rates in the pupae of the three voltine varieties of *A. mylitta* D. in order to compare their metabolic rates.

MATERIAL AND METHODS

Experimental materials :

Sufficient numbers of cocoons with live pupae of different voltine varieties of *A. mylitta* D. were procured from Sundargarh district of Orissa, India (21° 28' N latitude and 84° 04' E longitude). The cocoons collected from natural habitat through the Research Station of Central Silk Board, were brought to the laboratory and kept in different meshes iron cages and were acclimated with the laboratory conditions i.e. 25 ± 2° C, 60 ± 5 R. H. and 12 hour photoperiod.

Measurement of respiration:

The respiration of different voltine of pupae were measured by an indigenously designed respirometer in this laboratory with some modifications of the manometer and manometric fluid (Rao and Pattanaik, 1973; Hurkat and Mathur, 1974). Live pupae with their cocoons were kept inside the glass metabolic chamber containing pure O₂ and having provisions to keep sodalime (Ca(OH)₂ + NaOH in 1:1 ratio) and KOH inside the jar so as to absorb water vapour and CO₂ respectively. This was then connected to the "U"-shaped manometric tube filled with toluene as the manometric fluid. The change in the height of the fluid in the calibrated "U" tube gave the equivalent to the volume of O₂ consumed by the pupae per unit time. The jar at the point of all joints of the tubes and at the margin of the lid was made airtight by applying grease after inserting the cocoons with pupae inside. A thermometer was also set in the respirometer to indicate the actual temperature of the metabolic chamber at the time of observations. The readings of the displacement of the manometric fluid were noted at regular intervals of 10 minutes and five sets of consecutive readings were taken for each

group of pupae. Eight cocoons of each voltine variety picked at random were taken per group. The soda lime and KOH were renewed in the metabolic chamber after respiratory measurements of each batch of pupae. Three replicates for each batch of each voltine variety were used in this experiment. The body weights of each experimental pupae were measured after completion of the experiment using Mettler monopan electronic balance, model-AE 163. The O_2 consumption was expressed in μl of O_2 / g tissue / h. The data were analysed using student's "t" test to compare the metabolic rates of three voltine varieties. The experiments were repeated for PED 60, 45, 30, 15 (pre-emergence day) old pupae of all the three varieties in order to estimate and compare their trend of O_2 consumption in relation to their development and age.

RESULTS AND DISCUSSION

It was observed that in all the three-voltine varieties of pupae irrespective of the differences of weight and size, the O_2 consumption rates increased gradually from pre-emergence day (PED) 60 to PED 15. The results indicated a slow, gradual and significant increasing trend in their metabolic rates as they approached emergence.

The trivoltine pupae, which were smallest among the three varieties, has a much higher O_2 consumption rate than the bi and uni voltines, on all the four days of measurement. Their rate of O_2 consumption were $8.62 \pm 0.036 \mu l$, $8.95 \pm 0.06 \mu l$, $10.69 \pm 0.03 \mu l$, and $13.75 \pm 0.055 \mu l$ / g tissue / h on PED 60, 45, 30 and 15, respectively. The univoltine showed a low metabolism, their rates of O_2 consumption on PED 60, 45, 30 and 15 being $2.39 \pm 0.026 \mu l$, $2.48 \pm 0.043 \mu l$, 2.58 ± 0.026 and $3.12 \pm 0.036 \mu l$ / g tissue / h, respectively. These were significantly lower as compared to the trivoltine (Table I). The bivoltines showed a relatively moderate metabolic rate as compared to the tri and uni-voltines, their O_2 consumption rates on PED 60, 45, 30 and 15 being $4.28 \pm 0.2 \mu l$, $4.45 \pm 0.036 \mu l$, $4.65 \pm 0.112 \mu l$ and $6.46 \pm 0.036 \mu l$ / g tissue / h, respectively (Table I, Fig 1).

Table I. Rate of O_2 consumption in the three voltine varieties of *A. mylitta* D. (value expressed as mean $\pm$ S. D.).

*Tableau I. Taux de consommation d' O_2 chez les trois variétés à voltinisme différent de *A. mylitta* D. (les valeurs exprimées sont la moyenne et l'écart type).*

Sl. No.	P.E.D. in day	μl of O_2 / g body weight / h consumed		
		Univoltine	Bivoltine	Trivoltine
		μl d' O_2 / g / h.		
<i>No. de série</i>	<i>Jours avant l'émergence</i>	<i>Monovoltin</i>	<i>Bivoltin</i>	<i>Trivoltin</i>
1	60	2.39 ± 0.026	4.28 ± 0.02	8.62 ± 0.036
2	45	2.48 ± 0.043	4.45 ± 0.036	8.95 ± 0.06
3	30	2.58 ± 0.026	4.65 ± 0.112	10.69 ± 0.03
4	15	3.12 ± 0.036	6.46 ± 0.036	13.75 ± 0.055

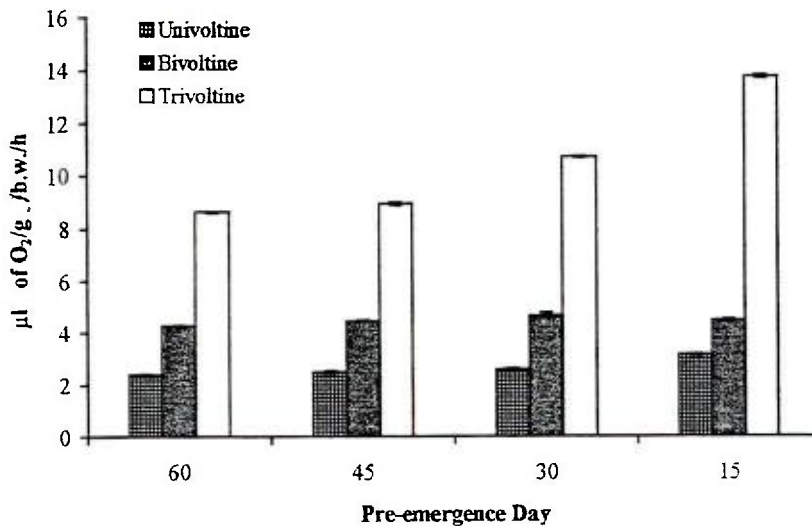


Fig. 1. Oxygen consumption during pupal development of three voltine varieties of tasar silkworm, *A. mylitta* D. on PED 60, 45, 30 and 15.

Fig. 1. Consommation d'oxygène pendant le développement nymphal de trois variétés à voltinisme différent du ver à soie tasar *A. mylitta* D. 60, 45, 30 et 15 jours avant l'émergence.

The pupal phase in this holometabolous insect is a stage of slow development. During this phase of life cycle, the insect solely depends on the reserved substrates for its energy requirements. Several slow and gradual morphogenetic changes take place as the pupa approaches emergence. Both synthesis and degradation of various cellular and molecular components take place during this period. Histolysis of the pre-existing tissues and histogenesis for adult structures are carried on at the expense of energy obtained from oxydation of the reserve substrates using O₂ from its immediate surroundings (Pandian, 1987). This phase being an important phase of differentiation and the processes being slow and gradual ones, the rate of O₂ consumption in general is much lower as compared to its larval stages. The larval metabolism and energetics have been worked out in details in this species (Mohanty and Mittra, 1992).

The time of emergence for the last crop of trivoltine and bivoltine coincide with that of univoltine. Hence, in this experiment cocoons of these varieties of bivoltine and trivoltine have selectively been taken for comparison with the univoltine keeping the time of emergence i.e. PED "0" as the reference point.

Our results in these lines show distinctly similar trends of O₂ consumption in all the three varieties, this may be due to enhanced anabolic and morphogenetic activities going on within the puparium. However, the significant differences observed on each day of measurement between the three varieties clearly indicate a difference in their rate processes and have a consequent influence in their oxygen requirement. The result also indicate higher O₂ consumption in trivoltine, intermediate O₂ consumption in bivoltine and relatively lesser consumption in univoltine, expressed in µl / gm weight / hour.

Table II. Statistical significance values for all the three voltine varieties (comparison).**Tableau II. Seuils statistiques de signification pour les trois variétés (comparaison).**

Voltinism	60 Vs 45 days	45 Vs 30 days	30 Vs 15 days	60 Vs 15 days
<i>Voltinisme</i>	<i>60 contre 45 jours</i>	<i>45 contre 30 jours</i>	<i>30 contre 15 jours</i>	<i>60 contre 15 jours</i>
Univoltine / monovoltin	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.001
Bivoltine / bivoltin	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.001
Trivoltine / trivoltin	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001

Table III. Statistical significance values for all the three voltine varieties (an intervoltine comparison).**Tableau III. Seuils statistiques de signification pour les trois variétés (comparaison entre variétés).**

Periods	Univoltine vs. bivoltine	Bivoltine vs. trivoltine	Trivoltine vs. univoltine
<i>Périodes</i>	<i>Monovoltin par rapport à bivoltin</i>	<i>Bivoltin par rapport à trivoltin</i>	<i>Trivoltin par rapport à monovoltin</i>
Day 60 / 60 jours	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
Day 45 / 45 jours	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
Day 30 / 30 jours	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
Day 15 / 15 jours	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001

The general trend of an increase in the O₂ consumption rate in all the three varieties from PED 60 to PED 15 through 45 and 30, clearly indicate an increasing demand of O₂ as the process of metamorphosis advances and as the pupae approaches emergence. On the other hand a highly significant difference (Table II) in the metabolic rates of the three voltine pupae with reference to each of the days of measurement indicate that in this species an inverse relation of O₂ consumption and the pupal size do exist. This difference in O₂ consumption rates in the voltine varieties also indicate

a highly significant (Table III) relationship with the duration of their pupal life. The longest pupal duration observed, in the univoltine (~ 300 days), consumes lowest amount of O_2 / g / h among the three, whereas the bivoltine pupal duration being intermediate (~ 200 days) shows a moderate O_2 consumption rate and trivoltine having the shortest pupal duration (~ 140 days) consumed the highest amount of O_2 on each day of measurement. This may possibly be due to the difference in their metabolic and morphogenetic rate processes, which directly affected their oxygen demand and O_2 uptake rate during this stage of life cycle.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Central Silk Board, Govt. Of India for granting study leave to the first author. Thanks are due to J. Mishra, Research Scholar, School of life Sciences for his assistance and H.O.D., School of Life Sciences for providing necessary facilities.

REFERENCES

- AXELSSON B., 1977. Applicability of laboratory measure of Bio energetic efficiency, *Zoon* 5: 147-156.
- BARRINGTON E. J. W., 1981. Invertebrate structure and function, 2nd edn., English language book society and Nelson, 4, Britain.
- BEHURA B. K. & PANDA M. M., 1980. Utilisation of tasar silk resources in Orissa. *Pranikee, Journal of Zoological Society of Orissa*.
- BUCK J. 1962. Some physical aspect of insect respiration, *A. Rev. Ent.* 7: 27-6.
- BURSELL E. & TAYLOR P. 1980. An energy budget for *Glossina* (Diptera), *Bull. Entomol. Res.*, 70: 187-196.
- COELHO J. R. & MOORE A. J. 1989. Allometry on resting metabolic rate in cockroach. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94 A(4): 587-590.
- DOBZHANSKY T. & POULSEN D. F. 1953. O_2 consumption by *Drosophila* pupae. *Ztschr. Vergl. Physiol.*, 22: 473-478.
- EDWARD P. B. & WRIGHTMAN J. A., 1984. Energy and nitrogen budget for larval and adult coleoptera feeding on Eucalyptus. *Oecologia*, 6: 302-310.
- HURKAT P. C. & MATHUR P. N., 1974 A simple indigenously designated metabolizer. *Ind. J. Expt. Biol.*, 12: 579-580.
- JOLLY M. S. & FERRARI A., 1960. Comparative study on oxygen uptake in cockroaches. *Genetica Argaric*, 13(1-2) : 199-211.
- MACKY A.P., 1978. Growth and bioenergetic of the moth (Grunberg). *Oecologia*, 32: 368-376.
- MILLER P. L. 1966. The regulation of breathing in insect, *Adv. Ins. Physiol.*, 3: 279-344.
- MOHANTY A. K. & MITTRA A., 1988. A comparative biochemical study of haemolymph of pupae on tasar silkworm during development. *Sericologia* 28(1): 125-132.
- MOHANTY A. K. & MITTRA A. 1992. Food utilisation efficiency of tropical tasar silkworm, *Phytophaga*, 4: 73-80.
- PANDIAN T. J. & VERNBERG S. F. J., 1987. Animal energetic. Vol. I Academic Press, Inc, New York.
- PROSSER C. L. 1973. Comparative animal physiology. 3rd edn., W. B. Saunders Company, London.
- PUNZO R. & THOMON D., 1990. Effect of temperature and acid stress on metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95(A): 69-72.
- RAO K. L. & PATTANAIK B. K., 1973. Correlation between body weight snout to vent length, tail girth and metabolic rate in garden lizard. *Exp. Geront.*, 8: 173-176.

ETUDE COMPARATIVE DES TAUX DE METABOLISME CHEZ LES NYMPHES DE TROIS VARIETES A VOLTINISME DIFFERENT CHEZ LE VER A SOIE TASAR TROPICAL, *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

S. SATAPATHY * & A. MITTRA **

School of Life Sciences, Sambalpur University, Jyoti Vihar – 768 019, Sambalpur, Orissa, Inde.

*Nous avons réalisé une étude comparative sur les taux de consommation d'O₂ pendant le développement de nymphes mono, bi et trivoltines du ver à soie tropical tassar *A. mylitta* D. 60, 45, 30 et 15 jours avant l'émergence (PED). Les résultats indiquent une tendance à une augmentation progressive de leurs taux de métabolisme chez toutes les nymphes de 60 à 15 jours avant l'émergence et de 45 et 30 jours avant l'émergence. Cependant, en comparant les taux spécifiques de consommation d'O₂ chez chaque variété pour chacun des jours mesurés, on constate des différences très significatives ($P < 0,001$) chez les trois variétés. Le taux de métabolisme le plus bas est observé chez les monovoltins, tandis que le taux le plus élevé est observé chez la variété trivoltine tous les jours. Il existe une relation inverse entre la consommation d'O₂ non seulement avec le poids nymphal mais aussi avec la durée de la vie nymphale.*

INTRODUCTION

Le métabolisme est un trait inhérent à tous les organismes vivants. Le métabolisme est exprimé en termes de consommation d'O₂, de production de chaleur ou de libération de CO₂. L'O₂ est nécessaire pour fournir de l'énergie pour les processus vitaux. La disponibilité en O₂ impose des limites à la distribution et à la survie des animaux (Prosser, 1973).

Le taux de consommation d'O₂ est influencé par l'activité, la température, la nutrition, la taille corporelle, les étapes du cycle de vie, le sexe, la saison et la période de la journée ainsi que par le statut antérieur et le contexte génétique. Le métabolisme de base représente la consommation d'O₂ qui n'est destinée qu'à l'entretien seul. Les animaux avec des réserves adéquates en glycogène et en graisses conservent un niveau assez constant de métabolisme standard pendant un jeûne prolongé. Les insectes holométaboles présentent une augmentation progressive du taux de métabolisme pendant le développement larvaire puis une baisse rapide au début de la vie nymphale, suivie par une augmentation avant l'émergence au stade adulte. Cette courbe métabolique en forme de "U" existe chez de nombreux insectes tels que *Tenebrio*, *Drosophilla*, etc. (Dobzhansky et coll., 1935).

La quantité d'O₂ dans l'environnement modifie de manière importante le métabolisme. De nombreux animaux se conforment au plan métabolique, c'est à dire qu'ils augmentent leur utilisation d'O₂ en fonction de l'O₂ disponible et à des niveaux atmosphériques normaux ils ne métabolisent pas complètement (Prosser, 1973).

* Senior Research Officer, Central Silk Board, Govt. Of India, Kerai, Sundargarh, Orissa, Inde.

** Adresse de correspondance : School of Life Sciences, Sambalpur University, Jyoti Vihar – 768019, Sambalpur, Orissa, Inde.

Le taux d'absorption d'O₂ par un organisme et un échange respiratoire efficace dépendent du degré de concentration entre les organismes et de la couche de milieu qui les entoure immédiatement, c'est à dire de la surface respiratoire humide et du remplacement continu d'O₂ prélevé dans le milieu (Barrington, 1981). De nombreux scientifiques ont fait des recherches sur la respiration des insectes tels que Jolly et Ferrari 1960 ; Axelsson, 1977 ; Mackey, 1970 ; Bursell et Taylor, 1980 ; Edward et Wightman, 1984 ; Coelho et Moore, 1989 ; Punzo et Thomson, 1990 et des revues ont été faites par des chercheurs comme Buck, 1962 et Miller, 1966.

Le ver à soie tassar *A. mylitta* une espèce séricigène non-mûrier se confie principalement aux régions tropicales indiennes où les facteurs physiques comme la température, l'humidité, la vélocité du vent, la photopériode, etc., fluctuent énormément pendant les différentes saisons. Il passe par une période de développement lent pendant la phase nymphale. Le besoin en O₂ pendant cette phase de développement n'a pas été étudié plus particulièrement par rapport au nombre de mues chez cette espèce. Cette espèce présente au moins trois types distincts de cycle de vie en ce qui concerne la durée d'une génération. C'est ce qu'on appelle le nombre de mues. Les durées de développement pendant la phase nymphale sont assez marquées et distinctes chez les trois variétés à voltinisme différent. La durée de la phase nymphale chez les trois variétés, c'est à dire chez les variétés mono, bi et trivoltines est d'environ respectivement 10 mois, 7 mois et 5 mois (Jolly et coll., 1968, Behura et Panda, 1980).

La phase nymphale chez n'importe quel insecte holométabole est une étape pendant laquelle des changements biochimiques et morphogénétiques lents et progressifs ont lieu. La synthèse et la dégradation de plusieurs composants cellulaires et moléculaires continuent pendant cette période, uniquement à partir des matériaux en réserve, déjà présents. L'histolyse des tissus pré-existants et l'histogénèse des structures avant l'âge adulte est un processus lent, important et continu à la fin du stade nymphal. Une étude biochimique comparative de l'hémolymph a été réalisée chez des nymphes d'*A. mylitta* bivoltines et trivoltines pendant leur développement (Mohanty et Mittra, 1988). Jusqu'à présent il existe peu d'information sur la physiologie respiratoire d'*A. mylitta* pendant les stades nymphaux et particulièrement par rapport au nombre de mues. Des mesures du métabolisme larvaire et de l'utilisation de l'énergie au stade larvaire ont déjà été faites chez cette espèce par ce laboratoire (Mohanty et Mittra, 1992). Nous avons donc essayé dans cette étude de mesurer les taux de consommation d'O₂ chez les nymphes *A. mylitta* D. des trois variétés à mue différente de manière à comparer leur taux de métabolisme.

MATERIELS ET METHODES

Matériels d'expérimentation :

Nous nous sommes procurés un nombre suffisant de cocons avec des nymphes vivantes *A. mylitta* D. de variétés à voltinisme différent dans la région de Sudargarh, dans l'Orissa en Inde (21° 28' N de latitude et 84° 04' E de longitude). Les cocons recueillis dans un habitat naturel de la Station de Recherche du Central Silk Board, sont amenés au laboratoire et conservés dans différentes cages grillagées et sont acclimatés aux conditions du laboratoire, c'est à dire à 25 ± 2° C, 60 ± 5 H. R. et 12 heures de photopériode.

Mesure de la respiration :

La respiration des nymphes à voltinisme différent est mesurée avec un respiromètre conçu dans ce laboratoire avec quelques modifications en ce qui concerne le fluide manométrique et le manomètre (Rao et Pattanaik, 1973 ; Hurkat et Mathur, 1974). Les nymphes vivantes et leurs cocons sont conservés à l'intérieur d'un récipient métabolique en verre contenant de l'O₂ pur et avec des provisions de chaux sodée (Ca(OH)₂ + NaOH dans un rapport 1 : 1) et de KOH à l'intérieur du bocal de manière à absorber respectivement les vapeurs d'eau et le CO₂. Il est ensuite connecté au tube manométrique en forme de " U " rempli de toluène comme fluide manométrique. Le changement de la hauteur du

fluide dans le tube en "U" calibré donne l'équivalence du volume d'O₂ consommé par les nymphes par unité de temps. Le bocal est rendu hermétique à tous les endroits où les tubes débouchent et au niveau du couvercle en appliquant de la graisse après avoir inséré les cocons et leurs nymphes à l'intérieur. On place aussi un thermomètre dans le respiromètre pour indiquer la température réelle du récipient métabolique au moment des observations. Les lectures concernant le déplacement du fluide manométrique sont notées à intervalles réguliers toutes les 10 minutes et cinq lectures consécutives sont prises pour chaque groupe de nymphes. Huit cocons de chaque variété sont pris au hasard par groupe. La chaux sodée et le KOH sont renouvelés dans le récipient métabolique après les mesures respiratoires de chaque lot de nymphes. Dans cette expérience, on utilise trois répétitions pour chaque lot de chaque variété. Les poids de chaque nymphe sont mesurés à la fin de l'expérience en utilisant une balance électronique monopan Mettler, modèle AE 163. La consommation d'oxygène est exprimée en $\mu\text{l d'O}_2 / \text{g tissu} / \text{h}$. Les données sont analysées en utilisant le test "t" de Student pour comparer les taux de métabolisme des trois variétés à voltinisme différent. Les expériences sont répétées chez des nymphes de 60, 45, 30 et 15 jours avant l'émergence chez les trois variétés afin d'estimer et de comparer leur taux de consommation d'O₂ par rapport à leur développement et à leur âge.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe que les taux de consommation d'O₂ augmentent progressivement chez les nymphes des trois variétés, entre soixante et quinze jours avant l'émergence, quelles que soient les différences de poids et de taille. Les résultats indiquent une augmentation lente, progressive et significative des taux de métabolisme alors qu'elles approchent de l'émergence.

Les nymphes trivoltines, qui sont les plus petites parmi les trois variétés, ont un taux de consommation d'O₂ bien plus élevé que les bivoltines et les monovoltines, pendant les quatre jours de mesures. Leur taux de consommation d'O₂ est de $8,62 \pm 0,036 \mu\text{l}$, $8,95 \pm 0,06 \mu\text{l}$, $10,69 \pm 0,03 \mu\text{l}$, et $13,75 \pm 0,055 \mu\text{l} / \text{g tissu} / \text{h}$ 60, 45, 30, et 15 jours avant l'émergence respectivement. Les monovoltins ont un faible métabolisme, leurs taux de consommation d'O₂ 60, 45, 30 et 15 jours avant l'émergence étant de $2,39 \pm 0,026 \mu\text{l}$, $2,48 \pm 0,043 \mu\text{l}$, $2,58 \pm 0,026 \mu\text{l}$ et $3,12 \pm 0,036 \mu\text{l} / \text{g tissu} / \text{h}$ respectivement. Ils sont significativement plus faibles par comparaison aux trivoltins (Tableau I). Les bivoltins ont un taux métabolique relativement modéré comparé aux trivoltins et aux monovoltins, leur taux de consommation d'O₂ 60, 45, 30 et 15 jours avant l'émergence étant respectivement de $4,28 \pm 0,2 \mu\text{l}$, $4,45 \pm 0,036 \mu\text{l}$, $4,65 \pm 0,112 \mu\text{l}$ et $6,46 \pm 0,036 \mu\text{l} / \text{g de tissu} / \text{h}$ (Tableau I, Fig. 1).

La phase nymphale chez cet insecte holométabole est un stade de développement lent. Pendant cette phase de son cycle de vie, l'insecte dépend seulement des substrats en réserve pour ses besoins en énergie. Plusieurs changements morphogénétiques lents et progressifs ont lieu alors que la nymphe se rapproche de l'émergence. La synthèse et la dégradation de plusieurs composants cellulaires et moléculaires prennent place pendant cette période. L'histolyse des tissus pre-existants et l'histogenèse des structures adultes se font aux dépens de l'énergie obtenue par l'oxydation des substrats en réserve en utilisant l'O₂ de l'entourage immédiat (Pandian, 1987). Cette phase étant une phase importante de différenciation et les processus étant lents et progressifs, le taux de consommation d'O₂ en général est plus bas que pendant les stades larvaires. Le métabolisme et la dépense énergétique larvaires ont été calculés en détail chez cette espèce (Mohanty et Mittra, 1992).

La période d'émergence de la dernière récolte chez les trivoltins et les bivoltins coïncide avec celle des monovoltins. Ainsi, dans cette expérience, les cocons des variétés bivoltines et trivoltines ont été pris sélectivement pour être comparés avec les monovoltins, en gardant la période d'émergence, c'est à dire le jour de l'émergence comme point de référence "0".

Nos résultats avec ces lignées montrent des tendances similaires de consommation d'O₂ chez les trois variétés, cela pourrait être dû à l'accélération des activités anaboliques et morphogénétiques se produisant à l'intérieur du puparium. Cependant, les différences significatives observées chaque jour

de mesure entre les trois variétés indiquent clairement une différence des taux qui ont une influence conséquente par rapport à leur besoin en oxygène. Le résultat indique aussi une consommation d'O₂ plus élevée chez les trivoltins, une consommation intermédiaire d'O₂ chez les bivoltins et une consommation relativement moindre chez les monovoltins, exprimée en µl / g de poids / heure.

La tendance générale à l'augmentation du taux de consommation d'O₂ chez les trois variétés 60 jours à 15 jours et 45 à 30 jours avant l'émergence indique clairement une augmentation du besoin en O₂ alors que le processus de la métamorphose avance et alors que la nymphe approche de l'émergence. D'autre part, il existe une différence très significative (Tableau II) entre les taux métaboliques chez les trois types de nymphes chaque jour de mesure qui indique que chez cette espèce, il existe une relation inverse entre la consommation d'O₂ et la taille de la nymphe. Cette différence entre les taux de consommation d'O₂ chez les différentes variétés à mue indique aussi une relation très significative (Tableau III) par rapport à la durée de leur vie nymphale. La durée nymphale la plus longue est observée chez le monovoltin (~ 300 jours), qui consomme la quantité la moins importante d'O₂ / g / h, tandis que la durée nymphale du bivoltin est intermédiaire (~ 200 jours) avec un taux de consommation d'O₂ modéré et que les trivoltins ont la durée nymphale la plus courte (~ 140 jours) et consomment la quantité d'O₂ la plus élevée chaque jour de mesure. Cela est probablement dû à la différence entre les taux de processus métabolique et morphogénétique, qui affectent directement leur besoin en oxygène et le taux d'absorption d'O₂ pendant cette période du cycle de vie.

EVALUATION OF COMBINING ABILITY IN HYBRIDS BETWEEN LOW, MEDIUM AND HIGH COCOON WEIGHT POLYVOLTINE AND BIVOLTINE BREEDS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

RAVINDRA SINGH*, D. RAGHAVENDRA RAO, V. PREMALATHA, B. K. KARIAPPA, K. P. JAYASWAL & R. K. DATTA

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

*General and specific combining abilities of low, medium and high cocoon weight polyvoltine and bivoltine breeds of *Bombyx mori* were evaluated by analysing ten quantitative characters. Six polyvoltine and three bivoltine breeds were used as lines and testers respectively. Evaluation of the performance of polyvoltine and bivoltine breeds for ten quantitative characters revealed that among the lines, PM and Nistari, possessing low cocoon weights, were found to be good general combiners for cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight whereas BL24 and BL43, possessing high cocoon weights, were found good general combiners for cocoon shell weight and cocoon shell ratio. Among the testers, CSR2, having a high cocoon weight, was found a good general combiner for cocoon weight and cocoon shell weight. The ratio of GCA: SCA in most of the economic characters were found more than 1 demonstrating predominant role of additive gene action. The hybrid BL24 × J2 exhibited significant positive SCA effects for pupal weight, shell weight and floss %. Most of the hybrids revealed positive SCA effects for several quantitative characters.*

Keywords: Combining ability, polyvoltine × bivoltine hybrids, low, medium and high cocoon weight, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

Analysis of combining ability has been extensively carried out to know promising parents and hybrids for designing and formulating efficient breeding plans during breeding of plants (Sprague and Tatum, 1942; Baker, 1978, Kaushik *et al.*, 1984; Lal *et al.*, 1999) and animals (Eisen *et al.*, 1983, Crusio, 1987, Falconer, 1988). Attempts have been made on the analysis of combining ability in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* to identify promising F1 hybrids between polyvoltine × polyvoltine (Krishnaswami *et al.*, 1964; Pershad *et al.*, 1986; Kantaratanakul *et al.*, 1987; Chatterjee *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1998), polyvoltine × bivoltine (Datta and Pershad, 1988; Tayade, 1989; Kalpana and Sreerama Reddy, 1998), bivoltine × bivoltine (Mingguan, 1982; Gamo, 1983; Gamo and Hirabayashi, 1983; Sohn and Hong, 1986; He *et al.*, 1989; Subba Rao and Sahai, 1989; Kumar *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994; Moon and Han, 1994; Bhargava *et al.*, 1995; Naseema Begum *et al.*, 1997; Malik *et al.*, 1999; Ravindra Singh *et al.*, 2000) and in bivoltine × univoltine silkworm breeds (Petkov, 1975; Petkov *et al.*, 1984). Performance of F1 hybrids depends upon proper selection of suitable parents and genetic divergence between them. In the present study, an attempt has been made to evaluate general and specific combining abilities in F1 hybrids between low, medium and high cocoon weight

* For future correspondence.

polyvoltine and bivoltine silkworm breeds in order to identify promising F1 hybrids for commercial exploitation.

MATERIALS AND METHODS

Six polyvoltine breeds i.e., Pure Mysore and Nistari (low cocoon weight 0.9 -1.0 g), MY1 and GNP (medium cocoon weight 1.1 -1.2g) and BL24 and BL43 (high cocoon weight 1.3 - 1.4g) and 3 bivoltine breeds i.e, J2 (low 1.4 - 1.5 g), NB4D2 (medium 1.6 - 1.7 g) and CSR2 (high 1.8 - 1.9 g) were used as lines and testers respectively to raise 18 hybrids. Rearing of hybrids along with their parents were done with three replications each and 300 larvae were retained in each replication. Data were recorded for 10 quantitative characters such as fecundity, hatching %, larval span, cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight, cocoon weight, pupal weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio and floss percentage. General combining ability of lines and testers and specific combining ability of hybrids were analysed as per Kempthorne (1957) by using the following formulae:

1. General combining ability:

$$a) \text{ Lines } g_i = \frac{X_i}{tr} - \frac{X}{ltr}, i = 1 \text{ to } l$$

$$b) \text{ Testers } g_j = \frac{X_j}{lr} - \frac{X}{ltr}, j = 1 \text{ to } t$$

2. Specific combining ability:

$$\text{Hybrids } S_{ij} = \frac{X_{ij}}{r} - \frac{X_i}{tr} - \frac{X_j}{lr} + \frac{X}{ltr}$$

Where

g_i = General combining ability of lines

g_j = General combining ability of testers

S_{ij} = Specific combining ability of hybrids

l = Number of lines

t = Number of testers

r = Number of replications

X_i = Performance of i^{th} line with 't' testers

X_j = Performance of j^{th} tester with 'l' lines

X_{ij} = Performance of $(i \times j)^{\text{th}}$ hybrid

X = Grand total

RESULTS

Percent contribution of lines, testers and line $\times$ tester is given in Table I. Maximum percent contribution of lines was exhibited for floss percentage (92.77%), followed by cocoon yield / 10,000 larvae by number (92.14%) and total larval span (89.48%). Contribution of tester was less for most of the characters except cocoon weight, pupal weight and cocoon shell weight. Maximum contribution of line $\times$ tester was exhibited for pupal weight (38.78%), followed by cocoon shell ratio (29.06%) and fecundity (20.45%).

Table I. Percent contribution of lines, testers and line $\times$ testers for different characters in the silkworm, *Bombyx mori*.

Tableau I. Contribution en pourcentage des lignées, des races de référence et des lignées $\times$ races de référence pour différents caractères chez le ver à soie Bombyx mori.

Source	Fecundity Hatching %		Larval span	Yield /10,000 larvae		Cocoon weight	Pupal weight	Shell weight	SR %	Floss %
				by no.	by wt.					
	<i>Fécondité</i>	<i>%</i>	<i>Durée</i>	<i>Rendement</i>		<i>Poids du</i>	<i>Poids de</i>	<i>Poids de</i>	<i>Richesse</i>	<i>% de</i>
	<i>d'éclosion</i>		<i>larvaire</i>	<i>/ 10 000 larves</i>		<i>cocon</i>	<i>la nymphe</i>	<i>la coque</i>	<i>soyeuse</i>	<i>blaze</i>
				<i>en nbre</i>	<i>en poids</i>					
Lines / <i>Lignées</i>	78.72	61.12	89.48	92.14	68.26	17.49	11.41	37.91	62.15	92.77
Testers / <i>Races de référence</i>	0.83	16.90	3.88	0.54	24.67	71.74	49.81	42.56	8.79	0.74
Line × testers / <i>Lignées × races</i> <i>de référence</i>	20.45	21.98	6.64	7.32	7.07	10.77	38.78	19.53	29.06	6.49

General Combining Ability (GCA) effects:

General combining ability (GCA) effects in six lines and three testers with respect to their quantitative characters are presented in Table II. Analysis of GCA effects of lines demonstrated that PM exhibited positive GCA effects for all of the economic characters except hatching %, followed by BL43 for five important characters, i.e., fecundity, hatching %, cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio. Different lines have shown significant GCA effects for different characters. PM showed significant effect for fecundity, cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight and floss %, MY1 for fecundity and hatching %, GNP for larval span, Nistari for larval span, yield / 10,000 larvae both by number and weight, BL24 for cocoon shell weight and cocoon shell ratio and

BL43 for hatching %, cocoon shell weight and cocoon shell ratio (Table II). Among the testers, CSR2 exhibited positive GCA effects for all the quantitative traits except cocoon yield / 10,000 larvae by number, followed by NB4D2 for five important characters, i.e., cocoon yield / 10,000 larvae by weight, cocoon weight, pupal weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio. Significant GCA effects were shown by CSR2 for cocoon weight and cocoon shell weight.

Table II. GCA (General Combining Ability) effects of parental silkworm breeds for different economic characters.

Tableau II. Effets GCA (Aptitude à la Combinaison Générale) de lignées de vers à soie parentales pour différents caractères économiques.

Source	Fecun -dity	Hatching %	Larval span	Yield/10,000 larvae		Cocoon weight	Pupal weight	Shell weight	SR %	Floss %
				by no.	by wt.					
	<i>Fécondité</i>	<i>% d'éclosion</i>	<i>Durée larvaire</i>	<i>Rendement / 10 000 larves</i>		<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la nymphe</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>% de blaze</i>
				<i>en nbre</i>	<i>en poids</i>					
Lines / Lignées										
PM	34.926*	-1.267	35.444	466.70*	1.339**	0.047	0.044	0.010	0.066	3.419**
Nistari	-52.185	0.322	-8.556**	962.93**	1.191**	-0.036	-0.020	-0.024	-1.047	-0.831
MY1	46.926**	1.267*	-3.222	-18.52	-0.069	-0.001	-0.004	-0.006	-0.398	0.249
GNP	-26.407	-0.489	-13.889**	-311.19	-1.017	-0.053	-0.010	-0.019	-0.574	-2.012
BL24	-28.185	-0.733	-5.222	-555.52	-0.717	0.023	0.005	0.017*	0.823*	-0.772
BL43	24.926	0.900*	-4.556	-544.41	-0.728	0.020	-0.015	0.022*	1.130**	-0.052
Testers / Races de référence										
J2	-4.796	0.200	-2.556	55.59	-0.794	-0.098	-0.061	-0.025	-0.373	-0.131
NB4D2	-0.259	-0.656	-2.222	-7.46	0.328	0.033	0.040	0.007	0.043	-0.081
CSR2	4.537	0.456	4.778	-48.13	0.467	0.065*	0.022	0.019*	0.331	0.211

*, ** Significantly different at 5% and 1% level respectively / *, ** Significativement différent au seuil de respectivement 5 % et 1 %.

Table III. SCA (Specific Combining Ability) effects of silkworm crosses for different economic characters.

Tableau III. Effets SCA (Aptitude à la Combinaison Spécifique) pour différents caractères économiques lors de croisements entre vers à soie.

Hybrids	Fecundity	Hatching %	Larval span	Yield / 10,000 larvae		Cocoon weight	Pupal weight	Shell weight	SR %	Floss %
				by no.	by wt.					
Hybrides	Fécondité	% d'éclosion	Durée larvaire	Rendement / 10 000 larves		Poids du cocon	Poids de la nymphe	Poids de la coque	Richesse soyeuse	% de blaze
				en nbre	en poids					
PM × J2	0.463	-0.578	3.222	14.85	0.039	0.017	-0.044	-0.002	-0.316	0.319
PM × NB4D2	-4.259	0.211	2.889	-211.09	0.005	0.010	0.014	0.006	0.235	-0.117
PM × CSR2	3.796	0.367	-6.111	196.24	-0.044	-0.026	0.030	-0.004	0.081	0.431
Nistari × J2	12.574	0.800	-2.778	-70.37	-0.146	0.005	0.029	0.008	0.397	0.219
Nistari × NB4D2	-4.148	-1.344	-3.111	37.02	0.220	0.017	-0.014	0.005	0.077	0.016
Nistari × CSR2	-8.426	0.544	5.889	33.35	-0.074	-0.022	-0.015	-0.012	-0.474	0.236
MY1 × J2	-15.204	-0.344	-8.111	211.07	-0.065	-0.046	-0.036	-0.021	-0.812	-0.151
MY1 × NB4D2	23.741	0.378	-0.444	-314.87	-0.609	-0.007	-0.033	0.006	0.465	0.103
MY1 × CSR2	27.463	-0.033	8.556	103.79	0.674	0.003	0.069	0.015	0.347	0.048
GNP × J2	36.463	-0.089	2.556	103.74	0.306	0.009	-0.025	0.001	-0.022	0.311
GNP × NB4D2	-12.593	0.067	2.222	155.46	0.094	-0.005	0.008	-0.010	-0.542	0.107
GNP × CSR2	-23.870	0.022	-4.778	-259.20	-0.400	-0.004	0.017	0.009	0.564	-0.418
BL24 × J2	-5.759	-0.244	5.889	-129.59	0.272	0.050	0.075*	0.029**	1.240	0.867*
BL24 × NB4D2	-0.482	0.944	-4.444	177.79	0.106	-0.014	-0.029	-0.014	-0.729	-0.183
BL24 × CSR2	6.241	-0.700	-1.444	-48.20	-0.378	-0.035	-0.046	-0.015	-0.511	-0.681
BL43 × J2	7.463	0.456	-0.778	-129.70	-0.405	-0.034	0.001	-0.016	-0.487	-0.933
BL43 × NB4D2	-2.259	-0.256	2.889	155.69	0.183	-0.001	0.055	0.008	0.494	0.074
BL43 × CSR2	-5.204	-0.200	-2.111	-25.98	0.222	-0.036	-0.056	0.008	-0.007	0.859*

*, ** Significantly different at 5 % and 1% level respectively / *, ** Significativement différent au seuil de respectivement 5 % et 1 %.

Specific combining ability (SCA) effects :

Specific combining ability (SCA) effects in eighteen hybrid combinations have been presented in Table III. Among the hybrids, MY1 × CSR2 was found good specific combiner exhibiting positive SCA effects for all the economic characters except hatching %, followed by PM × NB4D2, Nistari × J2, GNP × J2, BL24 × J2 and BL43 × NB4D2, showing positive SCA effects for seven characters. The hybrid BL24 × J2 possessed significant SCA effects for pupal weight, cocoon shell weight and floss %, whereas BL43 × CSR2 showed significant SCA effect only for floss %.

DISCUSSION

The main aim of this study was to identify silkworm parents / hybrids through analysis of combining ability in F1 hybrids between low, medium and high cocoon weight polyvoltine and bivoltine breeds. Among the lines, PM (low cocoon weight) exhibiting GCA effects for nine quantitative characters demonstrated that for inheritance of these characters, additive gene is playing major role. Similar results have been reported by many workers (Gamo and Hirabayashi, 1983; Pershad *et al.*, 1986; Datta and Pershad, 1988; Subba Rao and Sahai, 1989; Rao *et al.*, 1998; Ravindra Singh *et al.*, 2000). None of the parents was found good general combiner for all the quantitative characters. Different lines exhibited significant GCA effects for different quantitative characters. PM showed significant GCA effects for fecundity, cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight and floss %. Nistari (low cocoon weight) was good combiner for larval span, cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight. MY1 (medium cocoon weight) was a good combiner for fecundity and hatching %. GNP (medium cocoon weight) was good combiner for larval span only. BL24 (high cocoon weight) was a good combiner for cocoon shell weight and cocoon shell ratio. BL43 (high cocoon weight) was good combiner for hatching %, cocoon shell weight and cocoon shell ratio. Among testers, CSR2 (high cocoon weight) was good combiner for cocoon weight and cocoon shell weight. The results are in agreement with that of Satenahalli *et al.*, 1989, 1990; Jeong *et al.*, 1986; 1990; Sohn and Hong, 1986; Rajalakshmi *et al.*, 1997). Efficient breeding programmes can be formulated for the improvement of specific quantitative characters by utilising PM and Nistari for cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight, MY1 for fecundity and BL24 and BL43 for cocoon shell weight and cocoon shell ratio. Similar results have been reported by Kumar *et al.*, (1994) and Bhargava *et al.*, (1995). According to Mingguan (1982) GCA effects are suitable to identify either silkworm parents for utilizing in breeding programmes or F1 hybrids for commercial exploitation.

The specific combining ability values analysed for eighteen hybrids revealed that the hybrid MY1 × CSR2 exhibited positive SCA effects for all the characters except for hatching %, followed by PM × NB4D2, Nistari × J2, GNP × J2, BL24 × J2 and BL43 × NB4D2, expressing positive effects for seven characters. Kalpana and Sreerama Reddy (1998) observed similar SCA effects in polyvoltine × bivoltine hybrid MU953 × NB18. In the present study, the hybrid BL24 × J2 was found good specific combiner expressing significant SCA effects for pupal weight, cocoon shell weight and floss %, whereas BL43 × CSR2 was found superior specific combiner for floss percentage demonstrating the presence of dominant genes controlling these characters. Predominant role of non-additive gene action for cocoon weight and cocoon shell weight has been reported (Krishnaswami *et al.*, 1964; Sengupta *et al.*, 1974; Pershad *et al.*, 1986; Datta and Pershad, 1988, Bhargava *et al.*, 1992; 1995). Kumar *et al.*, (1994) have observed very good SCA effects for filament length in crosses involving bivoltine silkworm breeds.

Based on the analysis of general and specific combining abilities, it is concluded that the lines with low cocoon weight (PM and Nistari) having significant GCA effects for cocoon yield / 10,000 larvae both by number and weight and lines with high cocoon weights (BL24 and BL43) having significant GCA effects for cocoon shell weight and cocoon shell ratio, can be used for further improvement of the above specific characters. Among testers, CSR2 with high cocoon weight, was found good combiner for cocoon weight and cocoon shell weight. The ratio of GCA: SCA in most of

the quantitative characters studied were found to be higher than 1 indicating that additive gene action was more prominent than the non-additive ones. Prominent role of additive gene action has been confirmed by many workers in silkworm (Petkov, 1975; Satenahalli *et al.*, 1989; Sarkar *et al.*, 1991). Some F1 hybrids, i.e., PM $\times$ NB4D2, Nistari $\times$ J2, MY1 $\times$ CSR2, GNP $\times$ J2 and BL43 $\times$ NB4D2, found promising on the basis of expression of positive SCA effects for several economic characters, can be exploited on commercial scale.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Mrs M. Rekha, SRO, Statistics, CSRTI, Mysore for analysing the data.

REFERENCES

- BAKER R. J. (1978) Issues in diallel analysis. *Crop Sci.* 18: 533-536.
- BHARGAVA S. K., MAJUMDAR M. K., DATTA R. K. (1995) Combining ability of seven silk technological characters in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, *Boll Zool.* 62: 359-362.
- BHARGAVA S. K., THIAGARAJAN V., RAMESH BABU, M. NAGARAJ B. (1992) Combining ability and genetic analysis of quantitative traits in silkworm (*Bombyx mori* L.) *J. Genet. Breed.* 46: 327-330.
- CHATTERJEE S. N., RAO P. R. M., JAYASWAL K. P., RAVINDRA SINGH, DATTA R. K. (1993) Genetic variability in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. breeds with low silk yield. *Indian J. Seric.* 32(1): 69-86.
- CRUSIO W. E. (1987) A note on the analysis of reciprocal effects in diallel crosses *J. Genet.* 66(3): 177-185.
- DATTA R. K., PERSHAD G. D. (1988) Combining ability among multivoltine $\times$ bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids. *Sericologia* 28(1): 21-29.
- EISEN E. J., HORSTGEN-SCHWARK G., SAXTON A. M., BANDY T. R. (1983) Genetic interpretation and analysis of diallel crosses with animals. *Theor. Appl. Genet.* 65: 17-23.
- FALCONER D. S. (1988) Introduction to quantitative genetics. 3rd Edn. Longman, London.
- GAMO T. (1983) Recent concepts and trends in silkworm breeding. *Farming Japan*, 10(6): 11-22.
- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis for growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori* L. *Japan J. Breed.* 33: 178-190.
- HE K., MENG Z., YU B., XIA J., YE (1989) Genetic analysis of the inheritance of pupation rate and some traits of cocoon from diallel crosses of the silkworm, *Bombyx mori* L. lines. *Acta Agric. Zhejiang* 1(1): 32-38.
- JEONG W. B., CHANG K. Y., HAN K. S., KIM J. H., RYU K. D., CHUNG H. Y., RYU S. C. (1986) Genetic analysis by diallel crosses in F1 generation of silkworm, *Bombyx mori*. *Korean J. Seric. Sci.* 28: 24-29.
- JEONG W. B., CHOI J. S., BAE K. S., SOHN H. D. (1990) Heterosis, inbreeding depression and combining ability of bave characters in silkworm by diallel crosses. *Res. Rep. Korean Agric. Tech. Res. Inst. Dong A. Univ. Korea* 11(1): 49-56.
- KALPANA G. V., SREERAMA REDDY (1998) Studies on the combining ability of the new multivoltine race MU953 with tropical bivoltine races. *Sericologia* 38(2): 309-316.
- KANTARATANAKUL S., THARVORNANUKULKIT C., WONGTHONG S., AREONYING S., CAMPIRANON, A. SAKSOONG P. (1987) Diallel crosses with polyvoltine strains of Thai silkworm (*Bombyx mori* LINN) *Sericologia* 27(2): 279-286.
- KAUSHIK L. S., SINGH D. P., PARODA R. S. (1984) Line $\times$ tester analysis for fixed effect model in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 68: 487-491.
- KEMPTHORNE O. (1957) An introduction to genetic statistics, New York, John Wiley and Sons Inc., London. Chapman and Hall Ltd. pp 208-341.
- KRISHNASWAMI S., JOLLY M. S., SUBBA RAO G. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine race of silkworm. *Indian J. Genet.* 101: 213-222.

- KUMAR P., BHUTIA R., AHSAN M. M. (1994) Combining ability analysis for filament length and some quantitative traits in bivoltine mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.). Indian J. Genet. 54(3): 253-257.
- LAL S. S., SINGH I. P., VISHWAJEET (1999) Heterosis and combining ability analysis for resistance to Pod fly and Lepidopteran borers in pigeon pea (*Cajanus cajan*). Indian J. Agric. Sci. 69(11): 786-788.
- LIU Q., SUN J., ZHANG W. (1994) Combining ability analysis and cross selection in nine silkworm varieties. J. Shanglong Agric. Univ. 25: 207-212.
- MALIK G. N., MASOODI M. A., KAMILI A. S., AIJZ M. (1999) Combining ability analysis over environments in diallel crosses of bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) Indian J. Serie 38(1) 22-25.
- MINGGUAN Y. (1982) Studies on combining ability and heterosis of quantitative characters of *Bombyx mori*. Canye Kexue 8(4): 193-198.
- MOON B. W., HAN K. S. (1994) The test of combining ability and heterosis on the silkworm (*Bombyx mori*) breeding. Korean J. Serie. 36: 8-25.
- NASEEMA BEGUM A., BHARGAVA S. K., AHSAN M. M., DATTA R. K., RAO D. R. (1997) Line $\times$ tester analysis for economic characters in the bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Korean J. Serie. 39: 205-209.
- PERSHAD G. D., DATTA R. K., VIJAYKUMAR H. V., BHARGAVA S. K., JOLLY M. S. (1986) Combining ability in multivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 26: 307-315.
- PETKOV N. (1975) Investigation on the combining ability of some inbred lines of *Bombyx mori* L. Genet. Sel. 8: 128-136.
- PETKOV N., NACHEVA I., MLADENOV G., AKIMENKO L., BRASLAVSKIYA M., STOTSKIY M., SHICHUKIN A. R. (1984) Evaluation of the combining ability of promising Bulgarian and Ukrainian silkworms (*Bombyx mori*) L. breeds. 2. On the basis of diallel cross breeds. Anim. Sci. 21: 100-107.
- RAJALAKSHMI E., CHAUHAN T. P. S., THIAGRAJAN L., LAKSHMANAN V., KAMBLE C. K. (1997) Line $\times$ tester analysis of combining ability in new genotypes of bivoltine silkworm (*Bombyx mori*). Indian J. Agric. Sci. 67(7): 287-290.
- RAO P. R. M., RAVINDRA SINGH, JAYASWAL K. P., CHATTERJEE. S. N., DATTA R. K., (1998) Evaluation of some Indian and exotic low yielding silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds through diallel cross and its significance for sericulture in dry-zones. J. Ent. Res. 22: 23-33.
- RAVINDRA SINGH, KALPANA G. V., RAO P. S., AHSAN, M. M. DATTA, R. K. REKHA M. (2000) Studies on combining ability and heterosis in the silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Serie. 39(1): 43-48.
- SARKAR A., DAS N. K., DAS B. C. (1991) Diallel cross analysis of cocoon weight in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 31(2): 301-306.
- SATENAHALLI S. B., GOVINDAN R., GOUD J. V. (1989) Genetic analysis of some quantitative traits by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 29: 333-342.
- SATENAHALLI S. B., GOVINDAN R., GOUD J. V., MUGDAM S. B. (1990) Genetic parameters and correlation co-efficient analysis in silkworm (*Bombyx mori* L.). Mysore J. Agric. Sci. 24: 491-495.
- SENGUPTA K., YUSUF M. R., GROVER S. P. (1974) Hybrid vigour and genetic analysis of quantitative traits in the silkworm. Indian Genet. SABRAO. 43a: 249-256.
- SOHN K. W., HONG K. W. (1986) Combining ability test of silkworm varieties by top cross. Res. Rep. Rul. Develop. Admin. Agric. Farm Manag. Serie. 28: 66-70.
- SPRAGUE G. F., TATUM L. A. (1942) General vs specific combining ability in single crosses of corn. J. Am. Soc. Agron. 34: 923-932.
- SUBBA RAO G., SAHAI V. (1989) Combining ability and heterosis studies in bivoltine strains of the silkworm, *Bombyx mori* L. Uttar Pradesh J. Zool. 9: 152-164.
- TAYADE D. S. (1989) Genetic architecture of economic traits in some strains of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Combining ability analysis. Sericologia 29(1): 43-60.

EVALUATION DE L'APTITUDE A LA COMBINAISON CHEZ LES HYBRIDES ENTRE LES LIGNEES DE VERS A SOIE *BOMBYX MORI* L. POLYVOLTINES ET BIVOLTINES A POIDS DE COCON FAIBLE, MOYEN ET ELEVE

RAVINDRA SINGH*, D. RAGHAVENDRA RAO, V. PREMALATHA, B. K. KARIAPPA,
K. P. JAYASWAL & R. K. DATTA

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

Les aptitudes à la combinaison spécifique et générale des lignées de Bombyx mori polyvoltines et bivoltines à poids de cocon faible, moyen et élevé ont été évaluées en analysant dix caractères quantitatifs. Six lignées polyvoltines et trois bivoltines ont été utilisées respectivement comme lignées et races de référence. L'évaluation de la performance de lignées polyvoltines et bivoltines pour dix caractères quantitatifs révèle que parmi les lignées, PM et Nistari, aux poids de cocons faibles, s'avèrent être de bons recombinaisons généraux pour le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids tandis que BL24 et BL43 qui ont des poids de cocons élevés, s'avèrent être de bons recombinaisons généraux pour le poids de la coque et la richesse soyeuse. Parmi les races de référence, CSR2, au poids de cocon élevé, s'avère être un bon recombinaison général pour le poids du cocon et le poids de la coque. Le ratio GCA : SCA pour la plupart des caractères économiques s'élève à plus de 1, ce qui montre le rôle prédominant de l'action de gènes additifs. L'hybride BL24 × J2 présente des effets SCA positifs significatifs pour le poids nymphal, le poids de la coque et le % de blaze. La plupart des hybrides révèlent des effets SCA positifs pour plusieurs caractères quantitatifs.

INTRODUCTION

On a abondamment analysé l'aptitude à la combinaison pour connaître les parents et les hybrides prometteurs afin de concevoir et mettre au point des plans de lignage efficaces chez les plantes (Sprague et Tatum, 1942 ; Baker, 1978, Kaushik et coll., 1984 ; Lal et coll., 1999) et les animaux (Eisen et coll., 1983, Crusio, 1987, Falconer, 1988). Des essais ont été entrepris sur l'analyse de l'aptitude à la combinaison chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* pour identifier des hybrides F1 prometteurs entre les polyvoltins × polyvoltins (Krishnaswami et coll., 1964 ; Pershad et coll., 1986 ; Kantaratanakul et coll., 1987 ; Chatterjee et coll., 1993 ; Rao et coll., 1998), les polyvoltins × bivoltins (Datta et Pershad, 1988 ; Tayade, 1989 ; Kalpana et Sreerama Reddy, 1998), les bivoltins × bivoltins (Mingguan, 1982 ; Gamo, 1983 ; Gamo et Hirabayashi, 1983 ; Sohn et Hong, 1986 ; He et coll., 1989 ; Subba Rao et Sahai, 1989 ; Kumar et coll., 1994 ; Liu et coll., 1994 ; Moon et Han, 1994 ; Bhargava et coll., 1995 ; Naseema Begum et coll., 1997 ; Malik et coll., 1999 ; Ravindra Singh et coll., 2000) et chez les lignées de vers à soie bivoltins × monovoltins (Petkov, 1975 ; Petkov et coll., 1984). La performance des hybrides F1 dépend de la sélection correcte de parents adaptés et de la divergence génétique entre eux. Dans cette étude, on a essayé d'évaluer les aptitudes à la combinaison générale et spécifique des hybrides F1 entre les lignées de ver à soie bivoltines et polyvoltines à poids de cocon

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

faible, moyen et élevé de manière à identifier des hybrides F1 prometteurs pour l'exploitation commerciale.

MATERIELS ET METHODES

Six lignées polyvoltines c'est à dire Pure Mysore et Nistari (poids de cocon faible 0,9 à 1 g), MY1 et GNP (poids de cocon moyen 1,1 à 1,2 g) et BL24 et BL43 (poids de cocon élevé 1,3 à 1,4 g) et 3 lignées bivoltines, c'est à dire J2 (faible 1,4 à 1,5 g), NB4D2 (moyen 1,6 à 1,7 g) et CSR2 (élevé 1,8 à 1,9 g) sont utilisées comme lignées et races de référence respectivement pour obtenir 18 hybrides. L'élevage des hybrides et de leurs parents se fait en trois répétitions pour chacun d'eux et 300 larves sont retenues dans chaque répétition. Les données sont enregistrées pour 10 caractères quantitatifs tels que la fécondité, le % d'éclosion, la durée larvaire, le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids, le poids du cocon, le poids nymphal, le poids de la coque, la richesse soyeuse et le pourcentage de blaze. L'aptitude générale à la combinaison des lignées et des races de référence et l'aptitude à la combinaison spécifique des hybrides est analysée d'après Kempthorne (1957) en utilisant la formule suivante :

1) Aptitude à la combinaison générale :

$$a) \text{ Lignées } g_i = \frac{X_i}{tr} - \frac{X}{ltr}, i = 1 \text{ to } l$$

$$b) \text{ Races de référence } g_j = \frac{X_j}{lr} - \frac{X}{ltr}, j = 1 \text{ to } t$$

2) Aptitude à la combinaison spécifique :

$$\text{Hybrides } S_{ij} = \frac{X_{ij}}{r} - \frac{X_i}{tr} - \frac{X_j}{lr} + \frac{X}{ltr}$$

où

g_i = Aptitude générale à la combinaison des lignées

g_j = Aptitude générale à la combinaison des races de référence

S_{ij} = Aptitude à la combinaison spécifique des hybrides

l = Nombre de lignées

t = Nombre de races de référence

r = Nombre de répétitions

X_i = Performance de la i ème lignée avec les races de référence "t"

X_j = Performance de la j ème race de référence avec les lignées "l"

X_{ij} = Performance de l'hybride ($i \times j$)^{ème}

X = Somme totale

RESULTATS

Le pourcentage de contribution des lignées, des races de référence et des lignées $\times$ races de référence est présenté dans le Tableau I. Le pourcentage de contribution maximum des lignées est enregistré pour le pourcentage de blaze (92,77 %), suivi par le rendement en cocons / 10 000 larves en nombre (92,14 %) et la durée larvaire totale (89,48 %). La contribution de la race de référence est moindre pour la plupart des caractères sauf pour le poids du cocon, le poids de la nymphe et le poids de la coque. La contribution maximum pour le croisement lignée $\times$ race de référence se produit pour le poids de la nymphe (38,78 %), suivi par la richesse soyeuse (29,06 %) et la fécondité (20,45 %).

Effets de l'Aptitude à la Combinaison Générale (GCA) :

Les effets de l'aptitude à la combinaison générale (GCA) de six lignées et trois races de référence par rapport à leurs caractères quantitatifs sont présentés dans le Tableau II. L'analyse des effets GCA des lignées montre que PM a des effets GCA positifs pour tous les caractères économiques sauf pour le % d'éclosion, suivi par BL43 pour cinq caractères importants tels que la fécondité, le % d'éclosion, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse. Les différentes lignées présentent des effets GCA significatifs pour différents caractères. PM présente un effet significatif pour la fécondité, le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids et pour le % de blaze, MY1 pour la fécondité et le % d'éclosion. GNP pour la durée larvaire, Nistari pour la durée larvaire et le rendement / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids, BL24 pour le poids de la coque et la richesse soyeuse et BL43 pour le % d'éclosion, le poids de la coque et la richesse soyeuse (Tableau II). Parmi les races de référence, CSR2 présente des effets GCA positifs pour tous les traits quantitatifs sauf pour le rendement en cocons / 10 000 larves en nombre, suivi par NB4D2 pour cinq caractères importants, c'est à dire le rendement en cocons / 10 000 larves en poids, le poids du cocon, le poids de la nymphe, le poids de la coque et la richesse soyeuse. CSR2 présente des effets GCA significatifs pour le poids du cocon et le poids de la coque.

Effets de l'aptitude à la combinaison spécifique (SCA) :

Les effets de l'aptitude à la combinaison spécifique (SCA) chez dix huit combinaisons d'hybrides sont présentés dans le Tableau III. Parmi les hybrides, MY1 $\times$ CSR2 s'avère un bon recombinaut spécifique présentant des effets SCA positifs pour tous les caractères économiques sauf pour le % d'éclosion, suivi par PM $\times$ NB4D2, Nistari $\times$ J2, GNP $\times$ J2, BL24 $\times$ J2 et BL43 $\times$ NB4D2, qui ont des effets SCA positifs pour sept caractères. L'hybride BL24 $\times$ J2 présente des effets SCA significatifs pour le poids de la nymphe, le poids de la coque et le % de blaze tandis que BL43 $\times$ CSR2 ne montre un effet SCA significatif que pour le % de blaze.

DISCUSSION

Le principal but de cette étude est d'identifier des vers à soie parents / hybrides par l'analyse de l'aptitude à la combinaison des hybrides F1 obtenus à partir de lignées bivoltines et polyvoltines à poids de cocon faible, moyen et élevé. Parmi les lignées, PM (poids de cocon faible) présentant des effets GCA pour neuf caractères quantitatifs montre que pour l'hérédité de ces caractères, le gène additif joue un rôle majeur. D'autres chercheurs ont obtenu des résultats similaires (Gamo et Hirabayashi, 1983 ; Pershad et coll., 1986 ; Datta et Pershad, 1988 ; Subba Rao et Sahai, 1989 ; Rao et coll., 1998 ; Ravindra Singh et coll., 2000). Aucun des parents ne s'avère un bon recombinaut général pour tous les caractères quantitatifs. Les différentes lignées présentent des effets GCA significatifs pour différents caractères quantitatifs. PM montre des effets GCA significatifs pour la fécondité, le rendement en cocons pour 10 000 larves à la fois en nombre et en poids et pour le % de blaze. Nistari (poids de cocon faible) est un bon recombinaut pour la durée larvaire, le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids. MY1 (poids de cocon moyen) est un bon

recombinant pour la fécondité et le % d'éclosion. GNP (poids de cocon moyen) n'est un bon recombinaut que pour la durée larvaire. BL24 (poids de cocon élevé) est un bon recombinaut pour le poids de la coque et la richesse soyeuse. BL43 (poids de cocon élevé) est un bon recombinaut pour le % d'éclosion, le poids de la coque et la richesse soyeuse. Parmi les races de référence, CSR2 (poids de cocon élevé) est un bon recombinaut pour le poids du cocon et le poids de la coque. Les résultats confirment ceux de Satenahalli et coll., 1989, 1990 ; Jeong et coll., 1986 ; 1990 ; Sohn et Hong, 1986 ; Rajalakshmi et coll., 1997). On peut formuler des programmes de lignage efficaces pour l'amélioration des caractères quantitatifs spécifiques en utilisant PM et Nistari pour le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids, MY1 pour la fécondité et BL24 et BL43 pour le poids de la coque et la richesse soyeuse. Des résultats similaires ont été obtenus par Kumar et coll., (1994) et Bhargava et coll., (1995). Selon Mingguan (1982), les effets GCA conviennent pour identifier soit les vers à soie parentaux à utiliser dans des programmes de lignage soit les hybrides F1 pour l'exploitation commerciale.

Les valeurs d'aptitude à la combinaison spécifique analysées pour dix huit hybrides révèlent que l'hybride MY1 $\times$ CSR2 présente des effets SCA positifs pour tous les caractères sauf pour le pourcentage d'éclosion, suivi par PM $\times$ NB4D2, Nistari $\times$ J2, GNP $\times$ J2, BL24 $\times$ J2 et BL43 $\times$ NB4D2, qui expriment des effets positifs pour sept caractères. Kalpana et Sreerama Reddy (1998) ont observé des effets SCA similaires chez l'hybride polyvoltin $\times$ bivoltin MU953 $\times$ NB18. Dans cette étude, l'hybride BL24 $\times$ J2 s'avère un bon recombinaut spécifique exprimant des effets SCA significatifs pour le poids de la nymphe, le poids de la coque et le % de blaze, tandis que BL43 $\times$ CSR2 s'avère un recombinaut spécifique supérieur pour le pourcentage de blaze, ce qui montre la présence de gènes dominants contrôlant ces caractères. On a signalé le rôle prédominant de l'action du gène non-additif pour le poids du cocon et le poids de la coque (Krishnaswami et coll., 1964 ; Sengupta et coll., 1974 ; Pershad et coll., 1986 ; Datta et Pershad, 1988, Bhargava et coll., 1992 ; 1995). Kumar et coll., (1994) ont observé de très bons effets SCA pour la longueur du filament chez des croisements avec des lignées de vers à soie bivoltins.

D'après l'analyse des aptitudes à la combinaison générale et spécifique, on peut conclure que les lignées avec un poids de cocon faible (PM et Nistari) ayant des effets GCA significatifs pour le rendement en cocons / 10 000 larves à la fois en nombre et en poids et les lignées avec des poids de cocon élevé (BL24 et BL43), ayant des effets significatifs pour le poids de la coque et la richesse soyeuse, peuvent être utilisées pour l'amélioration supplémentaire de ces caractères spécifiques. Parmi les races de référence, CSR2 au poids de cocon élevé, s'avère un bon recombinaut pour le poids du cocon et le poids de la coque. Le ratio GCA : SCA pour la plupart des caractères quantitatifs étudiés s'avère supérieur à 1, ce qui indique que l'action du gène additif est plus importante que celle des gènes non additifs. De nombreux chercheurs ont confirmé le rôle important de l'action du gène additif chez le ver à soie (Petkov, 1975 ; Satenahalli et coll., 1989 ; Sarkar et coll., (1991). Les hybrides F1 comme PM $\times$ NB4D2, Nistari $\times$ J2, MY1 $\times$ CSR2, GNP $\times$ J2 et BL43 $\times$ NB4D2, que l'on a trouvés prometteurs sur la base de l'expression d'effets SCA positifs pour plusieurs caractères économiques peuvent être exploités commercialement.

MORPHO-ANATOMICAL AND POLLEN STUDIES IN MULBERRY GERMPLASM

A. TIKADER & A. ANANDA RAO

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India.

Morpho-anatomical and pollen studies were conducted in 330 mulberry germplasm accessions at Central Sericultural and Germplasm Resources Centre, Hosur, India (12.45° N, 77.51°E and altitude 942 m above Mean Sea Level) to group mulberry germplasm. The leaf anatomical parameters like stomata length, breadth, chloroplast number, leaf thickness were found increased with increase in ploidy levels. The mean chloroplast number varied from 10.14 ± 0.56 , 14.35 ± 1.29 and 17.33 ± 1.00 whereas the pollen diameter was 19.02 ± 0.68 , 20.51 ± 1.46 and 21.88 ± 1.08 in diploid, triploid and tetraploid, respectively. Stomatal parameters, chloroplast number, leaf thickness and pollen diameter showed positive correlation between the groups i.e. with the increase of number and size, while the stomatal frequency and pollen viability showed negative relationship. The frequency distribution in respect of leaf thickness, stomata and pollen characters showed more overlapping between different ploidy. However, fluctuation in chloroplast number and pollen diameter showed comparatively less. Thus, the chloroplast number and pollen diameter could be used as indirect method in grouping mulberry from large number of germplasm accessions.

Keywords: Mulberry germplasm, stomata, chloroplast, leaf thickness, pollen, grouping.

INTRODUCTION

Cytological study is essential to group mulberry into different categories. Simultaneously, the selection of parents based on chromosome count, helps to chalk out breeding programme for mulberry crop improvement. In general, the polyploid plants showed vigorous growth and provides more yield compared to diploid plant. The selection of polyploid mulberry plant is carried out by chromosome counting which is time consuming and laborious. Thus, any alternative technique for selection on the basis of characters associated with ploidy level should be much better and easy. Hamada and Bada (1930) reported that the guard cells of cultivars with higher chromosome number tended to contain more plastids. A group of scientists reported from the works on various plants that stomatal frequency and size, particularly the guard cell length and chloroplast number vary according to the ploidy status (Borrino and Powell, 1988, Chen *et al.*, 1986, Garcia *et al.*, 1983 and Mchetre, 1982). In mulberry, Sikdar *et al.*, (1986) have suggested to use stomatal chloroplast count technique to screen tetraploids after colchicine treatment (Sikdar and Jolly, 1994 and Dwivedi *et al.*, 1986). Recently, Yang and Yang (1995), Biswas *et al.*, (1996), Tikader *et al.*, (1999) also found that stomatal chloroplast count technique is effective to determine the ploidy level in mulberry. In other crops like Lily and *Bromus inermis* Leyser, it has been reported that both stomata size and pollen diameter showed relationship with ploidy level (McRaf, 1987, Tann and Dunn, 1973). In mulberry, Radzhabli (1965) reported that polyploid plants can be distinguished by the size of the pollen grains and guard cells. But all, the information is based on a limited number of accessions / variety and any extensive study was not conducted to test the efficacy and to group large number of mulberry accessions.

Thus, the present study examines the correlation of stomata and pollen characters in cytologically confirmed accessions to group the large number of mulberry germplasms into different ploidy levels based on the above mentioned parameters.

MATERIALS AND METHODS

In the present study, a total of 330 mulberry accessions composed of 212 indigenous and 118 exotics were considered. A total of 30 accessions, cytologically confirmed, 10 each from diploid, triploid and tetraploid were taken as standards to compare all the 330 accessions and to group them. The germplasms were maintained at Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu, India. Data were collected from 3 plants / accession. Fully expanded leaves (5th-7th position) in descending order from 3-month old shoots were collected at 9-10 am. A small rectangular piece was taken out from the middle portion of the leaf blade avoiding vein and veinlets, preserved in FAA solution (Formalin 5 ml, glacial acetic acid 5 ml and 70% ethanol 90 ml). Stomatal studies were conducted by applying a thin layer of Wimbley's quick fix on the abaxial (lower) leaf surface, dried and peeled out the thin layer of that with the impression of stomata. The thin layer was fixed on a slide, the quick fix covered with cover slip and observed under Leica Leitz, DMRB Wetzlar microscope. The size of the stomata was measured by means of a micrometer and the number of stomata per mm² of leaf was also counted. To observe total leaf thickness, hand section was made and observed under microscope after staining with 1% safranin and mounted in 50% glycerine. Chloroplast number per stomata was counted of 3rd-5th leaf of a twig in descending order from the fully open leaf at top using ventral surface peelings of the freshly collected leaf samples. The peels were stained and mounted in potassium iodide-iodine (2% I + KI) solution following the method of Chaudhuri and Barrow (1975). The pollen studies were conducted from matured male catkin, the pollen grain dusted on a slide and mounted in Munitzing's solution (glycerol 50% + acetocarmine 50%). The data were observed after 2-3 hours and recorded the pollen viability. The statistical analyses were carried out using a software package developed by INDOSTAT SERVICES LTD, Hyderabad, India.

RESULTS AND DISCUSSION

The stomatal parameters showed much variability in different cytologically confirmed accessions (Table I). The result also indicates variation in different accessions of same ploidy. Analysis of variance revealed significant difference ($P < 0.01$) and also significant correlation exists ($n = 30$, $df = 28$, $r = 0.97^{**}$) between the chloroplast number in a guard cell and the ploidy level. The average length, breadth of stomata and chloroplast number in stomata increased with the increase of ploidy. On the contrary, the average stomatal frequency decreased with the increase of ploidy. The present result supports the findings of Yand and Yang (1995), Dzharidze (1977), Dwivedi *et al.*, (1986) and Sikdar *et al.*, (1986). The pollen diameter also increased with the increase of ploidy and pollen viability comparatively less in triploids than diploid and tetraploids.

The frequency distribution for the number of stomata of triploid and tetraploid and the length and breadth of stomata of diploid and triploid plants overlapped very much. On the other hand, overlapping with diploid and tetraploid were also noticed for those characters. The frequency distribution of pollen diameter and viability also overlapped with tetraploid and triploid, diploid and triploids, respectively. Such type of overlapping has also been reported in *Bromus inermis* Leyser (Tann and Dunn, 1973) and *Lilium candidum* (Mc Rae, 1987). When both chloroplast number and pollen diameter frequency were considered at a time, it indicated overlapping with diploid and triploid as well as with triploid and tetraploids, but comparatively less and minimum between diploid and tetraploids.

With the help of cytologically confirmed accessions, large number of mulberry germplasm (330 accessions) were tried to group in different categories (Table II). The accessions were grouped into

diploid (277 acc.), triploid (42 acc.) and tetraploid (17 acc.) based on chloroplast number and other related stomatal characters. Analysis of variance indicated there exists a significant difference among the ploidy levels. The result of above characters increases with the increase in ploidy level and stomatal frequency decreases with the increase of ploidy. Mulberry plant is either monoecious or dioecious in nature. So, the male or female forms are available in some plants but not for all. When pollen characters were taken into consideration, out of 330 accessions, 125 accessions showed male flower bearing plants.

Statistical analysis was carried out separately with 125 accessions and the similar trend was observed (Table III). Total 125 accessions were grouped into diploid (102 acc.), triploid (17 acc.) and tetraploid (6 acc.) based on stomata, leaf thickness, chloroplast number and pollen characters. Radzhabli (1965) also reported that polyploid mulberry plant can be distinguished by the size of pollen grains and guard cells which supports the findings of this report.

Table I. Variation observed in cytologically confirmed accessions for morpho-anatomical and pollen characters (30 accessions).

Tableau I. Variation observée des caractères morpho-anatomiques et du pollen chez des variétés confirmées sur le plan cytologique (30 références).

Ploidy		Stomata length (μm)	Stomata breadth (μm)	Stomatal frequency (sq. mm.)	Chloroplast number per stomata	Pollen diameter (μm)	Pollen viability (%)
<i>Ploidie</i>		<i>Longueur du stomate (μm)</i>	<i>Largeur du stomate (μm)</i>	<i>Fréquence des stomates (mm²)</i>	<i>Nombre de chloroplastes par stomate</i>	<i>Diamètre du pollen (μm)</i>	<i>Viabilité du pollen (%)</i>
Diploid / <i>Diploïde</i>	Mean / <i>Moyenne</i>	19.52	13.42	739.00	9.90	18.04	97.75
	SE	1.56	0.59	26.79	0.87	0.83	0.54
Triploid / <i>Triploïde</i>	Mean / <i>Moyenne</i>	21.63	14.73	553.00	14.60	24.53	84.10
	SE	1.59	1.39	35.71	1.10	2.57	3.10
Tetraploid / <i>Tetraploïde</i>	Mean / <i>Moyenne</i>	28.51	20.17	468.00	17.30	28.05	87.17
	SE	1.67	1.66	34.90	1.22	0.83	2.67
CD = P (0.05)	Variety / <i>Variété</i>	6.79	3.74	303.31	1.20	3.54	9.34
CD = P (0.05)	Ploidy / <i>Ploidie</i>	3.72	2.05	166.51	0.66	1.94	5.12
F-test at 1 % Test <i>F</i> à 1 %	Ploidy / <i>Ploidie</i>	**	**	**	**	**	**

Table II. Stomata studies in mulberry germplasm (330 accessions).**Tableau II. Etudes du stomate chez des germoplasmes de mûrier (330 références).**

Ploidy		Stomata length	Stomata breadth	Stomatal frequency	Chloroplast number per stomata	Leaf thickness
		(μm)	(μm)	(sq. mm)		(μm)
Ploidie		Longueur du stomate (μm)	Largeur du stomate (μm)	Fréquence des stomates (mm^2)	Nombre de chloroplastes par stomate	Épaisseur de la feuille (μm)
Diploid / <i>Diploïde</i> (277 acc./277 variétés)	Mean / <i>Moyenne</i>	19.32	13.24	649.25	10.84	158.14
	SE	0.99	0.70	26.89	0.54	2.09
	CD (P = 0.05)	2.74	1.95	74.71	1.50	5.82
	F test at 1 % <i>Test F à 1 %</i>	**	**	**	**	**
Triploid / <i>Triploïde</i> (42 acc./ 42 variétés)	Mean / <i>Moyenne</i>	20.80	14.14	579.99	14.22	169.93
	SE	1.07	0.89	27.81	0.96	2.17
	CD (P = 0.05)	3.00	2.51	76.45	2.71	6.09
	F test at 1 % <i>Test F à 1 %</i>	**	**	**	**	**
Tetraploid / <i>Tetraploïde</i> (11 acc. / 11 variétés)	Mean / <i>Moyenne</i>	23.41	15.78	509.39	17.27	185.35
	SE	1.08	0.97	19.99	0.80	1.83
	CD (P = 0.05)	3.19	2.87	58.98	2.36	5.41
	F test at 1 % <i>Test F à 1 %</i>	**	**	**	**	**

330 accessions analysed irrespective of flowers / 330 variétés analysées quelles que soient les fleurs.

Correlation coefficients analysis for 330 and 125 accessions were carried out separately with all studied parameters (Table III and IV). It revealed significant correlation ($n = 330$, $df = 328$, $r = 0.90^{**}$ and $n = 125$, $df = 123$, $r = 0.92^{**}$) between the chloroplast number in guard cell and the ploidy level. Pollen diameter and the stomatal characters showed significant correlation with ploidy level (Tables IV and V).

Table III. Pollen studies in mulberry germplasm (125 accessions).**Tableau III. Etudes du pollen chez des germoplasmes de mûrier (125 variétés).**

Ploidy		Stomata length	Stomata breadth	Stomatal frequency	Chloroplast number per stomata	Leaf thickness	Pollen diameter	Pollen viability
		(μm)	(μm)	(sq. mm)		(μm)	(μm)	(%)
Ploïdie		Longueur du stomate	Largeur du stomate	Fréquence de stomates	Nombre de chloroplastes par stomate	Epaisseur de la feuille	Diamètre du pollen	Viabilité du pollen
		(μm)	(μm)	(mm^2)		(μm)	(μm)	(%)
Diploid / Diploïde (102 acc./ 102 variétés)	Mean / Moyenne	19.17	13.48	661.16	10.14	155.18	19.02	95.86
	SE	1.00	0.66	21.61	0.56	2.48	0.68	0.96
CD (P = 0.05)		2.80	1.85	60.25	1.52	6.92	1.91	2.68
F test at 1% Test F à 1 %		**	**	**	*	**	**	**
Triploid / Triploïde (17 acc./ 17 variétés)	Mean / Moyenne	21.07	14.54	599.34	14.35	169.34	20.51	88.97
	SE	1.07	0.97	34.49	1.29	2.42	1.46	1.65
CD (P = 0.05)		3.09	2.78	99.37	3.71	6.98	4.20	4.74
F test at 1% Test F à 1 %		**	**	**	NS	**	**	**
Tetraploid / Tetraploïde (6 acc./ 6 variétés)	Mean / Moyenne	22.91	15.22	517.80	17.33	183.44	21.88	92.45
	SE	1.10	1.24	22.39	1.00	1.84	1.08	1.21
CD (P = 0.05)		3.47	3.90	70.55	3.18	5.79	3.40	3.83
F test at 1% Test F à 1 %		**	NS	**	NS	**	**	**

125 accessions analysed for male flowers bearing plants / 125 variétés analysées portant des fleurs mâles.

Table IV. Correlation coefficients of different anatomical parameters in mulberry germplasm (330 accessions).*Tableau IV. Coefficients de corrélation entre différents paramètres anatomiques chez le mûrier (330 variétés références).*

	Ploidy	Stomatal frequency	Stomata length	Stomata breadth	Chloroplast number per stomata	Total leaf thickness
	<i>Ploidie</i>	<i>Fréquence stomatale</i>	<i>Longueur du stomate</i>	<i>Largeur des stomates</i>	<i>Nombre de chloroplastes par stomate</i>	<i>Épaisseur totale de la feuille</i>
Ploidy / <i>Ploidie</i>	—	-0.228**	0.366**	0.245**	0.901**	0.282**
Stomatal frequency <i>Fréquence des stomates</i>		—	-0.176**	0.101NS	-0.225**	-0.109NS
Stomata length <i>Longueur du stomate</i>			—	0.654**	0.360**	0.356**
Stomata breadth / <i>Largeur du stomate</i>				—	0.251**	0.323**
Chloroplast number / stomata <i>Nombre de chloroplastes / stomate</i>					—	0.338**
Total leaf thickness <i>Épaisseur totale de la feuille</i>						—

**, * indicates significance at 1% and 5% levels, respectively / **, * indique la signification aux seuils de 1 % et 5 %, respectivement.

In the present study, the stomatal frequency, length, breadth and leaf thickness showed considerable overlapping between ploidy levels where indirect selection will be less effective. In other ways, the chloroplast number and pollen diameter were overlapping but were comparatively less in diploid and triploid. All this information showed that chloroplast number in a stomata and pollen diameter have a close relationship with the chromosome number in the mulberry like in the cotton and sugarbeets crop.

Table V. Correlation coefficients of different anatomical and pollen characters in mulberry germplasm (125 accessions).*Tableau V. Coefficients de corrélation entre différents caractères anatomiques et du pollen chez des germoplasmes de mûrier (125 variétés références).*

	Ploidy	Stomatal frequency	Stomata length	Stomata breadth	Chloroplast number per stomata	Total leaf thickness	Pollen diameter	Pollen viability
	<i>Ploïdie</i>	<i>Fréquence des stomates</i>	<i>Longueur du stomate</i>	<i>Largeur du stomate</i>	<i>Nbre de chloroplastes / stomate</i>	<i>Épaisseur totale de la feuille</i>	<i>Diamètre du pollen</i>	<i>Viabilité du pollen</i>
Ploidy <i>Ploïdie</i>	—	-0.218**	0.371**	0.234**	0.923**	0.270**	0.236**	-0.400**
Stomatal frequency <i>Fréquence des stomates</i>		—	-0.247**	0.048NS	-0.243**	-0.171 NS	-0.014NS	0.123 NS
Stomata length <i>Longueur du stomate</i>			—	0.616**	0.403**	0.438**	0.079NS	-0.219*
Chloroplast number / stomata <i>Nombre de chloroplastes / stomate</i>				—		0.388**	0.182*	-0.414**
Total leaf thickness <i>Épaisseur totale de la feuille</i>						—	-0.141 NS	-0.129NS
Pollen diameter <i>Diamètre du pollen</i>							—	-0.414**
Pollen viability <i>Viabilité du pollen</i>								—

** , * indicates significance at 1% and 5% levels, respectively, / **, * indique la signification aux seuils de respectivement 1 % et 5 %.

Therefore, the analysis of the chloroplast number and pollen diameter may be used as a technique for indirect selection to group mulberry into different ploidy levels from a large number of mixed germplasm accessions.

REFERENCES

- BISWAS S., VIJAYAN K., DAS N. K., ROY B. N., SINHA S. S. (1996) Identification of polyploids in mulberry through stomatal studies. *Ind. Tree Science*, 15(2), 65-69.
- BORRINO E. M., POWELL W. (1988) Stomatal guard cells length as indicator of ploidy in microspore derive plants of barley. *Genome*, 30, 158-160.

- CHAUDHURI H. K., BARROW J. R. (1975) Identification of cotton haploids by stomatal chloroplasts technique. *Crop Sci.*, 15, 760-763.
- CHEN C. G., CHENG J. J., HUANG C. S. (1986) Ploidy identification by stomatal size of rice plantlets derived from anther culture. *Journal of Agricultural Research of China*, 35, 37-44.
- DWIVEDI N. K., SIKDAR A. K., DANDIN S. B., SASTRY C. R., JOLLY M. S. (1986) Induced tetraploidy in mulberry I. Morphological, anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135. *Cytologia*, 51, 391-401.
- DZHAPARIDZE T. S. A. (1977) Morphological changes due to colchicine treatment of mulberry buds. *Tr. Vses Seminar PO Geneti Shelkovitsy*, Tashkent, Uzbek SSR. Pp. 177-184.
- GARCIA P., LASA J. M., RAMAGOSAL, MEDINA B. (1983) Variation in number of chloroplasts/stoma in primary trisomic series of sugarbeet. *Anales de la Estacion Experimental de Alua Dei*, 16, 214-221.
- HAMADA N., BADA H. (1930) On the number of chloroplasts in the guard cells in mulberry. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 1, 305-309.
- Mc RAF J. F. (1987) Stomata size and pollen characteristics as an indication of chromosome number in Lilies. In: *Lily year book of the North American Society Inc.*, Wauke, Illions, USA. Pp 19-26.
- MEHETRE S. S. (1982) Observations on stomata and chloroplasts in polyhaploids and tetraploids of cotton (*Gossypium* spp.). *Science and Culture*, 48, 75-77.
- RADZHABLI S. I. (1965) Cytological investigations of experimentally produced polyploid forms of mulberry trees (*Morus*). *Izv. Sib. Old Akad Nauk SSR SER Biol Med Nauk.*, 3, 115-118 (Ru).
- SIKDAR A. K., DWIVEDI N. K., DANDIN S. B., KUMAR R., GIRIDHAR K. (1986) Stomatal chloroplast count technique as a tool to ascertain different ploidy levels in mulberry. *Indian J. Seric.*, 25(2), 88-90.
- SIKDAR A. K., JOLLY M. S. (1994) Induced polyploidy in mulberry (*Morus* spp.) induction of tetraploids. *Sericologia*, 34(1), 105-116.
- TANN G. Y., DUNN G. M. (1973) Relationship of stomatal length and frequency and pollen grains diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyser. *Crop Sci.*, 13, 332-334.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (1999) Stomatal variation and its relation with ploidy levels in mulberry (*Morus* spp.). *Ind. J. Seric.*, 38(2), 160-162.
- YANG J.-H., YANG X.-H. (1995) Relationship between stomatal chloroplast number and ploidy levels in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 35(2), 289-292.

ETUDES MORPHO-ANATOMIQUES ET DU POLLEN CHEZ LE MURIER

A. TIKADER & A. ANANDA RAO

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur 635 109, Tamil Nadu, Inde.

Nous avons réalisé des études de la morpho-anatomie et du pollen chez 330 mûriers de référence au Centre Séricicole de Ressource en Germoplasmes, de Hosur, en Inde (12,45° N, 77,51°E à une altitude de 942m au-dessus du niveau de la mer) pour regrouper les mûriers. On observe que les paramètres anatomiques de la feuille comme la longueur et la largeur du stomate, le nombre de chloroplastes et l'épaisseur de la feuille augmentent avec les niveaux de ploïdie. Le nombre moyen de chloroplastes varie entre $10,14 \pm 0,56$; $14,35 \pm 1,29$ et $17,33 \pm 1,00$ tandis que le diamètre du pollen est de $19,02 \pm 0,68$; $20,51 \pm 1,46$ et $21,88 \pm 1,08$ respectivement chez les diploïdes, les triploïdes et les tétraploïdes. Les paramètres des stomates, le nombre de chloroplastes, l'épaisseur de la feuille et le diamètre du pollen montrent une corrélation positive entre les groupes, c'est à dire avec l'augmentation du nombre et de la taille tandis que la fréquence stomatale et la viabilité du pollen donnent une relation négative. Les distributions des fréquences pour l'épaisseur de la feuille, les caractères des stomates et du pollen se chevauchent plus entre les différentes ploïdies. Cependant, la fluctuation du nombre de chloroplastes et du diamètre du pollen est comparativement moindre. Ainsi, on pourrait utiliser le nombre de chloroplastes et le diamètre du pollen comme méthode indirecte pour regrouper un grand nombre de mûriers de référence.

INTRODUCTION

L'étude cytologique est essentielle pour répartir les mûriers en différentes catégories. De même, la sélection des parents se fait à partir du nombre de chromosomes, ce qui permet d'inclure la polyploïdie dans les programmes de lignage pour l'amélioration des récoltes de mûriers. En général, les plantes polyploïdes ont une croissance vigoureuse et un meilleur rendement par rapport aux plantes diploïdes. Les plants de mûriers polyploïdes sont sélectionnés en comptant les chromosomes, ce qui prend du temps et est laborieux. Ainsi, n'importe quelle autre technique de sélection basée sur des caractères associés au niveau de ploïdie serait meilleure et facile. Hamada et Bada (1930) ont observé que les cellules de garde des cultivars avec un nombre de chromosomes plus élevé tendent à contenir plus de plastides. Un groupe de scientifiques a observé à partir de travaux sur des plantes variées que la fréquence et la taille des stomates, particulièrement la longueur de la cellule de garde et le nombre de chloroplastes varient en fonction de l'état de ploïdie (Borrino et Powell, 1988, Chen et coll., 1986, Garcia et coll., 1983 et Mehete, 1982). Chez le mûrier, Sikdar et coll., (1986) ont suggéré de compter les chloroplastes du stomate pour trier les tétraploïdes après un traitement à la colchicine (Sikdar et Jolly, 1994 et Dwivedi et coll., 1986). Récemment, Yang et Yang (1995), Biswas et coll., (1996), Tikader et coll., (1999) ont aussi trouvé que compter les chloroplastes est une manière efficace pour déterminer le niveau de ploïdie chez le mûrier. Chez d'autres cultures comme le lys et *Bromus inermis* Leyser, on a observé que la taille des stomates et le diamètre du pollen ont tous les deux un rapport avec le niveau de ploïdie (McRaf, 1987, Tann et Dunn, 1973). Chez le mûrier, Radzhabli (1965) a signalé que les plantes polyploïdes peuvent être distinguées par la taille des grains de pollen et des cellules de garde. Mais toutes ces informations se basent sur un nombre limité d'exemplaires / variétés

et aucune étude importante n'a été réalisée pour en tester l'efficacité et pour grouper un grand nombre de variétés de mûrier.

Ainsi, l'étude présente se propose d'examiner la corrélation existant avec le stomate et les caractères du pollen chez des variétés confirmées sur le plan cytologique pour regrouper un grand nombre de références de mûrier en différents niveaux de ploïdie d'après les paramètres mentionnés ci-dessus.

MATERIELS ET METHODES.

Un ensemble de 330 variétés de mûrier comprenant 212 mûriers indigènes et 118 mûriers exotiques est pris en considération. Trente références, confirmées sur le plan cytologique, 10 diploïdes, 10 triploïdes et 10 tetraploïdes sont prises comme normes pour comparer les 330 variétés et les regrouper. Les références sont maintenues au Centre Séricicole de Ressources en Germoplasmes, de Hosur au Tamil Nadu, en Inde. Les données sont recueillies à partir de 3 plants / variété. Des feuilles complètement développées (5^{ème} à 7^{ème} position dans l'ordre descendant) sur des pousses de trois mois sont recueillies à 9-10 heures du matin. Un petit morceau rectangulaire est prélevé au milieu du limbe en évitant les nervures, et conservé dans une solution de FAA (5ml de formol, 5 ml d'acide acétique glacial et 90 ml d'éthanol à 70 %). Les études stomatales sont réalisées en appliquant une fine couche de fixateur Wimbley rapide sur la surface abaxiale (inférieure) de la feuille. Elle est séchée puis décollée avec l'empreinte des stomates. La couche mince est fixée sur une lame, le fixateur rapide est recouvert avec une lame couvre objet et observé sous un microscope Leica Leitz, DMRB Wetzlar. La taille des stomates est mesurée au moyen d'un micromètre et le nombre de stomates par mm² de feuille est déterminé. Pour observer l'épaisseur totale de la feuille, on fait une coupe à la main et on l'observe au microscope après l'avoir colorée avec de la safranine à 1 % et montée dans de la glycérine à 50 %. Le nombre de chloroplastes par stomate est compté de la 3^{ème} à la 5^{ème} feuille d'un rameau dans l'ordre descendant à partir de la feuille bien ouverte en pelant la surface ventrale des échantillons de feuille fraîchement recueillis. Les peaux sont colorées et montées dans une solution d'iode - iodure de potassium (2 % I + KI) en suivant la méthode de Chaudhuri et Barrow (1975). Les études du pollen sont réalisées à partir du chaton mâle mature ; les grains de pollen sont saupoudrés sur une lame et montés dans une solution de Munitzing (glycérol à 50 % + acétocarmin à 50 %). Les échantillons sont observés après 2 à 3 heures et on enregistre la viabilité du pollen. Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant un logiciel mis au point par INDOSTAT SERVICES LTD, Hyderabad, en Inde.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les paramètres des stomates de différentes variétés cytologiquement confirmées présentent une grande variabilité (Tableau I). Les résultats indiquent aussi une variation entre les différentes références ayant la même ploïdie. L'analyse de variance révèle une différence significative ($P < 0,01$) et une corrélation significative ($n = 30$, $df = 28$, $r = 0,97^{**}$) entre le nombre de chloroplastes dans une cellule de garde et le niveau de ploïdie. La longueur, la largeur moyennes des stomates et le nombre de chloroplastes dans le stomate augmentent avec la ploïdie. Au contraire, la fréquence stomatale moyenne baisse avec la ploïdie. Les résultats présents confirment les observations de Yand et Yang (1995), de Dzharparidze (1977), de Dwivedi et coll., (1986) et de Sikdar et coll., (1986). Le diamètre du pollen augmente aussi avec le degré de ploïdie et la viabilité du pollen est comparativement moindre chez les triploïdes que chez les diploïdes et les tetraploïdes.

Les distributions des fréquences du nombre de stomates entre les triploïdes et les tetraploïdes et de la longueur et la largeur des stomates entre les plants diploïdes et triploïdes se chevauchent beaucoup. D'autre part, on remarque aussi que ces caractères se chevauchent chez les diploïdes et les triploïdes. Les distributions des fréquences du diamètre et de la viabilité du pollen se recouvrent aussi

entre les tétraploïdes et les triploïdes et entre les diploïdes et les triploïdes. Un tel type de chevauchement a aussi été signalé chez *Bromus inermis* Leyser (Tamm et Dunn, 1973) et chez *Lilium candidum* (Mc Rae, 1987). Quand on prend en compte les fréquences du nombre de chloroplastes et du diamètre du pollen séparément, on remarque que ces distributions se recouvrent entre les diploïdes et les triploïdes ainsi qu'entre les triploïdes et les tétraploïdes, mais cela est comparativement moindre et minimum entre les diploïdes et les tétraploïdes.

Grâce aux variétés cytologiquement confirmées, on a essayé de répartir un grand nombre de mûriers de référence (330 variétés) en différentes catégories (Tableau II). Les variétés sont groupées entre les diploïdes (277 variétés), les triploïdes (42 variétés) et les tétraploïdes (17 variétés) d'après le nombre de chloroplastes et d'autres caractères associés des stomates. L'analyse de variance indique qu'il existe une différence significative entre les niveaux de ploïdie. Les résultats pour les caractères ci-dessus augmentent avec l'augmentation du niveau de ploïdie et la fréquence des stomates baisse avec l'augmentation de la ploïdie. Le plant de mûrier est de nature monoïque ou dioïque. Ainsi, les formes mâles ou femelles sont disponibles chez certains plants mais pas chez tous. Quand les caractères du pollen sont pris en considération, sur 330 variétés, on trouve 125 variétés dont les plants ont des fleurs mâles.

L'analyse statistique est réalisée séparément avec ces 125 variétés et on observe une tendance similaire (Tableau III). Au total, 125 variétés sont réparties entre les diploïdes (102 variétés), les triploïdes (17 variétés) et les tétraploïdes (6 variétés) d'après les stomates, l'épaisseur de la feuille, le nombre de chloroplastes et les caractères du pollen. Radzhabli (1965) a aussi observé que le plant de mûrier polyploïde peut être distingué grâce à la taille de ses grains de pollen et de ses cellules de garde, ce qui est confirmé par les observations de ce rapport.

Les analyses des coefficients de corrélation pour les 330 et 125 variétés ont été réalisées séparément avec tous les paramètres étudiés (Tableau III et IV). Elles révèlent une corrélation significative ($n = 330$, $dl = 328$, $r = 0,90^{**}$ et $n = 125$, $dl = 123$, $r = 0,92^{**}$) entre le nombre de chloroplastes dans les cellules de garde et le niveau de ploïdie. Le diamètre du pollen et les caractères des stomates montrent une corrélation significative avec le niveau de ploïdie (Tableaux IV et V).

Dans cette étude, la distribution des fréquences des stomates, de la longueur, de la largeur et de l'épaisseur de la feuille se recouvrent énormément entre les niveaux de ploïdie ; la sélection indirecte est donc moins efficace. A d'autres égards, le nombre de chloroplastes et le diamètre du pollen bien qu'ils se recouvrent, le font comparativement moins entre les diploïdes et les triploïdes. Toutes ces informations montrent que le nombre de chloroplastes dans un stomate et le diamètre du pollen ont une relation étroite avec le nombre de chromosomes chez le mûrier comme chez les cultures du coton et de la betterave à sucre.

L'analyse du nombre de chloroplastes et du diamètre du pollen pourrait donc être utilisée comme technique de sélection indirecte pour répartir un grand nombre de germoplasmes de mûrier en différents niveaux de ploïdie.

FABRICATION AND EVALUATION OF SILKWORM EGG TRANSPORTATION BOXES

VINOD B. MATHUR, VINEET KUMAR, G. P. SINGH & R. K. DATTA

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

Six different types of silkworm egg transportation boxes were designed and fabricated by utilizing low cost locally available materials which absorb and retain moisture for longer duration to transport the silkworm eggs to distant places. The reduction in temperature (-4.55°C) and increase in relative humidity ($+19.00\%$) and maximum hatching percentage (95.59%) were recorded in the box made up of foam sheet and netlon mesh, hence, it is recommended and popularised among the farmers to be used.

Keywords : Egg carrying box, silkworm, transport.

INTRODUCTION

Silkworm is a poikilothermic insect and its different stages are greatly influenced by environmental factors i.e. temperature (Tanaka, 1964 ; Yamashita and Yaginuma, 1991), relative humidity (Sharada and Bhat, 1957 ; Krishnaswami, 1986 ; Benchamin, 1987) and rainfall (Krishanaswami *et al.*, 1973 ; Tazima, 1978 ; Narasimhanna, 1988). Quality of silkworm seed is one of the major factor towards the success of silkworm rearing (Tazima, 1978). Poor quality of silkworm seed reduces cocoon yield and silk recovery (Krishanaswami *et al.*, 1973; Biram Saheb *et al.*, 1990 ; Muttur *et al.*, 1990). Silkworm eggs are being transported in cloth bags, paper bags or towels by the farmers in an unscientific way and there are no specific means of transport. During the transportation, the silkworm eggs are directly exposed to the variable atmospheric temperature and relative humidity which results in desiccation of eggs, poor and irregular hatching and death of embryos at different stages of development (Biram Saheb, *et al.*, 1990, Muttur *et al.*, 1990).

Considering the above problems and limited information on transportation of silkworms eggs, there is a need to evolve a simple and low cost device to transport the silkworm eggs which can provide ideal conditions for developing embryos during transportation. Therefore, the present study has been undertaken to design and fabricate the egg transportation containers with an aim to transport the eggs for longer distances under tropical conditions and to obtain good and uniform hatching of the silkworm eggs for better cocoon yield.

MATERIALS AND METHODS

Different types of silkworm egg transportation boxes of the same size (14" length $\times$ 12" height $\times$ 6" width) were designed and fabricated by utilizing locally available materials i.e. netlon mesh, foam sheet (20 mm and 8 mm), galvanised mesh, coir mesh, packing material, sunpack sheet (corrugated polystyrene) and tarpaulin. The boxes were provided with frame or hooks to hang the silkworm egg sheets and different types of water absorbing materials to retain moisture for longer period during transportation. Hooks were fixed on the top of the boxes or on the frame to hang the egg sheets. Weight

and cost details of all the boxes are given in Table I. Each box has the capacity to transport 20 egg sheets (400 Dfls) at a time. The six different types of boxes were fabricated by utilizing different materials as mentioned below :

- | | |
|--|---------|
| 1. Foam sheet with plastic net (netlon mesh) | (Box 1) |
| 2. Packing material with galvanised mesh | (Box 2) |
| 3. Coir mesh with plastic net | (Box 3) |
| 4. Tarpaulin with foam | (Box 4) |
| 5. Sunpack (corrugated) sheet with foam | (Box 5) |
| 6. Sunpack sheet (Corrugated polystyrene) | (Box 6) |

Water was sprayed in the boxes to test their water absorption and retention capacity for different durations, which can help to maintain ideal temperature and relative humidity for developing embryos during the transportation. Water was sprayed twice in a day at 8.00 am and 12.00 noon @ 10 ml/100 cm sq. on each box during the course of experiment and temperature and relative humidity were recorded while transporting the silkworm eggs.

Bivoltine (NB18), multivoltine (PM) and cross breed (PM × NB18) layings of *Bombyx mori* were used and 100 layings of each races/hybrid were transported in each box. The silkworm eggs were transported about 5-6 hours by means of bus (250 km, approximately) and by bicycle (35 km, approximately). The experiment was conducted in three seasons i.e. summer (season 1), rainy (season 2) and winter (season 3). After transportation, the eggs were incubated in double brick wall incubation chamber till hatching as per the procedure laid by Krishnaswami *et al.* (1973). A control batch was also maintained by transporting the eggs in the traditional way in paper bags for comparison purpose. The hatching percentage of the layings was calculated separately for each box and control. Data were analysed and compared with each other including control.

RESULTS AND DISCUSSION

The results are presented in Table I and II. Observations showed that the box 1 was having maximum effective temperature and relative humidity difference i.e. -4.55°C and $+19.00\%$ than control respectively. The average hatching percentage of eggs under two modes of transportation was observed to be 96.94 % while in control the hatching percentage was recorded to be 83.12 %. The average hatching percentage of silkworm eggs in box 2 was 93.36 % which was 10.24 % higher than the control while the layings were transported by bicycle and by bus respectively. This poor hatching in control may be due to the unfavourable climatic conditions i.e. variation in temperature, low relative humidity and accumulation of heat and gases generated by the eggs during transportation. Tazima (1978) also reported that the adverse climatic conditions during embryonic development lead to irregular and poor hatching. The average hatching percentage under two modes of transportation were 96.94 and 93.36 % in box 1 and box 2, may be due to more water absorption capacity by the material used for fabricating the boxes which was also confirmed by the effective temperature and relative humidity differences i.e. -4.55°C , $+19.00\%$ and -3.19°C , $+17.60\%$ in box 1 and box 2 respectively. The average hatching percentage in box 3 was recorded to be 92.59 % which is significantly higher than the control, but 4.35 and 0.77 % lesser than box 1 and box 2, which may be due to the differences in effective temperature and relative humidity inside the boxes (Table I). Hatching percentage (90.52 %) was observed in layings transported in box 4 which was 2.07 % less than box 3. Hatching percentage was recorded to be of 89.38 % in layings transported in box 5 and the lowest was 84.27

% in layings transported in box 6. The poor hatching in the layings transported in boxes 5 and 6 may be due to minimum water absorption and moisture retention capacity of the material used for fabricating the boxes. Transportation of silkworm eggs is carried out during incubation therefore, if the suitable environmental conditions are lacking, it may affect voltinism of race. Tanaka (1964), Tazima (1978) and Yamashita *et al* (1981) reported that the voltinism character is generally influenced by the environmental conditions prevailing during incubation and transportation duration of silkworm eggs is a part of incubation hence, utmost care should be taken while transporting the silkworm eggs.

Table I. Average values of hatching percentage of transported eggs by bicycle and by bus and effective temperature and relative humidity difference.

Tableau I. Valeurs moyennes de pourcentage d'éclosion d'œufs transportés à bicyclette et en bus et différence de température effective et d'humidité relative.

Characters	Race	Box 1	Box 2	Box 3	Box 4	Box 5	Box 6	Control
Caractères		Boîte 1	Boîte 2	Boîte 3	Boîte 4	Boîte 5	Boîte 6	Témoin
Hatching % of eggs transported by bicycle	PM	97.23	94.12	92.00	91.57	89.25	80.48	80.00
% d'éclosion des œufs transportés à bicyclette	NB18	95.83	91.23	90.51	89.27	86.59	81.36	82.56
	PM × NB18	98.42	95.63	92.87	90.16	88.60	84.37	83.59
	Avg. (i) / Moyenne (i)	97.16	93.66	91.79	90.33	88.15	82.06	82.06
Hatching % of eggs transported by bus	PM	96.87	93.25	94.00	91.38	90.72	85.00	84.11
% d'éclosion des œufs transportés en bus	NB18	95.99	91.02	92.01	89.08	89.81	86.32	83.21
	PM × NB18	97.28	94.89	94.13	91.64	91.27	88.08	85.23
	Avg. (ii) / Moyenne (ii)	96.71	93.05	93.38	90.70	90.60	86.47	84.18
Average hatching (%) of two modes of transportation Pourcentage d'éclosion moyen avec les deux modes de transport		96.94	93.36	92.59	90.52	89.38	84.27	83.12
Average temperature (°C) (seasons 1, 2 and 3) Température moyenne (°C) (saisons 1, 2 et 3)		26.60	27.86	28.88	28.98	30.07	30.51	31.05
Average relative humidity (%) Humidité Relative moyenne (%)		82.37	80.97	74.63	74.18	73.11	69.22	63.37
Weight of box (g) / Poids de la boîte (g)		600.00	800.00	900.00	700.00	750.00	700.00	-
Cost (in Rs.) / Coût en Rs.		140.00	150.00	160.00	105.00	45.00	35.00	4.00

Table II. Analysis of variance of hatching percentage in different silkworm egg transportation boxes transported by bicycle and bus.

Tableau II. Analyse de variance du taux d'éclosion avec différentes boîtes de conservation des œufs de vers à soie transportées à bicyclette et en bus.

Source	Season 1 / Saison 1				Season 2 / Saison 2				Season 3 / Saison 3			
	M.S.	Sign.	S.E.	C.D.	M.S.	Sign.	S.E.	C.D.	M.S.	Sign.	S.E.	C.D.
1. By bicycle	331.16	**	0.13	6.94	109.92	**	0.23	6.85	151.86	**	0.58	7.25
(i) Among the boxes (A)												
<i>1. A bicyclette</i>												
(i) Entre les boîtes (A)												
(ii) In between races (B)	1.76	N.S.	0.20	0.69	7.16	*	0.29	0.85	0.002	N.S.	0.32	0.86
(ii) Entre les races (B)												
(iii) Treatment (A × B)	1.27	**	0.62	7.25	3.90	N.S.	0.77	2.09	2.08	*	0.75	6.91
(iii) Traitement (A × B)												
2. By bus / En bus												
(i) Among the boxes (A)	321.23	**	0.71	6.87	306.98	**	1.15	6.77	399.19	**	0.74	7.14
(i) Entre les boîtes (A)												
(ii) In between races (B)	1.96	n.s.	0.33	0.96	1.69	N.S.	0.67	1.70	0.87	N.S.	0.41	1.12
(ii) Entre les races (B)												
(iii) Treatment (A × B)	29.11	**	0.96	6.80	6.43	N.S.	1.59	3.60	1.55	*	1.02	6.55
(iii) Traitement (A × B)												

** Significant at 1 % / ** Significatif à 1 %. * Significant at 5 % / * Significatif à 5 %. N.S. = Not significant / Non significatif.

M. S. Mean sum of square / Somme moyenne des carrés. S. E. : Standard error / Ecart type. C. D. : Critical difference / Différence critique.



Fig. 1. Egg transportation bag. / Fig. 1. Sac pour transporter les œufs.

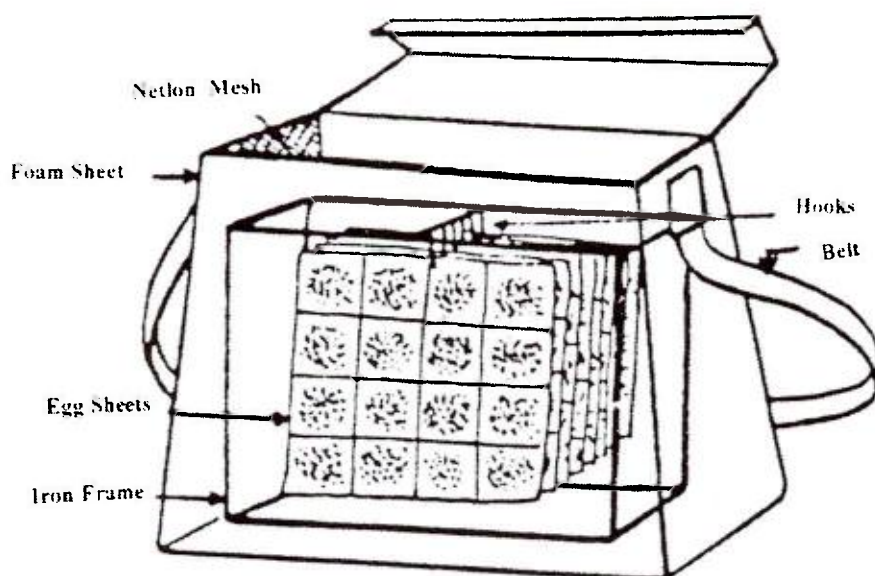


Fig. 2. Inner view of egg transportation bag. / Fig 2. Vue intérieure du sac pour transporter les œufs.

Biram Saheb *et al* (1990) observed that high temperature and low relative humidity coupled with shocks while transporting the silkworm eggs lead to irregular and poor hatching and weaker larvae. Ullal and Narasimhanna (1978) and Narasimhanna (1988) also reported that maintenance of poor temperature and relative humidity is extremely important during incubation. High temperature leads to loss of eggs, under size worms and poor cocoon yield.

A significantly higher difference in hatching percentage of layings transported in box 1 and box 2 than the other boxes and with control may be due to optimum range of temperature and relative humidity inside the boxes and to the material used for fabricating the boxes which has comparatively higher moisture absorbing and retention capacity. Further cross ventilation inside the boxes provides free air circulation which helps in reducing the accumulation of heat and carbon dioxide liberated by the silkworm eggs.

Considering the effective temperature and relative humidity difference, hatching percentage of layings, fabrication cost and easily adoptable technology, box 1 was found the best among all the boxes for transporting the silkworm eggs in India under tropical condition. After evaluation, box 1 was further modified for easy handling. The modified bag was prepared with netlon mesh and foam. The foam sheet of 14" length $\times$ 12" height $\times$ 6" width size was covered with netlon mesh on both the sides and stitched. A belt was also provided for hanging the bag on shoulder for easy transportation. A frame made up of iron with hooks was also prepared where silkworm egg sheets can be hanged. Twenty egg sheets (400 Dfls) can be easily transported at a time (Figs. 1 and 2). The cost of this bag is Rs. 140.00 and durability is about 10 years or more. This modified bag is popularised among the farmers especially for transporting the silkworm layings for longer distance and otherwise also.

REFERENCES

- BENCHAMIN K. V. (1987) A Text Book of Sericulture Extension Workers, Published by C. S. R. & T. I., Mysore, Central Silk Board, India, p. 11
- BIRAM SAHEB N. B., REDDY, G. V. SENGUPTA K. (1990) Methods of silkworm transportation, Indian Silk, 28, (12), 31-34.
- KRISHNASWAMI S. (1986) New technology of silkworm rearing, Central Silk Board, Bangalore, pp. 23.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M. N., SURAYANARAYANA S. K., KUMARARAJA S. (1973) Manual on Sericulture : Silkworm rearing 2, Food and Agriculture Organisation of the U. N., Rome, pp. 42-53.
- MUTTUR S. S., MANJULA A., MAHESH R. (1990) Transportation box for silkworm eggs. Indian Silk, 29(4), 27-28.
- NARASIMHANNA M. N. (1988) Manual on silkworm egg production, Central Silk Board, Bangalore, India p. 62.
- SHARDA K., BHAT J. V. (1957) Influence of humidity of food utilisation by the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Indian Inst. Sci. 39(3), 220-223.
- TANAKA Y. (1961) Sericology. Published by Central Silk Board, Bombay, India, pp. 55-57.
- TAZIMA Y. (1978) The Silkworm; an important laboratory tool. Kodansha Ltd. Japan, pp. 83-84.
- ULLAL S. R., NARASIMHANNA M. N. (1978) Hand Book of Practical Sericulture, Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 313.
- YAMASHITA O., YAGINUMA T. (1991) Silkworm egg at low temperature: Implication for sericulture. In: In insect at low temperature. Ed. by Lee RE Deulinger Dr New York. Chapman and Hall. pp. 115-125.
- YAMASHITA O., YAGINUMA T., HASEGAWA K. (1981) Hormone and metabolic control of egg diapause of the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Eng. Gen., 7, 195-211.

FABRICATION ET EVALUATION DE BOITES POUR TRANSPORTER LES ŒUFS DE VERS A SOIE

VINOD B. MATHUR, VINEET KUMAR, G. P. SINGH & R. K. DATTA

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

Six différents types de boîtes pour transporter les œufs de vers à soie ont été conçus et fabriqués en utilisant des matières bon marché disponibles sur place, qui absorbent et retiennent l'humidité pendant de longues périodes pour transporter les œufs de vers à soie sur de longues distances. On enregistre une baisse de température ($-4,55^{\circ}\text{C}$), une augmentation de l'humidité relative ($+19\%$) et un taux d'éclosion maximum (95,59 %) avec la boîte fabriquée avec une couche de mousse et un grillage en netlon, son usage a donc été recommandé et vulgarisé chez les fermiers.

INTRODUCTION

Le ver à soie est un insecte poïkilotherme et ses différentes étapes de développement sont grandement influencées par les facteurs environnementaux comme la température (Tanaka, 1964 ; Yamashita et Yaginuma, 1991), l'humidité relative (Sharada et Bhat, 1957 ; Krishnaswami, 1986 ; Benchamin, 1987) et les précipitations (Krishnaswami et coll., 1973 ; Tazima, 1978 ; Narasimhanna, 1988). La qualité des graines de vers à soie est l'un des facteurs principaux qui contribue au succès de l'élevage du ver à soie (Tazima, 1978). La mauvaise qualité des graines diminue le rendement en cocons et la rentrée de soie (Krishnaswami et coll., 1973 ; Biram Sahab et coll., 1990 ; Muttur et coll., 1990). Les œufs de vers à soie sont transportés dans des sacs en tissu, des sacs en papier ou des serviettes par les fermiers d'une manière non scientifique et il n'existe pas de moyen de transport spécifique. Pendant le transport, les œufs de vers à soie sont directement exposés aux variations de la température atmosphérique et à l'humidité relative qui entraînent le dessèchement des œufs, une éclosion mauvaise et irrégulière et la mort des embryons aux différents stades du développement (Biram Sahab et coll., 1990 ; Muttur et coll., 1990).

Compte tenu de ces problèmes et de l'information limitée sur le transport des œufs de vers à soie, il faut mettre au point un système simple et bon marché pour les transporter, qui puisse fournir des conditions idéales pour les embryons en développement pendant le transport. Nous avons donc entrepris cette étude pour concevoir et fabriquer des containers pour le transport des œufs sur des distances plus longues dans les conditions tropicales et pour obtenir une bonne éclosion uniforme dans le but de parvenir à un meilleur rendement en cocons.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons conçu et fabriqué différents types de boîtes de la même taille (35 cm de longueur $\times$ 30 cm de hauteur $\times$ 15 cm de largeur) pour transporter les œufs de vers à soie en utilisant des matériaux disponibles localement, c'est à dire du grillage en netlon, des couches de mousse (de 20 et 8 mm), du grillage galvanisé, de la maille de coco, du matériel d'emballage, des plaques résistant au soleil (du polystyrène ondulé) et de la toile goudronnée. Les boîtes sont équipées de cadres et de crochets pour

suspendre les feuilles de ponte et on utilise différents types de matériaux absorbant l'eau pour retenir l'humidité pendant de longues périodes pendant le transport. Les crochets sont fixés au sommet des boîtes ou sur les cadres afin de suspendre les feuilles de ponte. Le poids et le coût des boîtes sont présentés dans le Tableau I. Chaque boîte peut contenir 20 feuilles de ponte (400 pontes saines) à la fois. Les six différents types de boîtes sont fabriqués en utilisant les matériaux suivants :

- | | |
|---|-----------|
| 1. Couche de mousse avec une grille en plastique | (Boîte 1) |
| 2. Matériau d'emballage avec une grille galvanisée | (Boîte 2) |
| 3. Maille de coco avec une grille en plastique | (Boîte 3) |
| 4. Bâche goudronnée avec de la mousse | (Boîte 4) |
| 5. Plaque résistant au soleil (ondulée) avec de la mousse | (Boîte 5) |
| 6. Plaque résistant au soleil (polystyrène ondulé) | (Boîte 6) |

On vaporise de l'eau dans les boîtes pour tester leur capacité d'absorption et de rétention de l'eau pendant différentes durées, ce qui peut permettre de maintenir une température et une humidité relative idéales pour les embryons en développement pendant le transport. L'eau est vaporisée deux fois par jour, à 8 heures et à 12 heures à raison de 10 ml / 100 cm² dans chaque boîte au cours de l'expérience et la température et l'humidité relative sont enregistrées pendant le transport des œufs.

Des pontes *Bombyx mori* de bivoltins (NB18), de polyvoltins (PM) et d'hybrides (PM × NB18) sont utilisées et 100 pontes de chaque race / hybride sont transportées dans chaque boîte. Les œufs de vers à soie sont transportés pendant 5 à 6 heures en bus (250 km, approximativement) et à bicyclette (35 km, approximativement). L'expérience est réalisée pendant les trois saisons, c'est à dire en été (saison 1), pendant la saison des pluies (saison 2) et en hiver (saison 3). Après le transport, les œufs sont incubés dans une pièce d'incubation dont les murs sont faits de briques doubles jusqu'à l'éclosion d'après les recommandations de Krishnaswami et coll., (1973). On conserve aussi un lot témoin (les œufs sont transportés de la manière traditionnelle dans des sacs en papier à titre de comparaison). Le pourcentage d'éclosion des pontes est calculé séparément pour chaque boîte et pour le témoin. Les données sont analysées et comparées entre elles y compris avec le témoin.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés dans les Tableaux I et II. On observe que la boîte 1 présente les différences de température effective et d'humidité relative maximums par rapport au témoin, c'est à dire respectivement - 4,55° C et + 19 %. Le pourcentage d'éclosion moyen des œufs avec les deux modes de transport s'élève à 96,94 %, tandis que le taux d'éclosion enregistré chez le témoin est de 83,12 %. Le pourcentage d'éclosion moyen des œufs de vers à soie avec la boîte 2 est de 93,36 %, soit 10,24 % de plus qu'avec le témoin quand les pontes sont transportées à bicyclette et en bus. Cette mauvaise éclosion du témoin pourrait être due aux conditions climatiques défavorables, c'est à dire à la variation de température, à une humidité relative basse et à l'accumulation de chaleur et de gaz générés par les œufs pendant le transport. Tazima (1978) a aussi observé que de mauvaises conditions climatiques pendant le développement embryonnaire peuvent entraîner une éclosion irrégulière et mauvaise. Le pourcentage d'éclosion moyen avec les deux modes de transport est de 96,94 et de 93,36 % avec la boîte 1 et la boîte 2, et pourrait être dû à une plus grande capacité d'absorption de l'eau du matériel utilisé pour la fabrication des boîtes, ce qui est aussi confirmé par les différences de température effective et d'humidité relative, soit respectivement - 4,55° C, + 19,90 % avec la boîte 1 et - 3,19° C, + 17,60 % avec la boîte 2.

Le pourcentage d'éclosion moyen enregistré avec la boîte 3 est de 92,59 %, ce qui est significativement plus que le témoin, mais 4,35 et 0,77 % de moins qu'avec la boîte 1 et la boîte 2, ce qui pourrait être dû aux différences de température effective et de l'humidité relative à l'intérieur des boîtes (Tableau 1). On observe un pourcentage d'éclosion de 90,52 % avec les pontes transportées dans la boîte 4, soit 2,07 % de moins qu'avec la boîte 3. Le taux d'éclosion des pontes transportées dans la boîte 5 est de 89,38 % et le taux le plus bas (84,27 %) est obtenu avec les pontes transportées dans la boîte 6. Le mauvais taux d'éclosion obtenu avec les pontes transportées dans les boîtes 5 et 6 pourrait être dû à une absorption de l'eau et à une capacité de rétention de l'humidité minimums des matériaux utilisés pour la fabrication des boîtes. Le transport des œufs de vers à soie a lieu pendant l'incubation et si les conditions environnementales font défaut, cela peut donc avoir un effet sur le nombre de mues de la race. Tanaka (1964), Tazima (1978) et Yamashita et coll., (1981) ont signalé que le nombre de mues est en général influencé par les conditions environnementales dominant pendant la durée de l'incubation et comme le transport a lieu pendant l'incubation, il faut faire très attention pendant le transport des oeufs.

Bíram Saheb et coll., (1990) ont constaté qu'une température élevée et qu'une humidité relative faible associées à des chocs pendant le transport des œufs de vers à soie entraînent une éclosion mauvaise et irrégulière et donnent des larves plus faibles. Ullal et Narasimhanna (1978) et Narasimhanna (1988) ont aussi remarqué que le maintien d'une température et d'une humidité relative faibles est extrêmement important pendant l'incubation. Une température élevée entraîne une perte en œufs, des œufs de trop petite taille et un mauvais rendement en cocons.

La différence significativement plus élevée du pourcentage d'éclosion avec les pontes transportées dans les boîtes 1 et 2 par rapport aux autres boîtes et au témoin pourrait être due aux fourchettes de température et à l'humidité relative optimums à l'intérieur des boîtes, qui sont dues au matériel utilisé pour la fabrication des boîtes, dont la capacité d'absorption et de rétention de l'humidité est comparativement plus élevée. De plus, la ventilation à l'intérieur des boîtes permet une libre circulation de l'air qui réduit l'accumulation de chaleur et de dioxyde de carbone libérés par les œufs de vers à soie.

On a jugé que la boîte 1 était la meilleure parmi toutes les boîtes pour le transport des œufs de vers à soie dans les conditions tropicales en Inde, compte tenu de la différence de la température effective et de l'humidité relative, du taux d'éclosion des œufs, du coût de fabrication et de sa technologie facilement adoptable. Après évaluation, nous avons modifié la boîte 1 pour une manipulation plus facile. La boîte modifiée a été préparée avec un grillage de netlon et de la mousse. La couche de mousse d'une longueur de 35 cm × 30 cm de hauteur × 15 cm de largeur est recouverte par le grillage de netlon des deux côtés et cousue. On l'équipe aussi d'une bandoulière pour pouvoir mettre la boîte sur l'épaule et pour la transporter facilement. On a aussi préparé un cadre en fer avec des crochets où l'on peut suspendre les feuilles de ponte. Vingt feuilles de ponte (400 pontes saines) peuvent être facilement transportées en une fois (Figs 1 et 2). Le coût de ce sac est de 140 Roupies et il dure pendant environ 10 ans ou plus. Ce sac modifié a été vulgarisé chez les fermiers surtout pour le transport des pontes de ver à soie sur de longues distances.

USE OF BANANA LEAF AS REARING BED AND COVER DURING YOUNG AGE SILKWORM, *BOMBYX MORI* LINN. REARING

G. P. SINGH, VINEET KUMAR* & R. K. DATTA

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

*Use of banana leaf as a rearing bed and cover during young age silkworm, **Bombyx mori** rearing was studied. The results indicated that there was a significant increase in the relative humidity in banana leaf rearing bed in both I instar (90.1%) and II instar (87.0 %) when compared to relative humidity in paraffin paper bed and in rearing room. The larval growth was also significantly increased and weight of 100 larvae was 0.557 g, 3.886 g and 26.463 g after 1st, 2nd and 3rd moults respectively more than the larval growth in paraffin paper rearing bed after 1st moult (0.541 g), 2nd moult (3.447 g) and 3rd moult (22.786 g). The percentage of larval loss was significantly less in case of banana leaf rearing bed after 1st moult (2.56%), 2nd moult (1.40 %) and 3rd moult (1.58%) than with paraffin paper rearing bed. The results of moisture percentage estimation in banana leaf indicated that there was no significant loss for a period of three days (82.90%).*

Keywords: *Bombyx mori*, young age, banana leaf, rearing bed.

INTRODUCTION

Young age silkworm grows fast at 28° C temperature and 85-90% relative humidity (Tanaka, 1964; Krishanaswami *et al.*, 1973; Jolly, 1987; Sengupta, 1989; ESCAP, 1993; AICAF, 1995; Datta *et al.*, 1996). Relative humidity plays a vital role in young age silkworm directly and indirectly (Suzuki, 1957; Tazima, 1978; Jolly, 1986). Exposure of young age silkworms to higher relative humidity above 90% particularly during rainy season make the silkworms susceptible to various diseases (Krishanaswami, 1986). Similarly, if bed humidity falls below 70% fast drying of mulberry leaves takes place. Thus leaves become unsuitable for consumption and the larval growth slows down. They become weak and easily susceptible to various diseases (Benjamin and Nagaraj, 1987). So, providing optimum relative humidity (85-90 %) is of paramount importance for the healthy growth of young age silkworm. To achieve the above, box type of rearing with paraffin paper as a bed and cover along with wet foam pads was recommended (Krishanaswami, 1978). However, the farmers do not use wooden box type rearing due to high cost and sometimes it is difficult for them to purchase paraffin paper, blue polythene sheet etc. Normally, they rear young age silkworms in bamboo trays. Therefore, an experiment was conducted to find out the effect of banana leaf as a rearing bed as well as cover and its suitability for young age silkworm, *Bombyx mori* rearing.

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

The banana leaf of 1.00 meter length was weighed every day for a period of five days to estimate the moisture content in banana leaf. The last day leaf was oven dried at 60° C for 24 hrs. The moisture percentage was calculated by the following standard formula:

$$\text{Percentage of moisture} = \frac{\text{Fresh leaf weight} - \text{dry leaf weight}}{\text{Fresh leaf weight}} \times 100$$

Popular bivoltine hybrids CC1 × NB4D2 of *B. mori* were used for the study. The larvae (N = 2000) were brushed in each wooden tray with paraffin paper and banana leaf separately as bed and cover in three replications. The larvae were reared upto 3rd moult. Bed temperature and relative humidity were recorded four times (6.00 a.m., 10.00 a.m., 4.00 p.m. and 10.00 p.m.) in 24 hours during 1st and 2nd instars in banana leaf and paraffin paper rearing beds separately by using dial hygrometer. The room temperature and relative humidity were also recorded for comparison. The initial weight of newly hatched 100 larvae after 1st, 2nd and 3rd moult, percentage of larval loss after each moult (1st, 2nd and 3rd moult) and the larval duration of 1st, 2nd and 3rd instars were recorded. The bed spacing, feeding quantum, feeding frequency, bed cleaning etc. were maintained as advocated by Krishanaswami *et al.*, (1973) in both treated and control batches. The banana leaf was replaced with fresh leaf after 1st moult. Economics of banana leaf in comparison to paraffin paper for 100 Dfls rearing was also calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

Maximum moisture percentage in banana leaf (84.76%) was recorded on the first day followed by second (83.42%), third (82.90%) and fourth day (78.36%) and least on fifth day (74.59%) (Table I).

Bed temperature reduced in banana leaf rearing bed (1.80%) and in paraffin paper rearing bed (0.90%) during I instar when compared to room temperature. Similarly during II instar also, the bed temperature reduced in banana leaf rearing bed (2.60 °C) and in paraffin paper rearing bed (1.80 °C) compared to room temperature (Table II). The relative humidity increased considerably in banana leaf rearing bed during 1st instar (36.43%) and 2nd instar period (38.25%). Whereas the relative humidity was increased only by 29.83 and 27.90% during 1st and 2nd instars respectively in paraffin paper rearing bed as compared to the relative humidity in the rearing room (Table II).

Table I. Estimation of moisture content (%) in banana leaf*.

Tableau I. Estimation du taux d'humidité (%) dans la feuille de banane.*

	Days / Jours					SE±	CD (5%)
	1	2	3	4	5		
Moisture content <i>Teneur en humidité</i>	84.76	83.42	82.90	78.36	74.59	0.677	1.932

* Values are average of three replicates / * Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

Table II. Variations in the temperature and relative humidity in paraffin paper, banana leaf and rearing room during young age.

Tableau II. Variations de la température et de l'humidité relative avec le papier de paraffine, la feuille de banane et dans la pièce d'élevage aux premiers âges.

Treatment Traitement	I Instar / 1 ^{er} âge								II instar / 2 ^{ème} âge							
	1 day 1 jour		2 days 2 jours		3 days 3 jours		Average Moyenne		1 day 1 jour		2 days 2 jours		Average Moyenne			
	Temp.		Temp.		Temp.		Temp.		Temp.		Temp.		Temp.			
	R.H.		R.H.		R.H.		R.H.		R.H.		R.H.		R.H.			
Paraffin paper as bed and cover <i>Papier de paraffine comme litière et couverture</i>	27.5	84.0	27.8	81.6	28.3	84.0	27.9	83.5	27.6	77.0	27.7	76.4	27.7	76.7		
Banana leaf as bed and cover <i>Feuille de banane comme litière et couverture</i>	27.4	91.0	26.0	89.9	27.8	89.3	27.0	90.1	27.1	86.9	26.5	87.2	26.8	87.0		
Rearing room <i>Pièce d'élevage</i>	28.8	51.6	29.0	64.3	28.5	45.0	28.8	53.6	29.5	45.3	29.2	52.3	29.3	48.8		
SE ±	0.293	0.792					0.138		0.457	0.253	0.504		0.108	0.357		
CD (5%)	0.696	0.298					0.401		1.320	0.457	1.500		0.323	1.060		

Table III. Variations in larval growth and larval loss during young age silkworm rearing in paraffin paper and banana.*Tableau III. Variations de la croissance larvaire et des pertes de larves pendant l'élevage des jeunes vers à soie dans du papier de paraffine et de la feuille de banane.*

Treatment	Weight of 100 larvae (g)				Larval loss (%)		
	Newly hatched	After I moult	After II moult	After III moult	After I moult	After II moult	After III moult
Traitement	Poids de 100 larves (g)				Perte de larves (%)		
	Venant d'éclore	Après la 1 ^{ère} mue	Après la 2 ^{ème} mue	Après la 3 ^{ème} mue	Après la 1 ^{ère} mue	Après la 2 ^{ème} mue	Après la 3 ^{ème} mue
Paraffin paper as bed and cover <i>Papier de paraffine comme litière et couverture</i>	0.046	0.541	3.447	22.786	3.580	1.750	2.000
Banana leaf as bed and cover <i>Feuille de banane comme litière et couverture</i>	0.046	0.577	3.886	26.463	2.560	1.400	1.580
SE ±	0.0050			0.132			
CD (5%)	0.0146			0.392			

The larval growth was increased and weight of 100 larvae after 1st, 2nd and 3rd moult was 0.577, 3.886 and 26.463 g respectively in banana leaf rearing batches, whereas, it was of 0.541, 3.447 and 22.786 g after 1st, 2nd and 3rd moult respectively in paraffin paper rearing batches. The percentage of larval loss was less 2.56, 1.40 and 1.58% after 1st, 2nd and 3rd moult in banana leaf rearing bed, whereas it was observed to be of 3.58, 1.75 and 2% after 1st, 2nd and 3rd moult in paraffin paper rearing bed (Table III).

The larval duration (1st – 3rd instar) was similar in banana leaf and paraffin paper as bed and cover. The feeding period of 1st, 2nd and 3rd instar was 78.00, 64.00 and 72.00 hours respectively, whereas the moulting period was 24.00, 20.00 and 24.00 hours during 1st, 2nd and 3rd moults.

To rear the young age silkworms (100 Dfls) in 4 bamboo trays (4' dia) 8 meter paraffin paper is required. Similarly 8 meter banana leaves for each 1st and for 2nd instar rearing are required for use as bed and cover (Table II).

The larvae reared with banana leaf as bed and cover have shown a significant improvement in growth when compared to the growth of larvae reared with paraffin paper as bed and cover. The improvement in larval growth in banana leaf rearing bed may be due to the optimum relative humidity higher than with paraffin paper rearing bed. The present findings confirm the earlier statements of Sharada and Bhat (1957) who observed a remarkable improvement of larval body weight under optimum relative humidity. Similarly Tanaka (1964), AICAF (1995) and Datta (1992) confirm that young age silkworm larvae are more resistant to high humidity (85-90%) and they support better survival, maximum growth and cocoon characters. Sengupta (1989) and Datta (1992) reported that for successful silkworm crop, regulation of temperature and relative humidity is necessary for young

age silkworm. Further the higher relative humidity and low temperature in banana leaf rearing bed may keep chopped mulberry leaves fresh to be fed to silkworms which enables better growth of silkworms. This is in agreement with earlier work of Benchamin and Nagaraj (1987). Sookcharoen and Ngamprasith (1973) have analysed that paraffin paper is effective to keep chopped leaves in fresh condition in the rearing bed, but it is not available everywhere, and repeated use of paraffin paper may cause the contamination of silkworms by pathogens of various diseases (Jolly, 1986).

The larval growth was increased and weight of 100 larvae after 1st, 2nd and 3rd moult was 0.577, 3.886 and 26.463 g respectively in banana leaf rearing batches, whereas, it was of 0.541, 3.447 and 22.786 g after 1st, 2nd and 3rd moult respectively in paraffin paper rearing batches. The percentage of larval loss was less 2.56, 1.40 and 1.58% after 1st, 2nd and 3rd moult in banana leaf rearing bed, whereas it was observed to be of 3.58, 1.75 and 2% after 1st, 2nd and 3rd moult in paraffin paper rearing bed (Table III).

Table IV. Economics of banana leaf vis-à-vis paraffin paper for rearing of young age silkworm upto II moult (100 Dfls).

Tableau IV. Coût de la feuille de banane par rapport au papier de paraffine pour l'élevage des premiers âges jusqu'à la 2^{ème} mue (100 pontes saines).

Bed cover	No. of bamboo trays required	Qty. of bed and cover required	Rate / m (Rs.)	Total amount (Rs.)	Durability
<i>Couverture pour litière</i>	<i>Nbre de plateaux en bambou nécessaires</i>	<i>Qté de litières et de couvertures nécessaires</i>	<i>Coût / mètre (Roupies)</i>	<i>Coût total (Roupies)</i>	<i>Durée</i>
Paraffin paper	4 No. (4' dia) (25 Dfls / tray)	2 m × 4 trays (1 m for bed 1 m for cover)	6-50*	52-00	one time
<i>Papier de paraffine</i>	<i>4 (1,30 m de dia.) (25 pontes saines / plateau)</i>	<i>2 m × 4 plateaux (1 m pour la litière 1 m pour la couverture)</i>	<i>6-50*</i>	<i>52-00</i>	<i>une fois</i>
Banana leaf	4 No. (4' dia) (25 Dfls / tray)	2 m × 4 trays (1 m for bed & 1 m for cover)	1-00**	8-00 8-00 16-00	one time in I instar one time in II instar
<i>Feuille de banane</i>	<i>4 (1,30 m de dia.) (25 pontes saines / plateau)</i>	<i>2 m × 4 plateaux (1 m pour la litière & 1 m pour la couverture)</i>	<i>1-00**</i>	<i>8-00 8-00 16-00</i>	<i>une fois au 1^{er} âge une fois au 2^{ème} âge</i>

* indicate cost per meter as per the prevailing market rate / indique le coût par mètre au cours actuel du marché.

** indicate cost as per the prevailing rate in the village / indique le coût au cours actuel dans le village.

The percentage of larval loss was significantly less after 1st, 2nd and 3rd moult in banana leaf rearing bed. Similarly, Krishanaswami *et al.*, (1979) and Benchamin (1987) reported that low humidity during young age rearing reduced the value of larval characters and increased the missing larval percentage.

The banana leaf holds considerable amount of water content, its usage as rearing bed and cover during 1st and 2nd instars help in increasing the relative humidity in the rearing bed during summer and winter. It prevents the driage of mulberry leaves, so the palatability of mulberry leaf as food can be maintained for a longer time.

The cost of 8 meter paraffin paper to rear the 100 Dfls amounts to Rs. 52.00 @ 6.50 / meter, while the cost of 16 meter banana leaves, 8 meter each for 1st and 2nd instars Rs. 16.00 @ Rs. 1.00 / meter. Therefore Rs. 36.00 can be saved on one crop for 100 Dfls silkworm rearing. Besides, banana plant is being cultivated abundantly in the southern sericulture states, Karnataka, Tamil Nadu, Andhra Pradesh, Kerala and Maharashtra. Therefore, the sericultural farmer in these states need not spend extra money to adopt the technology.

REFERENCES

- AICAF (1995) Sericulture in the tropics. Published by Association for International Cooperation of Agriculture and Forestry, Japan, pp92.
- BENCHAMIN K.V. (1987) A Text Book of Sericulture Extension Workers. Published by C.S.R.& T.I, Mysore, Central Silk Board, India pp. 144.
- BENCHAMIN K. V., NAGARAJ C. S. (1987) Silkworm rearing techniques. In Appropriate Sericulture Techniques (ed.) M. S. Jolly I.C.T.R.E.T.S., Mysore pp. 63-106.
- DATTA R. K. (1992) Guidelines for bivoltine rearing. Published by Central Silk Board, Bangalore, India pp. 18.
- DATTA R. K., BASAVARAJ H. K., MANO Y. (1996) Manual on bivoltine rearing, race maintenance and multiplication. Published by Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 8-13.
- ESCAP (1993) Techniques of silkworm rearing in the Tropics. Published by United Nations, New York, 47.
- JOLLY M. S. (1986) Pebrine and its control. Bulletin No. 5, C.S.R. & T. I., Mysore, pp. 29.
- JOLLY M. S. (1987) Chawki rearing concept, organisation and management. Indian Silk, 25(9), 32-37.
- KRISHANASWAMI S. (1978) Concept and precautions to be taken in young age (chawki silkworm) rearing. International Congress on Tropical Sericulture Practices, Bangalore, Feb.18-23.
- KRISHANASWAMI S. (1986) Improved methods of rearing young (chawki) silkworms, Central Silk Board, Bangalore, pp.24.
- KRISHANASWAMI S., NARASIMHANNA M. N., SURYANARAYANA S. K., KUMARAJA S. (1973) Manual on sericulture -2, Silkworm rearing, F.A.O. Rome, pp. 42-43.
- KRISHANASWAMI S., SINGH K., RAGHURAMAN, GEETHA DEVI R. G. (1979) Studies on the effect of humidity during different larval stages on the cocoon crop and quality, Annual Report, C.S.R.&T.I., Mysore, pp. 53-54.
- SENGUPTA K. (1989) A guide for Bivoltine Sericulture, Published by C.S.R. & T.I., Mysore, pp. 39.
- SHARADA K., BHAT J. V. (1957) Influence of humidity of feed utilisation by the silkworm, *Bombyx mori* L., J. Indian Inst. Sci. 39(3), 220-223.
- SOOKCHAROEN W., NGAMPRASITH T. (1973) A test to keep chopped mulberry leaves from weathering. Bull. Thai. Seri. Res. & Training Centre, 3, 51-52.
- SUZUKI C. (1957) Micrometeorological studies on silkworm rearing seats. Bull. Seric. Exp. Sta. Japan, 14(11), 561-565.
- TANAKA Y. (1964) Sericology: Published by Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 20-35.
- TAZIMA Y. (1978) The silkworm - an important laboratory tool, Kodansha Ltd. Japan, pp. 26.

UTILISATION DE LA FEUILLE DE BANANE COMME LITIÈRE ET COUVERTURE PENDANT L'ÉLEVAGE DES PREMIERS ÂGES DU VER À SOIE, *BOMBYX MORI* LINN.

G. P. SINGH, VINEET KUMAR* & R. K. DATTA

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

Nous avons étudié l'utilisation de la feuille de banane comme litière et comme couverture pendant les premiers âges du ver à soie, *Bombyx mori*. Les résultats indiquent qu'il y a une augmentation significative de l'humidité relative avec la feuille de banane comme litière à la fois pendant le premier âge (90,1 %) et pendant le 2^{ème} âge (87,0 %) par rapport à l'humidité relative que l'on obtient avec le papier de paraffine comme litière et dans la pièce d'élevage. La croissance larvaire augmente aussi de manière significative et le poids de 100 larves est de 0,557 g, 3,886 g et de 26,463 g après respectivement la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue, ce qui est plus que la croissance larvaire avec du papier de paraffine comme litière : après la 1^{ère} mue (0,541 g), la 2^{ème} mue (3,447 g) et la 3^{ème} mue (22,786 g). Le pourcentage de perte de larves est significativement moins élevé avec l'élevage sur de la feuille de banane après la 1^{ère} mue (2,56 %), la 2^{ème} mue (1,40 %) et la 3^{ème} mue (1,58 %) qu'avec du papier de paraffine comme litière. Les résultats concernant l'estimation du pourcentage d'humidité avec la feuille de banane indiquent qu'il n'y a pas de perte significative pendant une période de trois jours (82,90 %).

INTRODUCTION

Le jeune ver à soie grandit rapidement à une température de 28 °C et avec une humidité relative de 85 à 90 % (Tanaka, 1964 ; Krishanaswami et coll., 1973 ; Jolly, 1987 ; Sengupta, 1989 ; ESCAP, 1993 ; AICAF, 1995 ; Datta et coll., 1996). L'humidité relative joue un rôle vital chez le jeune ver à soie directement et indirectement (Suzuki, 1957 ; Tazima, 1978 ; Jolly, 1986). L'exposition des jeunes vers à soie à une humidité relative élevée, plus de 90 %, particulièrement pendant la saison des pluies rend les vers à soie sensibles à des maladies variées (Krishanaswami, 1986). De même, si l'humidité de la litière descend au-dessous de 70 %, les feuilles de mûrier se dessèchent très rapidement. Les feuilles deviennent impropres à la consommation et la croissance des larves ralentit. Elles deviennent faibles et facilement sujettes à des maladies variées (Benjamin et Nagaraj, 1987). Il est donc très important de fournir une humidité relative optimum (85 à 90 %) pour que la croissance des jeunes vers à soie soit saine. Dans ce but, on a recommandé l'élevage dans des boîtes avec une litière et une couverture en papier de paraffine et l'utilisation de tapis de mousse mouillés (Krishanaswami, 1978). Cependant, les fermiers n'ont pas recours à l'élevage dans des boîtes en bois à cause de son coût élevé et parce qu'il est parfois difficile pour eux d'acheter du papier de paraffine, des feuilles de plastique bleu... Normalement, ils élèvent les jeunes vers à soie sur des plateaux en bambou. Nous avons donc réalisé une expérience pour connaître l'effet de l'utilisation de la feuille de banane comme litière et comme couverture et pour savoir si elle est adaptée à l'élevage du jeune ver à soie *Bombyx mori*.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

Une feuille de banane de 1 mètre de longueur est pesée chaque jour pendant une période de cinq jours pour estimer la teneur en humidité de la feuille de banane. Le dernier jour, la feuille de banane est séchée dans un four à 60°C pendant 24 heures. Le pourcentage d'humidité est calculé d'après la formule standard suivante :

$$\text{Pourcentage d'humidité} = \frac{\text{Poids de la feuille fraîche} - \text{poids de la feuille sèche}}{\text{Poids de la feuille fraîche}} \times 100$$

Des hybrides bivoltins populaires CC1 × NB4D2 de *B. mori* sont utilisés pour l'étude. Les larves (N = 2000) sont levées séparément sur des plateaux en bois avec une litière et une couverture en papier de paraffine ou en feuille de banane en trois répétitions. Les larves sont élevées jusqu'à la troisième mue. La température de la litière et l'humidité relative sont enregistrées quatre fois (6 heures, 10 heures, 16 heures, et 22 heures) par 24 heures pendant les premier et 2^{ème} âges dans les litières en feuille de banane et en papier de paraffine séparément en utilisant un hygromètre à cadran. La température et l'humidité relative de la pièce sont aussi enregistrées à des fins comparatives. Le poids initial de 100 larves venant d'éclore après la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue, le pourcentage de perte de larves après chaque mue (1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} mue) et la durée larvaire des 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âges sont enregistrés. On suit les recommandations de Krishanaswami et coll., (1973) pour l'espacement sur la litière, la quantité de nourriture, la fréquence de nourrissage, le nettoyage de la litière chez les lots traités et témoins. La feuille de banane est remplacée par une feuille fraîche après la 1^{ère} mue. Le coût de la feuille de banane par rapport au papier de paraffine pour 100 pontes saines est aussi calculé.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le pourcentage d'humidité maximum de la feuille de banane est enregistré le premier jour (84,76 %). On obtient 83,42 % le deuxième jour, 82,90 % le troisième jour et 74,59 % le quatrième jour (Tableau I).

La température de la litière diminue avec la litière en feuille de banane (1,80%) et avec la litière en papier de paraffine (0,90 %) pendant le 1^{er} âge quand on les compare à la température de la pièce. De même, pendant le 2^{ème} âge, la température baisse aussi avec la litière en feuille de banane (2,60 °C) et avec la litière de papier de paraffine (1,80 °C) par rapport à la température de la pièce (Tableau II). L'humidité relative augmente de manière considérable avec la litière en feuille de banane pendant le 1^{er} âge (36,43 %) et pendant le 2^{ème} âge (38,25 %). Tandis que l'humidité relative n'augmente que de 29,83 et 27,90 % respectivement pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge avec la litière en papier de paraffine comparée à l'humidité relative dans la pièce d'élevage (Tableau II).

La croissance larvaire augmente et le poids de 100 larves après la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue est de respectivement 0,577 ; 3,886 et 26,463 g chez les lots élevés sur de la feuille de banane tandis qu'il est de 0,541 ; 3,447 et 22,786 g après respectivement la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue chez les lots élevés sur du papier de paraffine. Le pourcentage de perte de larves est inférieur : 2,56 ; 1,40 et 1,58 % après la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue chez les lots élevés sur de la feuille de banane tandis qu'il est de 3,58 ; 1,75 et 2 % après la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue pour l'élevage sur papier de paraffine (Tableau III).

La durée larvaire (1^{er} au 3^{ème} âge) est similaire avec la feuille de banane et le papier de paraffine comme litière et couverture. La période de nourrissage du 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âge dure respectivement 78, 64 et 72 heures tandis que la période de mue dure 24, 20 et 24 heures pendant la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue.

Pour élever les jeunes vers à soie (100 pontes saines) dans 4 plateaux en bambou (1,30 m de diamètre) il faut 8 mètres de papier de paraffine. De même, il faut 8 mètres de feuilles de banane pour l'élevage du 1^{er} âge et 8 mètres pour le 2^{ème} âge pour la litière et la couverture (Tableau II).

La croissance des larves qui sont élevées sur une litière et avec une couverture en feuille de banane est meilleure que celle des larves élevées sur une litière et une couverture en papier de paraffine. L'amélioration de la croissance larvaire avec une litière en feuille de banane pourrait être due à l'humidité relative optimum qui est plus élevée qu'avec le papier de paraffine. Ces observations confirment les rapports précédents de Sharada et Bhat (1957) qui ont observé une amélioration remarquable du poids des larves avec une humidité relative optimum. De même Tanaka (1964), l'AICAF (1995) et Datta (1992) ont confirmé que les larves des jeunes vers à soie sont plus résistantes avec une humidité élevée (85 à 90 %) et qu'elles ont une meilleure survie, et une croissance et des caractères de cocons maximums. Sengupta (1989) et Datta (1992) ont rapporté que pour obtenir une bonne récolte de cocons, il faut une régulation de la température et de l'humidité relative pour les jeunes vers. De plus, l'humidité plus élevée et la température basse obtenues avec la litière en feuille de banane pourraient conserver la fraîcheur des feuilles de mûrier données en nourriture aux vers, ce qui permet une meilleure croissance des vers à soie. Cela confirme les travaux précédents de Benchamin et Nagaraj (1987). Sookcharoen et Ngamprasith (1973) ont estimé que le papier de paraffine est efficace pour conserver la fraîcheur des feuilles coupées dans la litière, mais il n'est pas disponible partout et l'usage répété du papier de paraffine pourrait provoquer la contamination des vers à soie par les pathogènes de maladies variées (Jolly, 1986).

Le pourcentage de pertes de larves est significativement moins important après la 1^{ère}, la 2^{ème} et la 3^{ème} mue avec l'élevage qui utilise la feuille de banane comme litière. Krishanaswami et coll., (1979) et Benchamin (1987) ont aussi signalé qu'une faible humidité pendant l'élevage des premiers âges baisse la valeur des caractères larvaires et augmente le pourcentage de perte de larves.

La feuille de banane contient une quantité considérable d'eau, son utilisation comme litière et comme couverture pendant les 1^{er} et 2^{ème} âges concourt à augmenter l'humidité relative dans la litière pendant l'été et le printemps. Elle prévient le dessèchement des feuilles de mûrier, et la saveur de la feuille de mûrier peut donc être conservée plus longtemps.

Le coût pour 8 mètres de papier de paraffine pour élever 100 pontes saines s'élève à 52 Roupies à raison de 6,50 Roupies / mètre tandis que le coût pour 16 mètres de feuilles de banane, 8 mètres pour le 1^{er} âge et 8 mètres pour le 2^{ème} âge s'élève à 16 Roupies soit 1 roupie / mètre. On peut donc économiser 36 roupies pour élever une récolte avec 100 pontes saines. De plus, le bananier est abondamment cultivé dans les états séricicoles du sud, le Karnataka, le Tamil Nadu, l'Andhra Pradesh, le Kerala et le Maharashtra. Le fermier séricicole dans ces Etats n'a donc pas besoin de dépenser plus d'argent pour utiliser cette technologie.

INDIRECT ORGANOGENESIS THROUGH STEM CALLUS IN MULBERRY VARIETY BERTHAMPORE LOCAL

M. N. SRINIVASA, H. M. REVANASIDDIAIAH*, M. C. GAYATRI** &
R. KAVYASHREE**

Department of Sericulture, Maharani's Science College for Women,
Mysore – 570 005, Karnataka, India.

*In the present study, callus was induced from explants of *in vitro* raised plants obtained from self pollinated seeds of mulberry variety Berthampore local when cultured on MSBM supplemented with 2,4-D (2 mg l^{-1}), CM (10%) and CH (1 mg l^{-1}). After three weeks of subculturing on the same medium the callus proliferated further into profuse compact callus with the development of tiny green primordia. This morphogenic callus developed 5-6 multiple shoots within six weeks when transferred on MSBM supplemented with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM (10%) and CH (1 mg l^{-1}). In the present study it was found that callus can be maintained up to 6 months on MSBM with 2,4-D (2 mg l^{-1}) and CM (10%). For the first time, repeatable protocol was developed for differentiation of shoots from the stem callus for this variety. The differentiated shoots were transferred to rooting media and the best rooting was observed on MSBM supplemented with NAA (1 mg l^{-1}). The rooted *in vitro* plants were successfully hardened and transferred to the field.*

Keywords: Mulberry (*Morus* spp.), morphogenic callus, multiple shoots, root induction.

INTRODUCTION

Tremendous progress has been made with mulberry during the past three decades in several aspects of tissue culture and its development has attracted the interest of many biotechnologists. Most of the studies in mulberry tissue culture are confined to regeneration and micropropagation using different explants (Ohyama, 1970, Ghugale *et al.*, 1971, Oka and Ohyama, 1974, Patel *et al.*, 1983, Chang, 1985, Ivanicka, 1987, Tewary and Subba Rao, 1990). At present, very little information is available on callus induction in different varieties of mulberry (Oshigane, 1989, Narayan *et al.*, 1989 and Rao and Raghunath, 1993). However, differentiation of shoots from the callus is not well studied and repeatability of the protocols developed hitherto, is not assured (Tewary *et al.*, 1996). Therefore, in the present investigation a repeatable protocol has been developed for the indirect organogenesis through stem callus of aseptic plants obtained from self pollinated seeds of mulberry variety Berthampore local.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry belongs to the genus *Morus* of the family Moraceae, the biggest family in the order Urticales. The mulberry variety Berthampore local is a popular variety bearing monoecious flowers.

* Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore – 560 056, Karnataka, India.

**Department of Botany, Bangalore University, Bangalore –560 056, Karnataka, India.

The pollens were collected from the male flowers with the help of a small camel hair brush into a small specimen tubes and were dusted on the stigmatic surface of the female flowers by removing the polythene bags and covering them again after dusting till the stigma is no more receptive to obtain self pollinated seeds. The self pollinated seeds of this variety were collected from the mulberry germplasm bank, Department of Sericulture, Jnanabharathi, Bangalore University, Bangalore – 560 056.

The self pollinated seeds were surface sterilized following the standard procedure and they were inoculated on MS basal medium without any adjuvants for germination. The stem explants were collected from *in vitro* raised plants of mulberry variety Berhampore local for callus induction and shoot regeneration. The stem explants measuring 0.5 – 1.0 cm were inoculated on MSBM supplemented with 2,4-D (2 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}) for callusing. The callus was subcultured on MSBM supplemented with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}) for shoot regeneration. The multiple shoots developed from callus were transferred to the rooting medium that is MSBM supplemented with NAA (1 mg l^{-1}) for rooting. The cultures were maintained in a culture room at temperature of $25 \pm 2^\circ \text{C}$ with light at a photon density of $30\text{-}50 \text{ U Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and Relative Humidity (RH) 55-60%.

The multiple shoots with well developed roots were carefully taken out from the culture tubes and washed with water to remove the traces of agar. They were then transferred to net pots 4 cm height and 3 cm diameter containing different combinations of peat : perlite : sand (50 : 25 : 25 v / v). The potted plants were kept in the green house conditions covered with polythene covers to maintain high humidity (90-92%). After three weeks the covers were removed gradually to expose the plants to less humid conditions and transferred to the field.

RESULTS

In the present study aseptic stem segments obtained from the self pollinated seeds of Berhampore local variety were used for callus induction on MSBM supplemented with 2,4-D (2 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}). After three weeks of culture the cut end of the explants proliferated into profuse compact callus with initiation of roots. When the above callus was subcultured on the same medium further growth of callus with tiny green primordium was observed after three weeks. This primordium developed 5-6 multiple shoots within six weeks, when the callus was subcultured on MSBM with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}).

The induced callus was maintained on MSBM supplemented with 2,4-D (2 mg l^{-1}) and CM 10% for a period of six months and this six months old callus has regenerating capacity to form multiple shoots when it was transferred to MSBM with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}).

In vitro raised shoots measuring 5 to 8 cm height were transferred to rooting medium MSBM with NAA (1 mg l^{-1}) and gave the best rooting ratio (25-30 roots) after three weeks of culture. The plantlets with appropriate shoots and roots, (shoot length 6 cm, root length 3 cm) were washed in water for hardening process with different types of potting mixture (Table I).

Among all the combinations of potting mixtures tried it was found that potting mixture peat: perlite : sand in the ratio of 50 : 25 : 25 (v/v) was found to be the best combination for hardening of mulberry. The survival percentage of *in vitro* raised plants was found to be 90-95% in the above potting mixture (Table I).

DISCUSSION

The advantage of using *in vitro* plant derived tissue is essential due to the fact that it is free of phenolic compounds, the accumulation of which inhibits organogenesis in the tree plants as described by Jyothi and Dhar (1996). The present investigation is in agreement with many researchers who used explants derived from aseptic plants for micropropagation of woody plants (Neena Kumari and Pardha

Saradhi, 1992, Saxena *et al.*, 1997, Ivana *et al.*, 1997). In the present investigation 2,4-D was used for the induction of callus and the results are confirmed with the findings of earlier reports (Ohyama, 1970, Tewary *et al.*, 1996, Jain *et al.*, 1990). Further, in the present findings addition of CM (10%) and CH (1 mg l^{-1}) was more effective in inducing callus with shoot primordia. For shoot multiplication from the developed shoot primordium, it was observed in the present study that the MSBM with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM (10%) and CH (1 mg l^{-1}) was found to be the best medium. The presence of BAP in MSBM without auxin promotes the rate of shoot multiplication in mulberry which is also in support of Oka and Ohyama (1974), Mhatre *et al.*, (1985), Kim *et al.*, (1985) and Rao and Raghunath (1993) in different varieties of mulberry. It was found in the present study that the induced callus was maintained on MSBM supplemented with 2,4-D (2 mg l^{-1}) and CM 10% for a period of six months. This six months old callus can be regenerated on MSBM with BAP (2.5 mg l^{-1}), CM 10% and CH (1 mg l^{-1}).

In the present observation, MSBM supplemented with NAA (1 mg l^{-1}) was found to be the best rooting hormone. This is in agreement with the findings of Ohyama (1970), Hossain *et al.*, (1992) and Machii (1992).

Table I. Performance of mulberry variety Berhampore local on various potting mixtures.

Tableau I. Performance de la variété locale Berhampore avec différents mélanges de terreau.

Type and ratio of potting mixture	% Response
<i>Type et composition du mélange de terreau</i>	<i>% de réponse</i>
Peat (100 %) / <i>Tourbe (100%)</i>	85
Peat + Perlite (50 : 50) / <i>Tourbe + Perlite (50 : 50)</i>	80
Peat + sand (50 : 50) / <i>Tourbe + sable (50 / 50)</i>	82
Peat + Perlite + Sand (50 : 25 : 25) / <i>Tourbe + Perlite + Sable</i>	95
Perlite (100 %)	60
Sand (100%) / <i>Sable (100%)</i>	62
Sand + Perlite (50 : 50) / <i>Sable + Perlite (50 : 50)</i>	62

Generally the *in vitro* regenerated plants as such do not synthesise the cuticle and epicuticular wax on the epidermis of leaves (Bramerd and Fluchigami, 1982). Consequently, when such plants are transferred to the natural conditions they undergo desiccation and death. Therefore, in the present study *in vitro* plants are covered with polythene bags to maintain 92-95% humidity with intermittent water spray. The covers were removed after three weeks and the intermittent water spray was reduced. Further, the plantlets which were transferred to net pots containing peat: perlite: sand (50 : 25 : 25 v/v) which gave the maximum survivability (95%) due to the fact that the potting mixture has optimum moisture retention capacity and good aeration in the root zone.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial assistance provided by Council of Scientific & Industrial Research (CSIR), New Delhi, to one of the authors Kavyashree R. is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BRAMERD K. E. & FLUCHIGAMI L. H. 1982. Stomatal functioning of *in vitro* green horse apple leaves in darkness, mannitol, CO₂, and ABA. *J. Exp. Bot.*, 33: 388-392.
- CHUNG J. S. 1985. Tissue culture of winter shoots of Baigelu mulberry (*Morus ihou koidz*) trees, *Sanxi Agri. Sci.* 3: 17-18 (ch).
- GHUGALE D. D., KULKARNI D. & NARASIMHAN R. 1971. Clonal propagation of *Morus alba*. *Indian J. Exp. Biol.* 9: 381-384.
- HOSSAIN M., RAHMAN S. M., ZAMAN A., JOARDER I. & ISLAM R. 1992. Micropropagation of *Morus laevigata* wall. from mature trees. *Plant Cell Reports*, 11(10): 522-524.
- IVANA M., DRAGOLIJUB G. & MIRJANA N. 1997. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. crucita*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 49: 141-144.
- IVANICKA J. 1987. *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. *Scientia Horticulture* (Netherlands) 32(1): 33-39.
- JAIN A. K., DANDIN S. B. & SENGUPTA K. 1990. Micropropagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. *Plant Cell. Rep.* 8: 737-740.
- JYOTHI V. & DHAR V. 1996. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight and Arnott a leguminous liana, *Plant Cell Rep.* 16 :254.
- KIM H. R., PATEL K. R. & THORPE T. A. 1985. Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. *Botanical gazette (U.S.A.)* 146(3): 335-340.
- MACHII H. 1992b. Organogenesis from immature leaf culture in mulberry, *Morus alba* L. *J. Seric. Sci. Jpn.* 61(6): 512-519.
- MHATRE M., BAPAT V. A. & RAO P. S. 1985. Regeneration of plants from culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) *Plant Cell Rep.* 4: 78-80.
- NARAYANA P., CHAKRABORTI S. & RAO G. S. 1989. Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of matured plants of *Morus alba* L. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* B55, 5 & 6: 469-472.
- NEENA KUMARI & PARDHA SARADHI P. 1992. Regeneration of plants from callus of *Origanum vulgave* L. *Plant Cell Rep.* 11: 476-479.
- OHYAMA K. 1970. Tissue culture in mulberry tree. *JARQ* 5(1): 30-34.
- OSHIGANE K. 1989. On the redifferentiation of shoot callus to different culture in mulberry. *J. Fac. Text. Sci. Tech. Shinshu Univ. E. Agri. Seric.* 107:38.
- OKA S. & OHYAMA K. 1974. Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree I. Effect of growth substance on the development of shoots and organ formation from winter buds. *J. Seric. Sci. Jpn* 43(3): 230-235 (J).
- PATEL G. K., BAPAT V. A. & RAO P. S. 1983. *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*. Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. *Zeitschrift-fuer-Pflanzenphysiologie (Germany, F. R.)* 111(5): 465-468.
- RAO S. & RAGHUNATH M. K. 1993. Callus initiation, growth and plant regeneration in mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *J. Swamy Bot. Club.* 10: 17-21.
- SAXENA C., PALAI S. K., SAMANTARAY S., ROUT G. R. & DAS P. 1997. Plant regeneration from callus cultures of *Psaratea corylifolia* Linn. *Plant Growth Regulation*, 22: 13-17.
- TEWARY P. K., RAGHUNATH M. K., VENKATESWARLU M. & SARKAR 1996. Genotypic differences in responses to *in vitro* shoot development of mulberry (*Morus* spp.). *Indian Journal of Sericulture* 35(2): 104-106.
- TEWARY P. K. & SUBBA RAO G. (1990) Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. *Indian Journal of Forestry* 13(2): 109-111.

ORGANOGENESE INDIRECTE PAR DES CALS DE LA TIGE CHEZ LA VARIETE DE MURIER LOCALE BERHAMPORE

M. N. SRINIVASA, H. M. REVANASIDDAIAH*, M. C. GAYATRI** &
R. KAVYASHREE**

Department of Sericulture, Maharani's Science College for Women, Mysore – 570 005,
Karnataka, Inde.

*Dans cette étude, des cals, cultivés dans du MSBM additionné de 2,4-D (2 mg l^{-1}), de CM (à 10 %) et de CH (1 mg l^{-1}) ont été induits à partir d'explants de plants cultivés *in vitro*, obtenus à partir de graines autopolinisées de la variété de mûrier Berhampore. Après trois semaines de sous-culture dans le même milieu on observe une prolifération abondante de cals compacts avec le développement de minuscules ébauches vertes. Ce cal morphogénique développe 5 à 6 pousses multiples en six semaines quand on le transfère dans du MSBM additionné avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM (10%) et du CH (1 mg l^{-1}). Dans cette étude, nous observons que le cal peut être maintenu jusqu'à six mois dans du MSBM avec du 2,4-D (2 mg l^{-1}) et du CM (10 %). Pour la première fois chez cette variété, un protocole que l'on peut répéter a été mis au point pour la différenciation des pousses à partir du cal de la tige. Les pousses différenciées sont transférées dans un milieu de racinement qui est meilleur dans du MSBM additionné avec du NAA (1 mg l^{-1}). Les plants racinés *in vitro* se fortifient avec succès et sont transférés sur le terrain.*

INTRODUCTION

Des progrès énormes ont été faits depuis les trois dernières décennies en ce qui concerne plusieurs aspects de la culture et du développement des tissus chez le mûrier, ce qui a attiré l'intérêt de nombreux biotechnologistes. La plupart des études sur la culture des tissus de mûrier se confinent à la régénération et à la micropropagation en utilisant différents explants (Ohyama, 1970, Ghugale et coll., 1971, Oka et Ohyama, 1974, Patel et coll., 1983, Chang, 1985, Ivanicka, 1987, Tewary et Subba Rao, 1990). A présent, il existe très peu d'information sur l'induction de cals chez différentes variétés de mûrier (Oshigane, 1989, Narayan et coll., 1989 et Rao et Raghunath, 1993). La différenciation des pousses du cal n'a pas été bien étudiée et on ne peut donc s'assurer que les protocoles peuvent être répétés (Tewary et coll., 1996). Nous avons donc mis au point dans cette étude un protocole que l'on peut répéter pour l'organogenèse indirecte avec le cal de la tige de plants aseptiques obtenus à partir de graines autopolinisées de la variété de mûrier locale Berhampore.

MATERIELS ET METHODES

Le mûrier appartient au genre *Morus* de la famille des Moraceae, la plus grande famille dans l'ordre des Urticales. La variété de mûrier locale Berhampore est une variété populaire avec des fleurs

* Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore – 560 056, Karnataka, Inde.

** Department of Botany, Bangalore University, Bangalore – 560 056, Karnataka, Inde.

monoïques. On recueille le pollen des fleurs mâles à l'aide d'une petite brosse en poils de chameau dans un petit tube à spécimen et on le saupoudre sur la surface stigmatique des fleurs femelles après avoir enlevé les sachets de polyéthylène qui les recouvre et en les remettant après les avoir saupoudrées jusqu'à ce que le stigmate ne soit plus réceptif pour obtenir des graines autopolinisées. Les graines autopolinisées de cette variété sont recueillies à la banque génétique du murier, au Département de Sériciculture, Jnanabharathi, Université de Bangalore, Bangalore – 560 056.

La surface des graines auto-pollinisées est stérilisée en suivant la procédure standard et elles sont inoculées dans un milieu MS de base sans adjuvant pour la germination. Les explants de la tige sont recueillis sur des plants de la variété de murier locale Bherampore cultivés *in vitro* pour l'induction des cals et la régénération des pousses. Des explants de la tige mesurant 0,5 – 1.0 cm sont inoculés dans du MSBM additionné avec du 2,4-D (2 mg l^{-1}), du CM à 10% et du CH (1 mg l^{-1}) pour l'obtention des cals. Le cal est mis en sous-culture dans du MSBM additionné avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM à 10 % et du CH (1 mg l^{-1}) pour la régénération des pousses. Les pousses multiples obtenues à partir du cal sont transférées dans le milieu de racinement qui est du MSBM, additionné avec du NAA (1 mg l^{-1}). Les cultures sont maintenues dans une pièce de culture à une température de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ avec une lumière à une densité de photon de $30 \text{ à } 50 \text{ U Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et une Humidité Relative (RH) de 55 à 60 %.

Les pousses multiples aux racines bien développées sont soigneusement retirées des tubes de culture et lavées avec de l'eau pour enlever les traces de gélose. Elles sont ensuite transférées dans des pots de 4cm de hauteur et de 3cm de diamètre contenant différentes combinaisons de tourbe : perlite : sable ($50 : 25 : 25 \text{ v/v}$). Les plants en pot sont gardés dans une serre et recouverts de sacs en polyéthylène pour maintenir une humidité élevée (90 à 92 %). Après trois semaines les sacs sont progressivement retirés pour exposer les plants à des conditions moins humides et ils sont transférés sur le terrain.

RESULTATS

Dans cette étude, des morceaux de tige aseptisés obtenus à partir de graines autopolinisées de la variété locale Bherampore sont utilisés pour l'induction de cals dans du MSBM additionné avec du 2,4-D (2 mg l^{-1}), du CM à 10% et du CH (1 mg l^{-1}). Après trois semaines de culture on observe une prolifération abondante de cals compacts avec un début de racines, au bout des explants. Quand ce cal est mis en sous-culture dans le même milieu, on observe une croissance supplémentaire de cals avec des minuscules ébauches vertes après trois semaines. Cette ébauche, développe 5 à 6 pousses multiples en l'espace de six semaines, quand on met le cal en sous-culture dans du MSBM avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM à 10% et du CH (1 mg l^{-1}).

Le cal induit est maintenu dans du MSBM additionné avec du 2,4-D (2 mg l^{-1}) et du CM à 10 % pendant une période de six mois et ce cal âgé de six mois a une capacité de régénération pour former des pousses multiples quand il est transféré dans du MSBM avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM à 10% et du CH (1 mg l^{-1}).

Les pousses cultivées *in vitro* mesurant de 5 à 8 cm de hauteur sont transférées dans un milieu de racinement MSBM avec du NAA (1 mg l^{-1}) et donnent le meilleur pourcentage de racinement (25 à 30 racines) après trois semaines de culture. Les plants avec des pousses et des racines appropriées, (longueur de pousse 6cm, longueur de racine 3cm) sont lavés dans de l'eau avant d'entamer le processus de durcissement dans différents types de terreau (Tableau I).

Parmi les combinaisons de terreau essayées, le mélange de terreau tourbe : perlite : sable dans le rapport $50 : 25 : 25 \text{ (v/v)}$ s'avère être la meilleure combinaison pour le durcissement du murier. Le pourcentage de survie des plants élevés *in vitro* s'élève à 90-95 % avec ce mélange de terreau (Tableau I).

DISCUSSION

Il est essentiel d'utiliser un tissu dérivé de plant *in vitro* parce qu'il a l'avantage d'être débarrassé des composés phénoliques, dont l'accumulation inhibe l'organogenèse chez les plants d'arbres comme l'ont décrit Jyothi et Dhar (1996). Cette étude est en accord avec de nombreuses recherches entreprises avec des explants dérivés de plants aseptiques pour la micropropagation des plantes ligneuses (Neena Kumari et Pardha Saradhi, 1992, Saxena et coll., 1997, Ivana et coll., 1997). Dans cette étude, on utilise du 2,4-D pour l'induction des cals et les résultats sont confirmés par les observations des rapports précédents (Ohyama, 1970, Tewary et coll., 1996, Jain et coll., 1990). De plus, l'addition de CM (10 %) et de CH (1 mg l^{-1}) est plus efficace pour induire des cals avec des ébauches de pousses. Pour la multiplication des pousses à partir des ébauches de pousses obtenues, on observe dans cette étude que le MSBM avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM à 10 % et du CH à 1 mg l^{-1} est le meilleur milieu. La présence de BAP dans du MSBM sans auxine promeut le taux de multiplication des pousses de mûrier, ce qui confirme les observations de Oka et Ohyama (1974), Mhatre et coll., (1985), Kim et coll., (1985) et Rao et Raghunath (1993) avec différentes variétés de mûrier. Dans cette étude, le cal induit est maintenu dans du MSBM additionné avec du 2,4-D (2 mg l^{-1}) et du CM à 10 % pendant une période de six mois. Ce cal âgé de six mois peut être régénéré dans du MSBM avec du BAP ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$), du CM à 10 % et du CH (1 mg l^{-1}).

Le MSBM additionné de NAA (1 mg l^{-1}) s'avère être la meilleure hormone de racinement. Cela confirme les recherches de Ohyama (1970), Hossain et coll., (1992) et Machii (1992).

En général, les plants régénérés *in vitro* tels quels ne synthétisent pas la cire de la cuticule et de l'épicuticule sur l'épiderme des feuilles (Bramerd et Fluchigani, 1982). Par conséquent, quand de tels plants sont transférés dans des conditions naturelles, ils subissent une dessiccation et meurent. Dans cette étude, les plants *in vitro* sont donc recouverts avec des sacs de polyéthylène pour maintenir 92 à 95 % d'humidité avec une vaporisation intermittente d'eau. Les sacs sont enlevés après trois semaines et on diminue la vaporisation intermittente d'eau. De plus les plants qui sont transférés dans des pots contenant de la tourbe : de la perlite : du sable (50 : 25 : 25 v/v) donnent la survie maximum (95 %) parce que le mélange de terreau a une capacité de rétention de l'humidité optimum et une bonne aération dans la zone racinaire.

ANALYSIS OF DIVERGENCE IN MULBERRY SPECIES THROUGH DIFFERENT CLUSTERING TECHNIQUES

A. TIKADER & A. ANANDA RAO

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu, India.

Genetic divergence analysis was employed in 13 mulberry species being maintained at Central Sericultural Germplasm Resources Center, Hosur. Twenty six characters were considered for the study. Six different clustering were employed to group the mulberry species into different clusters. Maximum number of clusters (7) were observed with Tocher's method (TD) whereas Single Linkage Method (SLD) grouped the species into 6 clusters. Minimum number of clusters (4) was observed in Ward's Minimum Variance Method (WMVD) followed by Weighted Average Linkage (WALD) and Complete Linkage Methods (CLD). Though the clusters produced with different methods varied in number (4 to 6, 7) the mulberry species tend to group in similar fashion irrespective of geographical origin and distribution. Thus, based on the results, the suitable clustering technique i.e., WMVD may be adopted to fulfill the purpose for which the mulberry species are grouped.

Keywords: Mulberry species, divergence analysis, morphology, anatomy, reproductive, growth traits.

INTRODUCTION

The mulberry possesses various species and is classified by different authors. Hooker (1885) classified the wild taxa of the genus *Morus* in India and reported four species i.e., *M. indica* L., *M. alba* L., *M. laevigata* Wall., *M. serrata* Roxb. Likewise the exotic accessions have also been classified into different species (Koidzumi, G. 1917). Though it has been reported that some of the species do not combine with other species due to incompatibility and some of the species are commonly mixed up with each other at interspecific and intraspecific levels but practically there is no barrier for crossing between species and within species (Das and Krishnaswamy 1965, Dwivedi *et al.*, 1989).

Improvement through breeding is known to depend on the extent of magnitude of genetic diversity between accessions. So, it is essential to group the accessions into different clusters for selection of parental material for breeding program. Several authors reported its importance in grouping and suggested to utilise the representatives from different clusters in breeding (Tikader *et al.*, 1999; Rajan *et al.*, 1997; Fotedar and Dandin, 1998; Gupta *et al.*, 1991). But all the authors have dealt with one clustering technique to group the accessions.

Thus, in this study, mulberry accessions were grouped using different clustering techniques to indicate the suitable method for grouping the accessions in effective and efficient way for further utilisation.

MATERIALS AND METHODS

The present study was carried out at Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu. The mulberry accessions were maintained as dwarf trees in 2.44 × 2.44 m spacing with two annual prunings. Recommended cultural practices were followed to maintain the plantation.

Morphological and growth parameters were recorded after 90 days of pruning. Reproductive and leaf anatomical observations were also recorded as per standard procedure (Jolly and Dandin, 1986 ; Machii *et al.*, 1997, Hicky, 1993 ; Machii *et al.*, 1999, Tikader *et al.*, 1995, 2000 and Tikader, 1999). The observations on 26 parameters were recorded on selected plants i.e, 3 plants per accession from 13 species. All the observations were coded following the procedure of Sneath and Sokal (1973). Divergence analysis was done following six different clustering techniques as per INDOSTAT statistical package Ltd., Hyderabad.

RESULTS

The mulberry species used in this study are presented in Table I. Different clustering techniques were used to group the mulberry species with the same set of data (Table II).

Table I. List of mulberry species used in this study.

Tableau I. Liste des espèces de mûrier utilisées dans cette étude.

Sl. No.	Name of the species	Ploidy
<i>No. de série</i>	<i>Nom de l'espèce</i>	<i>Ploidie</i>
1.	<i>M. australis</i> P.	Diploid / <i>Diploïde</i>
2.	<i>M. alba</i> L.	Diploid / <i>Diploïde</i>
3.	<i>M. multicaulis</i> P.	Diploid / <i>Diploïde</i>
4.	<i>M. nigra</i> L.	Diploid / <i>Diploïde</i>
5.	<i>M. cathayana</i> H.	Diploid / <i>Diploïde</i>
6.	<i>M. bombycis</i> Koidz.	Triploid / <i>Triplôïde</i>
7.	<i>M. serrata</i> Roxb.	Tetraploid / <i>Tetraploïde</i>
8.	<i>M. roundiloba</i> Koidz	Diploid / <i>Diploïde</i>
9.	<i>M. rubra</i> L.	Diploid / <i>Diploïde</i>
10.	<i>M. tiliaefolia</i> Makino	Hexaploid / <i>Hexaploïde</i>
11.	<i>M. indica</i> L.	Diploid / <i>Diploïde</i>
12.	<i>M. sinensis</i> Hort.	Diploid / <i>Diploïde</i>
13.	<i>M. laevigata</i> Wall.	Triploid / <i>Triplôïde</i>

Table II. Distribution of mulberry species in different clusters.

Tableau II. Distribution des espèces de mûrier entre les différents groupes.

Clustering technique Technique de groupement	Clusters / Groupes						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Ward's minimum variance dendrogram <i>Dendrogramme de variance minimum de Ward</i>	1, 9 10, 7 (4)	11, 12 4, 8 (4)	2, 3 (2)	5, 6 13 (3)	—	—	—
Weighted average linkage dendrogram <i>Dendrogramme de liaison moyenne pondérée</i>	1, 9 10, 7 (4)	2, 3 (2)	5, 6 13 (3)	11, 12 4 (3)	8 (1)	—	—
Average linkage Dendrogram <i>Dendrogramme de liaison moyenne</i>	1, 9 7 (3)	10, 13 8 (3)	2, 3 (2)	5, 6 (2)	11, 12 4 (3)	—	—
Complete linkage dendrogram <i>Dendrogramme de liaison complète</i>	1, 9 (2)	11, 12 4 (3)	10, 13 (2)	2, 3 5, 6 (4)	8, 7 (2)	—	—
Single linkage dendrogram <i>Dendrogramme de liaison unique</i>	1, 9 7, 10 (4)	2, 3 (2)	11, 12 4 (3)	5, 6 (2)	8 (1)	13 (1)	—
Tocher's method dendrogram <i>Dendrogramme de la méthode de Tacher</i>	11, 12 4 (3)	2, 3 (2)	5, 6 (2)	1, 9 10 (3)	7 (1)	8 (1)	13 (1)

Value in parentheses are the number of species in each cluster / Les valeurs entre parenthèses sont le nombre d'espèces dans chaque groupe.

Species indicated in Serial number like 1, 2, 3 as per Table I / Les espèces sont indiquées par les numéros de série par exemple 1, 2, 3 qui correspondent à ceux du Tableau I.

Ward's Minimum Variance Dendrogramm Method (WMVD):

WMVD method grouped the accessions into 4 broad clusters, cluster I having the species *M. australis* P., *M. rubra* L., *M. tiliaefolia* Makino and *M. serrata* Roxb. Cluster II consists of 4 accessions i.e. *M. indica* L., *M. sinensis* Hort., *M. nigra* L. and *M. rotundiloba* Koidz. Cluster III contains *M. alba* L., and *M. multicaulis* P. Cluster IV indicates *M. cathayana* H., *M. bombycis* Koidz. and *M. laevigata* Wall. The intercluster distance was higher between cluster I and III (6.12) and minimum in between IV and III (4.83). The intracluster distance was maximum in cluster I (4.55) and minimum in cluster III (3.16) as presented in Table III.

Table III. Inter and intracluster distance of different mulberry species in WMVD method.

Tableau III. Distance intergroupe et intragroupe des différentes espèces de mûrier avec la méthode WMVD.

Cluster Groupe	Methods / Méthodes					
	WMVD	ALD	WALD	CLD	SLD	TD
I × I	4.55**	4.47	4.55	4.00	4.55**	3.74
× II	5.66	5.31	6.14**	5.13*	6.12**	5.03
× III	6.12**	6.25**	5.49	5.24	5.60	6.03
× IV	5.49	5.60	5.60	5.85**	5.50	5.33
× V	—	5.56	5.83	5.24	5.83	6.33
× VI	—	—	—	—	5.48	5.03
× VII	—	—	—	—	—	5.94
II × II	4.44	5.72**	3.16*	3.74*	3.16*	3.16*
× III	5.27	5.60	4.83	5.83	5.03	4.69*
× IV	5.86	5.10	5.03	5.55	4.69*	5.97
× V	—	5.58	5.92	5.72	5.92	6.56**
× VI	—	—	—	—	5.10	5.92
× VII	—	—	—	—	—	5.10
III × III	3.16*	3.16*	4.74**	4.69	3.74	3.74
× IV	4.83*	4.69*	6.00	5.22	6.03	5.48
× V	—	5.03	5.42	5.66	5.03	5.57
× VI	—	—	—	—	5.94	5.29
× VII	—	—	—	—	—	4.80
IV × IV	4.47	3.74	3.74	4.32	3.74	4.32**
× V	—	6.03	5.03	5.85	5.29	4.76
× VI	—	—	—	—	4.80	6.06
× VII	—	—	—	—	—	5.54
V × V	—	3.74	0.00	5.10**	0.00	0.00
× VI	—	—	—	—	5.68	5.10
× VII	—	—	—	—	—	5.29
VI × VI	—	—	—	—	0.00	0.00
× VII	—	—	—	—	—	5.66
VII × VII	—	—	—	—	—	0.00

**, * indicates maximum and minimum values between inter and intracluster distances / **, * indique les valeurs maximum et minimum entre les distances inter et intragroupe.

Average Linkage Dendrogram Method (ALD):

This method of analysis indicates that all the accessions were grouped into 5 clusters. Cluster I includes 3 species i.e. *M. australis* P., *M. rubra* L. and *M. serrata* Roxb. Cluster II having 3 species i.e. *M. tiliacfolia* Makino, *M. laevigata* Wall. and *M. rotundiloba* Koidz. Cluster III followed by 2 species namely *M. alba* L. and *M. multicaulis* P. whereas cluster IV, *M. cathayana* H. and *M. bombycis* Koidz. Cluster V comprised *M. indica* L., *M. sinensis* Hort. and *M. nigra* L. The intracluster distance was minimum in cluster III (3.16) and maximum in cluster II (5.72). The intercluster distance was higher between cluster I and III (6.25) whereas minimum in III and IV (4.69) as presented in Table III.

Weight Average Linkage Dendrogram Method (WALD):

The average data of the same set were analysed through WALD method and it was found that the species formed 5 clusters. In cluster I, 4 were grouped (*M. australis* P., *M. rubra* L., *M. tiliacfolia* Makino and *M. serrata* Roxb.). In cluster II, 2 accessions were associated (*M. alba* L. and *M. multicaulis* P.). In cluster III (*M. cathayana* H., *M. bombycis* Koidz. and *M. laevigata* Wall.) and IV (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. and *M. nigra* L.) 3 accessions were grouped with each other whereas cluster V includes only one accession (*M. rotundiloba* Koidz.) indicating its individual identity. The intercluster distance was maximum between cluster I and II (6.14) and minimum between cluster II and III (4.83*) in Table III. The intracluster distance was maximum in cluster III (4.74) and minimum in cluster II (3.16) as presented in Table III.

Complete Linkage Dendrogram Method (CLD):

This method grouped the species into 5 clusters. The cluster I (*M. indica* L. and *M. rubra* L.), III (*M. tiliacfolia* Makino and *M. laevigata* Wall.) and V (*M. serrata* Roxb. and *M. rotundiloba* Koidz.) having 2 accessions each whereas cluster II consists of 3 accessions (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. and *M. nigra* L.). Cluster IV grouped 4 accessions (*M. alba* L., *M. multicaulis* P., *M. cathayana* H. and *M. bombycis* Koidz.) together. The intercluster distance was maximum in between I and IV (5.85) and minimum in between I and II (5.13) whereas intracluster distance was high in cluster V (5.10) and minimum in cluster II (3.74).

Single Linkage Dendrogram Method (SLD):

This method grouped the accessions into 6 clusters. In cluster I, 4 accessions (*M. australis* P., *M. rubra* L., *M. serrata* Roxb. and *M. tiliacfolia* Makino) were grouped together. Cluster II (*M. alba* L. and *M. multicaulis* P.) and IV (*M. cathayana* H. and *M. bombycis* Koidz.) having 2 accessions each whereas cluster III consists of 3 accessions (*M. sinensis* Hort., *M. laevigata* Wall. and *M. nigra* L.). Cluster V and VI showed one accession (*M. rotundiloba* Koidz. and *M. laevigata* Wall.) each indicating their individual identity and differs from other clusters (Table III). Maximum intercluster distance was observed between cluster I and II (6.12) and minimum between cluster II and IV (4.69). The intracluster distance was maximum between cluster I (4.55) and minimum in cluster II (3.16).

Tocher's dendrogram method (TD):

Tocher's method of clustering as described by Rao (1952) was employed to group the mulberry species into different clusters. The accessions were grouped into 7 clusters, maximum number compared to other methods. Cluster I (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. and *M. nigra* L.) and IV (*M. australis* P., *M. rubra* L. and *M. tiliacfolia* Makino) grouped 3 accessions each. Cluster II (*M. alba* L. and *M. multicaulis* P.) and III (*M. cathayana* H. and *M. bombycis* Koidz.) included 2 accessions each whereas cluster V (*M. serrata* Roxb.), VI (*M. rotundiloba* Koidz.) and VII (*M. laevigata* Wall.) consists of one accession each (Table III). Maximum intercluster distance was observed between cluster II and V (6.56) and minimum between II and III (4.69). The intracluster distance was maximum in cluster IV (4.32) and minimum in cluster II (3.16).

Table IV. Contribution of individual character in the divergence among different mulberry species.

Tableau IV. Contribution des caractères individuels à la divergence entre les espèces de mûrier.

SI	Characters	Times ranked 1 st	Contribution (%)
No. de série	Caractères	Nombre de fois où il s'est classé premier	
1.	Branching nature / <i>Nature de branchage</i>	0	0.00
2.	Young shoot colour / <i>Couleur de la jeune pousse</i>	25	32.05
3.	Mature shoot colour / <i>Couleur de la pousse mature</i>	6	7.69
4.	Phyllotaxy / <i>Phyllotaxie</i>	11	14.10
5.	Lenticel no. sq. cm / <i>Nbre de lenticelles / cm²</i>	0	0.00
6.	Leaf lobation no. / <i>Nbre de lobes de la feuille</i>	10	12.82
7.	Leaf nature / <i>Nature de la feuille</i>	0	0.00
8.	Leaf colour / <i>Couleur de la feuille</i>	6	7.69
9.	Leaf surface / <i>Surface de la feuille</i>	2	2.56
10.	Leaf texture / <i>Texture de la feuille</i>	0	0.00
11.	Leaf base / <i>Base de la feuille</i>	0	0.00
12.	Leaf apex / <i>Sommet de la feuille</i>	0	0.00
13.	Leaf margin / <i>Bord de la feuille</i>	3	3.85
14.	Leaf shape / <i>Forme de la feuille</i>	1	1.28
15.	Leaf lobation / <i>Lobation de la feuille</i>	0	0.00
16.	Bud shape / <i>Forme du bourgeon</i>	2	2.56
17.	Trichome density / <i>Densité de trichome</i>	8	10.26
18.	Sex / <i>Sexe</i>	0	0.00
19.	Leaf length / <i>Longueur de la feuille</i>	3	3.85
20.	Leaf width / <i>Largeur de la feuille</i>	0	0.00
21.	Shoot number / <i>Nombre de pousses</i>	0	0.00
22.	Nodal distance / <i>Distance nodale</i>	0	0.00
23.	Leaf weight / <i>Poids de la feuille</i>	0	0.00
24.	Leaf size / <i>Taille de la feuille</i>	0	0.00
25.	Total shoot length / <i>Longueur totale de la pousse</i>	0	0.00
26.	Leaf thickness / <i>Epaisseur de la feuille</i>	1	1.28

Contribution of characters towards divergence:

Among 26 characters, on the whole 12 characters showed contribution towards divergence (Table IV). Young shoot colour (32.05%), phyllotaxy (14.10%), leaf lobation (12.82%), trichome density (10.26%), mature shoot colour (7.69%), leaf colour (7.69%), leaf margin (3.85%), leaf length (3.85%), leaf surface (2.56%), bud shape (1.28%) and leaf thickness (1.28%) contributed at the maximum. Other characters had less or no contribution towards genetic divergence. So, the characters having the best performance may be considered for measuring divergence among the accessions and selection.

DISCUSSION

Comparative performance of different clustering techniques indicated that *M. indica* L., *M. sinensis* Hort. and *M. nigra* L. grouped together in all cases confirming their close association and always tends to group together. *M. alba* L. and *M. multicaulis* P. species grouped together in all clustering techniques showing close relationship with each other. At commercial level *M. alba* L. and *M. multicaulis* P. species are more preferable and used for breeding programme. *M. cathayana* H. and *M. bombycis* Koidz. grouped together in all the methods. The association of these 2 species is very close and they are always grouped together. *M. australis* P. and *M. rubra* L. also grouped together in all cases indicating close association. *M. serrata* Roxb. and *M. tiliaefolia* Makino, the wild species are grouped in 3 cases (WMVD, WALD and SLD) and in other cases grouped either in single or jointly with other species. *M. tiliaefolia* Makino. and *M. laevigata* Wall. are both wild species, they grouped together in ALD and CLD but in other cases they grouped with other species. *M. laevigata* Wall. grouped separately in SLD and Tocher's method showing its differences from other species. *M. rotundiloba* Koidz. formed separate cluster in WALD, SLD and Tocher's method and grouped with other species in different methods. Individual characterwise contribution towards divergence in Tocher's method was indicated in Table IV. Maximum contribution towards divergence was observed in young shoot colour (32.05%), phyllotaxy (14.10%), leaf lobation (12.82%) and trichome density (10.26%) and other characters have less or no contribution. The characters which contributed more towards divergence indicate their suitability for selection. Now, the question that arises is which technique of cluster analysis is to be selected. The simple answer is that with the same set of data the common clusters produced by all methods or by the majority of the methods should be accepted.

In other ways the choice reflects to the investigator's judgement of relevance for the purpose of the classification. After deciding on the variables to be used, the next step is to choose the clustering technique or techniques and it is clear from the analysis that no technique can be judged to be the "best" in all circumstances. Cluster analysis permits an accurate description of aggregate distances between especially closed neighbours but may distort distances among constituents of large clusters. The Ward's method suggests that at every stage of an analysis, the loss of information that results from the grouping of individuals into clusters can be measured by the total sum of squared deviation of every point from the mean of the cluster to which it belongs. In this study, WMVD produced compact clusters which seems to be desirable for the purpose of classification and selection of accessions.

REFERENCES

- DAS B. C., KRISHANASWAMY S. (1965) Some observation on interspecific hybridization in mulberry. Ind. J. Seric., 4, 1-8.
- DWIVEDI N. K., SURYANARAYANA N., SUSHEELAMMA B. N., SIKDAR A. K., JOLLY M. S. (1989) Interspecific hybridization studies in mulberry. Sericologia, 29, 147-149.
- FOTEDAR R. K., DANDIN S. B. (1998) Genetic divergence in mulberry. Sericologia, 38(1), 115-125.
- GUPTA B. K., CHATTERJEE K. K., SAU H., DAS N. (1991) Genetic divergence in mulberry (*Morus* spp.). Bionature, 11, 13-14.
- HICKY L. J. (1973) Classification of the architecture of dicotyledons leaves. Am. J. Bot., 60(1), 17-33.
- HOOKE J. D. (1885) Flora of British India. V.: 491. L. Reeve and Co. Ltd., The East House Book, Ashford, Kent., U.K.
- JOLLY M. S., DANDIN S. B. (1986) Collection, conservation and evaluation of mulberry (*Morus* spp.) germplasm. CSR & TI, Mysore, pp. 23-26.
- KOIZUMI G. (1917) Contribution and Florum Asiae Orientalis. Bot. Mag. (Tokyo), 31, 31-41.

- MACHII H., KOYAKAMA A., YAMANOUCHI H., KATAGIRI K. (1997) Manual for the characterization and evaluation of mulberry genetic resources. Misc. Pub. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., 22, 105-124.
- MACHII H., KOYAKAMA A., YAMANOUCHI H. (1999) Fruit traits of genetic mulberry resources. J. Seric. Sci., Japan, 68, 145-155.
- RAJAN M. V., CHATURVEDI H. K., SARKAR A. (1997) Multivariate analysis as an aid to genotype selection for breeding in mulberry. Indian J. Seric., 36(2), 115-125.
- RAO C. R. (1952) Advanced Statistical Methods in Biometric Research, John Willey and Sons Inc., New York. pp. 357-363.
- SNEATH P. H. A., SOKAL R. R. (1993) Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco, U.S.A.
- TIKADER A., VIJAYAN K., RAGHUNATH M. K., CHAKROBORTI S. P., ROY B. N., PAVAN KUMAR T. (1995) Studies on sexual variation in mulberry. Euphytica, 84(2), 115-120.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (1999) Stomatal variation and its relation with ploidy level in mulberry (*Morus* spp.) Indian J. Seric., 38(2), 160-162.
- TIKADER A. (1999) Studies on reproductive biological characters in mulberry germplasm (*Morus* spp.). Bull. Indian Acad. Seric., 3(2), 50-57.
- TIKADER A., RAO A. A., RAVINDRAN S., MUKHERJEE P., THANGAVELU K. (1999) Divergence analysis in different mulberry species. Ind. J. Genet., 59(1), 87-93.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (2000) Phenotypic characterisation of mulberry (*Morus* spp.) germplasm. In Proceedings of the 4th China International Silk Conference, 4 May 2000 held on 14-16th May, 2000, at Soochow University, China, pp. 114-125.

ANALYSE DE LA DIVERGENCE CHEZ LES ESPECES DE MURIER PAR DIFFERENTES TECHNIQUES DE REGROUPEMENT

A. TIKADER & A. ANANDA RAO

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, Tamil Nadu, Inde.

Nous avons analysé la divergence génétique chez 13 espèces de mûrier, maintenues au Centre de Ressources des Germoplasmes Séricicoles, à Hosur. Vingt six caractères sont pris en compte pour l'étude. Six méthodes de regroupement différentes sont employées pour grouper les espèces de mûrier. La méthode de Tocher (TD) donne le nombre de groupes maximum (7) tandis que la Méthode de Liaison Unique (SLD) groupe les espèces en six ensembles. La méthode de Variance Minimum de Ward (WMVD) donne le nombre de groupes minimum (4), suivie par les méthodes de Liaison Moyenne Pondérée (WALD) et de Liaison Complète (CLD). Bien que les groupes obtenus avec les différentes méthodes varient en nombre (4 à 6, 7) les espèces de mûrier tendent à se grouper de la même manière, quelle que soit l'origine géographique et la distribution. Ainsi, d'après les résultats, la technique de regroupement adaptée, la WMVD, pourrait être adoptée pour répondre à l'objectif de regroupement des espèces de mûrier.

INTRODUCTION

Le mûrier comprend différentes espèces et a été classé par différents auteurs. Hooker (1885) a classé les taxa sauvages du genre *Morus* en Inde et a enregistré quatre espèces *M. indica* L., *M. alba* L., *M. laevigata* Wall. et *M. serrata* Roxb. De même, les variétés exotiques ont été classées en espèces différentes (Koidzumi, G. 1917). Bien qu'on ait observé que certaines espèces ne peuvent pas se combiner entre elles par incompatibilité et que certaines espèces sont couramment mélangées entre elles aux niveaux interspécifique et intraspécifique, il n'y a pratiquement pas de barrière au croisement entre espèces et à l'intérieur des espèces (Das et Krishnaswamy 1965, Dwivedi et coll., 1989).

On sait que l'amélioration par le lignage dépend de l'amplitude de la diversité génétique entre les variétés. Il est donc essentiel de grouper les variétés en groupes différents pour la sélection des matériaux parentaux dans les programmes de lignage. Plusieurs auteurs ont signalé l'importance de cela pour le regroupement et conseillé d'utiliser les représentants de différents groupes pour le lignage (Tikader et coll., 1999 ; Rajan et coll., 1997 ; Fotadar et Dandin, 1998 ; Gupta et coll., 1991). Mais tous les auteurs n'ont eu recours qu'à une seule technique de regroupement.

Ainsi, dans cette étude, les variétés de mûrier sont groupées en utilisant des techniques de regroupement différentes de manière à indiquer quelle méthode est adaptée pour grouper les variétés de manière efficace et effective pour une utilisation ultérieure.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée au Centre Séricicole de Ressources en Germoplasmes, à Hosur, au Tamil Nadu. Les variétés de mûrier sont conservées sous la forme d'arbustes nains avec un espacement de

2,44 × 2,44 m et on procède à deux tailles annuelles. Les pratiques de culture recommandées sont suivies pour entretenir la plantation.

Les paramètres de morphologie et de croissance sont enregistrés 90 jours après la taille. On enregistre aussi les observations sur la reproduction et l'anatomie de la feuille d'après la procédure standard (Jolly et Dandin, 1986 ; Machii et coll., 1997, Hicky, 1993 ; Machii et coll., 1999, Tikader et coll., 1995, 2000 et Tikader, 1999). Les observations sur 26 paramètres de plants sélectionnés, c'est à dire 3 plants par variété, provenant de 13 espèces, sont enregistrées. Toutes les observations sont codées en suivant la procédure de Sneath et Sokal (1973). On procède à l'analyse de la divergence selon six techniques différentes avec le système statistique INDOSTAT Ltd.

RESULTATS

Les espèces de mûrier utilisées dans cette étude sont présentées dans le Tableau I. On utilise différentes techniques de regroupement des espèces de mûrier avec le même type de données (Tableau II).

Méthode de Dendrogramme de Variance Minimum de Ward (WMVD) :

La méthode WMVD rassemble les variétés en 4 grands groupes, le groupe I avec les espèces *M. australis* P., *M. rubra* L., *M. tiliaefolia* Makino et *M. serrata* Roxb. Le groupe II comprend 4 espèces *M. indica* L., *M. sinensis* Hort., *M. nigra* L. et *M. rotundiloba* Koidz. Le groupe III comprend *M. alba* L. et *M. multicaulis* P. Le groupe IV comprend *M. cathayana* H., *M. bombycis* Koidz. et *M. laevigata* Wall. (Tableau III). La distance entre groupe est plus élevée entre le groupe I et III (6,12) et minimum entre le groupe IV et III (4,83). La distance intragroupe est maximum dans le groupe I (4,55) et minimum dans le groupe III (3,16) comme le montre le Tableau III.

Méthode de Dendrogramme de Liaison Moyenne (ALD) :

Cette méthode d'analyse regroupe toutes les variétés en 5 ensembles. Le groupe I comprend 3 espèces, *M. australis* P., *M. rubra* L. et *M. serrata* Roxb. Le groupe II comprend 3 espèces, *M. tiliaefolia* Makino, *M. laevigata* Wall. et *M. rotundiloba* Koidz. Le groupe III contient 2 espèces *M. alba* L. et *M. multicaulis* P. tandis que le groupe IV comprend *M. cathayana* H. et *M. bombycis* Koidz. Le groupe V comprend *M. indica* L., *M. sinensis* Hort. et *M. nigra* L. La distance intra groupe est minime dans le groupe III (3,16) et maximum dans le groupe II (5,72). La distance inter groupe est plus élevée entre les groupes I et III (6,25) et elle est minime entre les groupes III et IV (4,69) comme le montre le Tableau III.

Méthode de Dendrogramme de Liaison Moyenne Pondérée (WALD) :

Les mêmes données moyennes sont analysées avec la méthode WALD qui donnent 5 groupes. Dans le groupe I, il y a 4 espèces (*M. australis* P., *M. rubra* L., *M. tiliaefolia* Makino et *M. serrata* Roxb.). Dans le groupe II, 2 espèces sont associées (*M. alba* L. et *M. multicaulis* P.). Dans le groupe III (*M. cathayana* H., *M. bombycis* Koidz. et *M. laevigata* Wall) et IV (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. et *M. nigra* L.) 3 espèces sont groupées ensemble tandis que le groupe V ne comprend qu'une espèce (*M. rotundiloba* Koidz.), indiquant son identité individuelle. La distance entre groupes est maximum entre le groupe I et II (6,14) et minimum entre le groupe II et III (4,83*) dans le tableau III. La distance intra groupe est maximum dans le groupe III (4,74) et minimum dans le groupe II (3,16) comme le montre le Tableau III.

Méthode dendrogramme de Liaison Complète (CLD) :

Cette méthode groupe les espèces en 5 ensembles. Le groupe I (*M. indica* L. et *M. rubra* L.), III (*M. tiliaefolia* Makino et *M. laevigata* Wall) et V (*M. serrata* Roxb. et *M. rotundiloba* Koidz.) ont chacun deux variétés tandis que le groupe II comprend 3 espèces (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. et

M. nigra L.). Le groupe IV comprend 4 espèces (*M. alba* L., *M. multicaulis* P., *M. cathayana* H. et *M. bombycis* Koidz.). La distance intergroupe est maximum entre le groupe I et IV (5,85) et minimum entre le groupe I et II (5,13) tandis que la distance intragroupe est élevée dans le groupe V (5,10) et minimum dans le groupe II (3,74).

Méthode de Dendrogramme de Liaison Unique (SLD) :

Cette méthode groupe les variétés en 6 ensembles. Dans le groupe I, on trouve 4 espèces (*M. australis* P., *M. rubra* L., *M. serrata* Roxb. et *M. tiliacfolia* Makino). Les groupes II (*M. alba* L. et *M. multicaulis* P.) et IV (*M. cathayana* H. et *M. bombycis* Koidz.) comprennent 2 espèces chacun tandis que le groupe III comprend 3 espèces (*M. sinensis* Hort., *M. laevigata* Wall et *M. nigra* L.). Les groupes V et VI ont une espèce (*M. rotundiloba* Koidz. et *M. laevigata* Wall.), ce qui indique leur identité individuelle et montre qu'ils diffèrent des autres groupes (Tableau III). On observe une distance entre groupe maximum entre le groupe I et II (6,12) et minimum entre le groupe II et IV (4,69). La distance intragroupe est maximum dans le groupe I (4,55) et minimum dans le groupe II (3,16).

Méthode dendrogramme de Tocher (TD) :

La méthode de regroupement de Tocher décrite par Rao (1952) a été employée pour regrouper les espèces de mûrier en différents groupes. Les variétés sont regroupées en 7 ensembles, le nombre maximum par rapport aux autres méthodes. Le groupe I (*M. indica* L., *M. sinensis* Hort. et *M. nigra* L.) et IV (*M. australis* P., *M. rubra* L. et *M. tiliacfolia* Makino) regroupent 3 espèces chacun. Les groupes II (*M. alba* L. et *M. multicaulis* P.) et III (*M. cathayana* H. et *M. bombycis* Koidz) comprennent 2 espèces chacun tandis que les groupes V (*M. serrata* Roxb.), VI (*M. rotundiloba* Koidz.) et VII (*M. laevigata* Wall.) comprennent chacun une espèce (Tableau III). On observe la distance entre groupe maximum entre le groupe II et V (6,56) et minimum entre le groupe II et III (4,69). La distance intragroupe est maximum dans le groupe IV (4,32) et minimum dans le groupe II (3,16).

Contribution des caractères envers la divergence :

Sur 26 caractères, 12 caractères montrent une contribution envers la divergence (Tableau IV). La couleur de la jeune pousse (32,05 %), la phyllotaxie (14,10 %), la lobation de la feuille (12,82 %), la densité de trichomes (10,26 %), la couleur de la pousse mature (7,69 %), la couleur de la feuille (7,69 %), le bord de la feuille (3,85 %), la longueur de la feuille (3,85 %), la surface de la feuille (2,56 %), la forme du bourgeon (1,28 %) et l'épaisseur de la feuille (1,28 %) y contribuent le plus. D'autres caractères contribuent moins ou pas à la divergence génétique. Les caractères qui ont la meilleure performance pourraient donc être considérés pour mesurer la divergence entre les variétés et pour la sélection.

DISCUSSION

La comparaison des différentes techniques de regroupement indique que *M. indica* L., *M. sinensis* Hort. et *M. nigra* L. sont groupées ensemble dans tous les cas, ce qui confirme leur association étroite. Les espèces *M. alba* L. et *M. multicaulis* sont regroupées avec toutes les techniques utilisées, ce qui montre qu'elles sont étroitement liées. Au niveau commercial, les espèces *M. alba* L. et *M. multicaulis* P. sont préférables et utilisées pour les programmes de lignage. *M. cathayana* H. et *M. bombycis* Koidz. sont regroupées dans tous les cas. L'association de ces 2 espèces est donc très étroite. *M. australis* P. et *M. rubra* L. sont également groupées, ce qui indique leur association étroite. *M. serrata* Roxb. et *M. tiliacfolia* Makino, les espèces sauvages sont regroupées dans 3 cas (WMVD, WALD et SLD) et dans d'autres cas sont soit isolées soit ensemble avec d'autres espèces. *M. tiliacfolia* Makino et *M. laevigata* Wall. sont toutes les deux des espèces sauvages, elles sont groupées avec les méthodes ALD et CLD, mais dans d'autres cas elles sont groupées avec d'autres espèces. *M. laevigata*

Wall. est regroupée de manière différente avec la méthode SLD et celle de Tocher, ce qui montre sa différence par rapport aux autres espèces. *M. rotundiloba* Koidz. forme un groupe séparé avec les méthodes WALD, SLD et de Tocher et est regroupée avec d'autres espèces avec des méthodes différentes. La contribution envers la divergence en fonction du caractère individuel avec la méthode de Tocher est présentée dans le Tableau IV. On observe la contribution maximum envers la divergence pour la couleur de la jeune pousse (32,05 %), la phyllotaxie (14,10 %), la lobation de la feuille (12,82 %) et la densité des trichomes (10,26 %), les autres caractères y contribuent moins ou pas du tout. Les caractères qui contribuent le plus à la divergence indiquent qu'ils sont adaptés à la sélection. Maintenant, la question est de savoir quelle technique d'analyse de regroupement doit être choisie. La réponse est simple : on doit accepter les groupes communs donnés par toutes les méthodes ou par la majorité des méthodes.

A d'autres égards, le choix dépend du jugement du chercheur par rapport à ce qui convient en fonction du but de la classification. Après avoir décidé quelles variables doivent être utilisées, l'étape suivante consiste à choisir la technique ou les techniques de regroupement et il est clair d'après l'analyse qu'aucune technique ne peut être jugée "meilleure" dans toutes les circonstances. L'analyse de regroupement permet une description exacte des distances globales surtout entre les voisins proches, mais peut déformer les distances parmi les composants de grands groupes. La méthode de Ward suggère qu'à chaque stade d'analyse, la perte d'information qui résulte du regroupement des individus peut être mesurée par la somme totale de l'écart au carré à partir de chaque point de la moyenne du groupe auquel il appartient. Dans cette étude, la méthode WMVD donne des groupes compacts, ce qui semble désirable dans le but de la classification et pour la sélection des variétés.

THE SPIRALLING WHITEFLY, *ALEURODICUS DISPERSUS* RUSSEL (HOMOPTERA : ALEYRODIDAE), A PEST OF MULBERRY IN KARNATAKA

M. GEETHA BAI, B. MARIMADAIAH, K. C. NARAYANASWAMY & T. RAMEGOWDA

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

The spiralling whitefly, Aleurodicus dispersus Russel (Homoptera : Aleyrodidae) is recorded for the first time on mulberry, Morus alba L. (Moraceae) in Karnataka. Investigations on its bionomics and life-history are presented. Forty alternate host plants, including crops of agricultural and horticultural importance, avenue trees and weeds are recorded. Recommendations for management of A. dispersus on mulberry are presented.

Keywords : *Aleurodicus dispersus*, whitefly, *Morus alba*, mulberry, *Cryptolaemus montrouzieri*, *Crematogaster walshi*, *Solenopsis geminata*, DDVP.

INTRODUCTION

The spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russel (Homoptera : Aleyrodidae) is a native of Caribbean region and Central America. This pest has been recorded in Africa, American Samoa, Bahamas, Barbados, Brazil, Canary Islands, Cook Islands, Costa Rica, Cuba, Dominica, Ecuador, Fiji, Guam, Haiti, Hawaii, Indonesia, Mariana Islands, Martinique, Micronesia, Nigeria, Panama, Papua New Guinea, Peru, the Philippines, Puerto Rico, Sarawak, Sri Lanka, Taiwan and the USA. David and Regu (1995) recorded *A. dispersus* for the first time in India in some areas in Kerala and Tamil Nadu. They recorded this pest on mulberry, *Morus alba* L. (Moraceae) and 18 other species of plants in Kerala and on 5 species of plants in Tamil Nadu. Palaniswami *et al.*, (1995) reported an outbreak of *A. dispersus* on cassava in Kerala in the dry season of 1993-94. Mani and Krishnamoorthy (1996) reported severe infestation of guava by this pest, around Bangalore, Karnataka in July 1995.

A. dispersus was found infesting mulberry trees, *Morus alba* L. (Moraceae) in Karnataka State Sericulture Research & Development Institute (KSSRDI), Thalaghattapura campus during May 1998. This is the first record of spiralling whitefly infesting *M. alba* in Karnataka. Mulberry whitefly, *Parabemisia myricae* has been reported to infest *M. alba* in China (Zhao *et al.*, 1994).

Investigations on bionomics, life-history and management of *A. dispersus* were conducted and the results are presented here.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry shrubs and trees in KSSRDI, Thalaghattapura campus were examined for spiralling whitefly infestation. Symptoms of attack, nature of damage caused, extent of infestation and its behaviour were studied. Morphology of eggs, nymphs and adults and measurement of eggs and adults were studied in the laboratory using a stereomicroscope. Natural enemies of the spiralling whitefly were collected and identified. Alternate host plants of *A. dispersus* were noted. DDVP (Nuvan,

EC = 76 %) was used for chemical control of spiralling whitefly; 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 or 2.0 ml of DDVP was mixed with one litre of 0.5% soap solution and was sprayed on infested mulberry leaves in the laboratory and observed. There were five infested leaves in each type of treatment. Heavily infested mulberry trees were sprayed with DDVP solution, containing 0.5, 1.0 or 2.0 ml DDVP in one litre of 0.5% soap solution during the end of May. These sprayed trees were monitored periodically, and were sprayed again, five days after the first spray, during early June, using DDVP solution of the same concentration used during the first spraying operation. There were four infested trees in each type of treatment. The number of adult *A. dispersus* per leaf in five leaves were counted prior to spraying and five days after each spraying operation.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Bionomics and Life-history:

The infestation of mulberry trees by the spiralling whitefly at KSSRDI was first observed during May 1998. The infestation was localised to a small area, and was severe on old and neglected trees. Young trees which were periodically pruned or leaves were harvested were either free from the spiralling whitefly or infestation was mild. All the eleven old and neglected trees examined were heavily infested with *A. dispersus*. Of the 61 younger trees examined, only 5 (8.2%) were infested by the spiralling whitefly. Mulberry plants in plots, which were used for silkworm rearing or those used for experimental purposes and potted plants were also infested. The number of adults on an infested mulberry leaf ranged from 4 to 98. This pest infests mature or medium leaves but not tender leaves at the tip of the branches. The adults congregate on the lower portion of leaves. They are white in colour and possess powdery or waxy scales all over the body and wings. Males measure 1.9 to 2.46 mm (Av. = 2.09 ± 0.25 mm) and females 1.46 to 1.85 mm (Av. = 1.63 ± 0.17 mm) in length. Adults fly freely from one plant to another during dawn and are capable of sustained flight over long distances. Gravid females oviposit on the lower surface of mature or medium leaves. Their eggs are elliptical and measure 0.29 to 0.31 mm in length (Av. = 0.30 ± 0.008 mm) and 0.09 to 0.12 mm (Av. = 0.11 ± 0.01 mm) at the broadest region. They are light brown in colour and are spirally covered with white wax material and hence the name spiralling whitefly. On hatching, the crawlers settle down on the lower surface of leaves. They are white in colour and are heavily covered with white wax material. Douressamy *et al.*, (1997) have reported that *A. dispersus* completes its life-cycle in 21-32 days on mulberry in Tamil Nadu, India. Hungchich *et al.*, (1996) studied the developmental time, immature mortality and fecundity of *A. dispersus* on poinsettia, canna, guava and pawpaws.

After the onset of rains, their population was considerably reduced, since their eggs and nymphs get washed away. Infested leaves on old trees were covered with sooty mould and appeared black in colour during October. Seasonal occurrence of *A. dispersus* and its natural enemies on guava during 1996-97 in Bangalore has been reported; the density of *A. dispersus* was reported to be higher in February-March and July-August and the peak was during August. (Anonymous, 1997). The spiralling whitefly is known to occur all year round in southern Taiwan, the population is reported to build up rapidly in October reaching a peak in December (Hungchich *et al.*, 1996). *A. dispersus* is suspected of being a vector of lethal yellowing disease of coconut palms in Florida, USA (Weems, 1971). The role of *A. dispersus* as a vector of mulberry and silkworm diseases is not known.

2. Alternate host plants:

It is a polyphagous pest infesting over 140 species of plants. During the present investigations *A. dispersus* was found to infest 41 species of plants (Table I). It was found to cause severe damage to many ornamental plants, vegetable crops and avenue trees in and around Bangalore area. The spiralling whitefly is reported to cause severe damage to many crops, including twenty crop plants and three species of weeds in Kasargod, Kerala, during summer 1996 (Ranjith *et al.*, 1996). Prathapan (1996) reported seventy two host plants of *A. dispersus* in Calicut, Kerala. Douressamy *et al.*, (1997)

have recorded *A. dispersus* on mulberry in Coimbatore, Tamil Nadu during 1996. Recently it was also found to occur in Pune, Maharashtra (Prof. C. A. Viraktamath, personal communication). The infestation is reported to be most severe on several economic plants such as avocado, banana, cassava, citrus, coconut, guava, mango, many ornamental plants etc. Cherry (1980) studied the host plant preference of *A. dispersus* using seven economically important species of fruit trees and bushes in the greenhouse in Florida and found that oviposition preference was significantly correlated with survival.

3. Pest management:

3.1 Natural enemies

During the present investigations, *Cryptolaemus montrouzieri* (Muls.) (Coleoptera: Coccinellidae), *Solenopsis geminata* (F.) and *Crematogaster walshi* Forel (Hymenoptera: Formicidae) were found preying on eggs and nymphs of the spiralling whitefly on *M. alba*. Several natural enemies of *A. dispersus* have been recorded. In India, *Scymnus* sp. (Mani & Krishnamoorthy, 1996) and *C. montrouzieri* (Mani & Krishnamoorthy, 1997) are reported to prey on *A. dispersus* infesting guava. The green lacewing, *Mallada astur* was reported to be predominant on *A. dispersus* on guava and about 230 nymphs of spiralling whitefly were consumed by a single larva in 10-12 days and an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces farinosus* was isolated from the spiralling whitefly in Bangalore (Anonymous, 1998). Other natural enemies reported on the spiralling whitefly are *Cheilomenes sex-maculata*, *Harmonia sedecimnota*, *Coelophora inaequalis* (Coccinellidae), *Cybocephala* sp., (Nitidulidae), *Paragus serratus* (Syrphidae), *Iridomyrmex anceps* (Formicidae), a chrysopid and an eulophid parasitoid *Euderomphale vittata* (Anonymous, 1996). A survey conducted around Bangalore, Coimbatore and Dharmapuri during 1996-97 has shown that the spiralling whitefly infested 43 host plants, and natural enemies recorded are *Axinoscymnus puttarudriahi*, *C. montrouzieri*, *Chilocorus nigrita*, *Cheilomenes sexmaculata* and *Chilocorus nigrita* (Coccinellidae); *Acletoxenus indicus* (Cecidomyiidae); *Apertochrysa* sp., *Mallada astur*, *M. boninensis* and *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae) (Anonymous, 1997). Details of seasonal occurrence of the spiralling whitefly and its natural enemies on guava in the same area have also been furnished in this report. Douressamy *et al.*, (1997) have suggested that the grubs and adults of the coccinellid beetles, *Menochilus sexmaculatus*, *Scymnus* sp., *C. montrouzieri*, *Coccinella septempunctata* and the grubs of *Mallada boninensis* preying on the whitefly nymphs and pupae can be used for management of *A. dispersus*. Efforts are reported to be under way by the Project Directorate of Biological Control, Bangalore to import an aphelinid parasitoid, *Encarsia haitiensis* from Guam (Anonymous, 1997).

Natural enemies have been reported and introduced into several countries for management of the spiralling whitefly. *Nephaspis bicolor* Gordon, a new predatory coccinellid was introduced from Trinidad into Hawaii for control of *A. dispersus* on guava and another new coccinellid, *N. namolica* Gordon, was also found preying on an aleurodid on guava in Colombia (Gordon, 1982). Kumashiro *et al.*, (1983) reported successful introduction, establishment and control of *A. dispersus* on guava using *N. annicola* Wingo and *Encarsia? haitiensis* Doz. in Hawaii, USA in 1980-81. Two parasitoids *Encarsia* sp., nr. *haitiensis* and *E. guadeloupae* (Hymenoptera : Aphelinidae) were recovered from *A. dispersus* in Benin in 1993 and are thought to have arrived serendipitously (Neuenschwander, 1994).

3.2. Cultural and mechanical methods:

Cultural methods recommended for management of the spiralling whitefly in mulberry garden includes, collection and destruction of mulberry leaves with egg masses, nymphs and adults, removal of weed hosts, yellow sticky traps @ 10 / acre and split application of nitrogenous fertilisers (Douressamy *et al.*, 1997). Srinivasan and Mohansundaram (1997) recommended the use of a light trap having emergency lighting tube, with a Vaseline coated transparent cover, for trapping *A. dispersus* adults. In Taiwan, Hungchich *et al.*, (1995) have recommended water spray at a rate of 12.5 l/min. at 2 days interval for management of spiralling whitefly.

Table I. Host plants of *Aleurodicus dispersus* in Bangalore.Tableau I. Plantes hôtes d'*Aleurodicus dispersus* à Bangalore.

Common name	Scientific name
<i>Nom courant</i>	<i>Nom scientifique</i>
Commercial plants / Plantes commerciales :	
Mulberry / <i>mirier</i>	<i>Morus alba</i> L.
Cotton / <i>coton</i>	<i>Gossypium</i> sp.
Sandalwood / <i>santal</i>	<i>Santalum album</i>
Castor / <i>ricin</i>	<i>Ricinus communis</i>
Coconut / <i>cocotier</i>	<i>Cocos nucifera</i>
Ornamental plants / Plantes ornementales :	
Rose	<i>Rosa sinensis</i>
Hibiscus	<i>Hibiscus</i> sp.
Poinsettia	<i>Euphorbia pulcherrima</i>
Croton	<i>Codiaeum variegatum pictum</i>
Spatula, Neelambarā	<i>Barleria cristata</i>
Golden rod / <i>gerbe d'or</i>	<i>Solidago altissima</i>
Fish tail fern / <i>fougère</i>	<i>Nephrolepis biserrata</i> (Furcanus)
Bougainvillea / <i>bougainvillier</i>	<i>Bougainvillea</i> sp.
Jasmine / <i>jasmin</i>	<i>Jasmine sambac</i>
Kankambara	<i>Crosandra infundibuliformis</i>
Devaganagale	<i>Plumeria indica</i>
Cup and saucer plant / <i>calyptrée</i>	-
-	<i>Gladiolus byzantinus</i>
-	<i>Philodendron pertusum</i>
	<i>Acalypha wilkensiana</i>
	<i>A. hispida</i>
	<i>Dracaena</i> sp.
Avenue trees / Arbres d'avenues	
Bauhinia	<i>Bauhinia</i>
Champaka, Sampige	<i>Michelia champaka</i>
Ashoka	<i>Polyanthia longifolia</i>
Haththi mara	<i>Ficus indica</i>
-	<i>Madhuka indica</i>
Weeds / Mauvaises herbes :	
Yakka	<i>Calotropis gigantea</i>
	<i>Lantana camara</i>
Fruits :	
Guava / <i>goyave</i>	<i>Psidium guajava</i> L.
Papaya / <i>papaye</i>	<i>Carica papaya</i> L.
Pomegranate / <i>grenade</i>	
Jack fruit / <i>jacquier</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>
Mango / <i>mangue</i>	<i>Mangifera indica</i>
Lemon / <i>citron</i>	<i>Citrus limon</i>

Table I. (Continued).

Tableau I. (Suite).

Common name	Scientific name
<i>Nom courant</i>	<i>Nom scientifique</i>
Vegetables / Légumes :	
Tomato / tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.
Brinjal	<i>Solanum melangena</i> L.
Cassava / manioc	<i>Manihot esculenta</i>
Shama gadde	<i>Colocasia esculenta</i>
Drumstick	<i>Moringa oleifera</i>
Green manure plant / Plantes utilisées comme engrais vert	
-	<i>Glyricidia maculata</i>

3.3. Chemical control:

Chemical control has its limitations in sericulture industry, due to its toxicity to silkworms. However, dimethyl dichlorovinyl phosphate (DDVP) or Dichlorovos, which has a short safety period, compared to other insecticides and is harmless to natural enemies of *M. hirsutus*, especially the ladybird beetles, which play an important role in suppression of mealy bug population in the field (Manjunath *et al.*, 1993) and is also used for management of several other pests of mulberry, such as the leaf-roller pest, *Diaphania pulverulentalis* (Geetha Bai *et al.*, 1997), mulberry pyralid, *Margaronia pyralis*, the Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua*, moringa hairy caterpillar, *Eupterote mollifera*, tussock caterpillar, *E. fraterna*, wasp moth *Amata passalis* and *Ceryx godarti* (Sengupta *et al.*, 1990) was tested for management of *A. dispersus*.

During the present study, when DDVP (Nuvan, EC = 76%) of five different concentrations, i.e. 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 or 2.0 ml of DDVP in 1 litre of 0.5% soap solution was sprayed on infested mulberry leaves in the laboratory, all the adults and nymphs died within 18, 16, 12, 10 or 9 min., respectively. Four heavily infested mulberry trees chosen for field testing were sprayed with five litres each of 0.038%, 0.076% or 0.15% of DDVP solution. Within 30 min. after spraying most of the whiteflies were dead. All the sprayed trees were monitored daily. Four days after spraying a few adults could be seen. A second spray was undertaken five days after the first spray. Subsequently all the sprayed trees were found to be free from spiralling whitefly infestation.

Chemical methods recommended for management of *A. dispersus* on mulberry in India include spraying with Fish Oil Rosin Soap (FORS) @ 40 ml/l, dichlorvos 76 WSC @ 2 ml/l, the safer waiting period being 15 days (Douressamy *et al.*, 1997). In Taiwan, Hungchich *et al.*, (1995) reported that 2.8% EC bifenthrin was effective against eggs, and 90% methomyl WP against nymphs and adults; also, when applied at low rates, 50% neem oil mixed with Triton was reported to give best level of control.

RECOMMENDATIONS FOR MANAGEMENT OF SPIRALLING WHITEFLY

The following management practices are suggested to control spiralling whitefly infestation on mulberry:

1. When the infestation is low, clip the affected portions and destroy them by dipping in 2% soap solution to kill the pests.
2. Use a strong jet of water, to wash away eggs and nymphs.
3. Use light traps to destroy adults.
4. Transport only dressed mulberry cuttings, for use in new plantations.
5. Avoid growing other host plants like guava, mango, tomato, hibiscus, rose, poinsettia etc. close to mulberry trees and plantations. Remove and destroy weeds which are also affected by the spiralling whitefly from and around mulberry plantations periodically.
6. Use natural enemies such as coccinellid predators (*Cryptolaemus montrouzieri*, *Scymnus* sp. etc.) and parasitoids (*Encarsia* spp.).
7. Spray 0.038% DDVP emulsion (Nuvan, EC = 76%) (mix 0.5 ml of DDVP in 1 litre of 0.5% soap solution), on affected portion of plants. When infestation is heavy, a second spray, 5 days after the first spray is necessary. Mulberry leaves can be used for silkworm rearing 10 days after the last spray. Depending on the size of the mulberry tree, 1 to 2 litres of the emulsion or 150 litres / acre of the emulsion is required. Insecticide application has to be undertaken only as a last resort.
8. Undertake control measures on all the affected species of plants, growing near mulberry plantation, simultaneously.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Dr S.B. Dandin, Director and Dr R. Raghuraman, Divisional Chief, KSSRDI for facilities provided. Thanks are due to Prof. C.A. Viraktamath, University of Agricultural Sciences, Bangalore for identifying the spiralling whitefly. Technical assistance of supporting staff is also acknowledged.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1996) Biocontrol News letter, Project Directorate of Biological Control, Bangalore, pp 1-4.
- ANONYMOUS (1997) Annual Report 1996-97, Project Directorate of Biological Control, Bangalore, pp. 1-161.
- ANONYMOUS (1998) Annual Report 1997-98, Project Directorate of Biological Control, Bangalore, pp 1-172.
- CHERRY R.H. (1980) Host plant preference of the whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russel. Florida Entomologist, 63, 222-225.
- DAVID B. V. & REGU K. (1995) *Aleurodicus dispersus* Russel (Aleyrodidae: Homoptera) a whitefly pest, New to India. Pestology, 19, 5-7.
- DOURESSAMY S., CHANDRAMOHAN N., SIVAPRAKASAM N., SUBBRABRAMANIAN A. & SUNDARA BABU (1997) Management of spiralling whitefly. Indian Silk, 36, 15-16.

- GEETHA BAI M., MARIMADAI AH B., NARAYANASWAMY K. C. & RAJAGOPAL D. (1997) An outbreak of leaf-roller pest, *Diaphania* (= *Margaronia*) *pulverulentalis* (Hampson) on mulberry in Karnataka. *Geobios New Reports*, 16, 73-79.
- GORDON R. D. (1982) Two new species of *Nephaspis* Casey (Coleoptera: Coccinellidae) from Trinidad and Colombia. *Proc. Entomol. Soc. Washington*, 84, 332-336.
- HUNGCHICH W., CHINGHSU T. & CHIOUNAN C. (1995) Yield loss and control of spiralling whitefly (*Aleurodicus dispersus* Russel). *J. Agric. Res. China*, 44, 147-156.
- HUNGCHICH W., CHIOUNAN C. & HSU T. C. (1996) (1996 seasonal occurrence of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russel and host plant effects). *Plant Protec. Bull. (Taipei)*, 38, 39-47.
- KUMASHIRO B. R., LAI P. Y., FUNASAKI G. Y. & TERAMOTO K. K. (1983) Efficacy of *Nephaspis annicola* and *Encarsia* ? *haitiensis* in controlling *Aleurodicus dispersus* in Hawaii. *Proc. Hawaiian Ent. Soc.*, 24, 261-269.
- NEUENSCHWANDER P. (1994) Spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, a recent invader and new cassava pest. *African Crop Sci. J.*, 2, 419-421.
- MANI M. & KRISHNAMOORTHY A. (1996) Spiralling whitefly and its natural enemies on guava in Karnataka. *Insect Environment*, 2, 12-13.
- MANI M. & KRISHNAMOORTHY A. (1997) Discovery of Australian ladybird beetle (*Cryptolaemus montrouzieri*) on spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* in India. *Insect Environment*, 3, 5-6.
- MANJUNATH D., KUMAR P., KISHORE R., PRASAD S., NARAYANASWAMY K. C. & DATTA R. K. (1993) Towards understanding tukra and its management. *Indian Silk*, 32(3), 6-9.
- PALANISWAMI M. S., PILLAI K. S., NAIR R. R. & MOHANDAS C. (1995) A new cassava pest in India. *Cassava News Letter*, 19, 6-7.
- PRATHAPAN K. D. (1996) Outbreak of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russel (Aleyrodidae: Homoptera) in Kerala. *Insect Environment*, 2, 36-38.
- RANJITH A. M., RAO D. S. & THOMAS J. (1996) New host records of the mealy whitefly *Aleurodicus dispersus* Russel in Kerala. *Insect Environment*, 2, 35-36.
- SENGUPTA K., PRADIP KUMAR, BAIG M. & GOVINDAIAH (1990) Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm, United Nations, Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 1-88.
- SRINIVASAN G. & MOHANSUNDARAM M. (1997) A novel method to trap the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russel adults in the home gardens. *Insect Environment*, 3, 18.
- WEEMS H. V. (1971) *Aleurodicus dispersus* Russel (Homoptera : Aleyrodidae), a possible vector of the lethal yellowing disease of coconut palms. *Ent. Cir. Pl. Industry, Florida Dept. Agric. Consumer Ser.*, 111, 1-2.
- ZHAO G., WU X. & MA H. (1994) (Investigation of occurrence of mulberry whitefly, (*Parabemisia myricae*) and its control). *Jiangsu Seric.*, 3, 28-29.

L'ALEURODE, *ALEURODICUS DISPERSUS* RUSSEL (HOMOPTERE : ALEYRODIDAE), UN INSECTE NUISIBLE AU MURIER DANS LE KARNATAKA

M. GEETHA BAI, B. MARIMADAI AH, K. C. NARAYANASWAMY & T. RAMEGOWDA

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

*L'aleurode, *Aleurodicus dispersus* Russel (Homoptère : Aleyrodidae) a été signalé pour la première fois sur le mûrier, *Morus alba* L. (Moraceae) dans le Karnataka. Nous présentons les recherches sur sa bionomie et son historique. Nous avons répertorié quarante autres plantes hôtes, dont des plantes importantes aux plans agricole et horticole, des arbres bordant les avenues et des mauvaises herbes. Nous présentons des recommandations pour lutter contre *A. dispersus* sur le mûrier*

INTRODUCTION

L'aleurode, *Aleurodicus dispersus* Russel (Homoptère : Aleyrodidae) est originaire des Caraïbes et de l'Amérique Centrale. Cet insecte a été répertorié en Afrique, dans les Samoa américaines, aux Bahamas, à la Barbade, au Brésil, aux Canaries, aux Iles Cook, au Costa Rica, à Cuba, en Dominique, en Equateur, au Fiji, au Guam, en Haïti, à Hawaï, en Indonésie, dans les îles Marianne, en Martinique, en Micronésie, au Nigeria, au Panama, en Papouasie Nouvelle Guinée, au Pérou, aux Philippines, à Puerto Rico, à Sarawak, au Sri Lanka, à Taiwan et aux USA. David et Regu (1995) ont pour la première fois observé la présence d'*A. dispersus* dans certaines parties du Kerala et du Tamil Nadu en Inde. Ils ont observé cet insecte sur le mûrier, *Morus alba* L. (Moraceae), sur 18 autres espèces de plantes au Kerala et sur 5 espèces de plantes au Tamil Nadu. Palaniswami et coll., (1995) ont fait état d'une infestation par *A. dispersus* sur le manioc au Kerala pendant la saison sèche en 1993-94. Mani et Krishnamoorthy (1996) ont signalé une infestation sévère de la goyave par cet insecte, autour de Bangalore, dans le Karnataka en juillet 1995.

On a observé que des mûriers, *Morus alba* L. (Moraceae) étaient infestés par *A. dispersus* sur le campus de Thalaghattapura de l'Institut de Développement et de Recherche Séricicoles de l'état du Karnataka (KSSRDI) en mai 1998. C'est la première fois qu'on signale l'infestation de *M. alba* par l'aleurode au Karnataka. On a aussi fait état d'une infestation de *M. alba* par l'aleurode du mûrier *Parabemisia myricae* en Chine (Zhao et coll., 1994).

Nous avons entrepris des recherches sur la bionomie et l'histoire de *A. dispersus* et sur les moyens de lutte qui existent contre lui, dont nous présentons ici les résultats.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons examiné l'infestation par l'aleurode sur des mûriers (buissons et arbres) sur le campus du KSSRDI à Thalaghattapura. Les symptômes de l'attaque, la nature des dégâts, l'étendue de l'infestation et son mode d'action ont été étudiés. La morphologie des œufs, des nymphes et des adultes a été étudiée en laboratoire en utilisant un microscope binoculaire et les œufs et les adultes ont été mesurés. Nous avons aussi recueilli et identifié les ennemis naturels de l'aleurode et répertorié d'autres

plantes hôtes d'*A. dispersus*. On utilise du DDVP (Nuvan EC = 76 %) pour lutter de manière chimique contre l'aleurode : on mélange 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 ou 2 ml de DDVP avec un litre de solution savonneuse à 0,5 % et on le vaporise sur des feuilles de mûrier infestées en laboratoire que l'on observe par la suite. Pour chaque type de traitement, on dispose de cinq feuilles infestées. On vaporise les mûriers très infestés avec une solution de DDVP, contenant 0,5 ; 1 ou 2 ml de DDVP dans un litre de solution savonneuse à 0,5 % à la fin du mois de mai. Les arbres vaporisés sont surveillés périodiquement et sont vaporisés à nouveau, cinq jours après la première vaporisation, au début du mois de juin, en utilisant une solution DDVP ayant la même concentration qu'à la première vaporisation. Il y a quatre arbres infestés avec chaque type de traitement. On compte le nombre d'*A. dispersus* adultes par feuille sur cinq feuilles avant la vaporisation et cinq jours après chaque vaporisation.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Bionomie et historique :

L'infestation de mûriers par l'aleurode a été observée pour la première fois en mai 1998 au KSSRDI. L'infestation est localisée dans une petite zone et est importante chez les vieux arbres négligés. Les jeunes arbres qui sont taillés régulièrement ou dont les feuilles sont récoltées sont soit exempts de l'aleurode soit victimes d'une infestation légère. Les onze vieux arbres négligés sont tous sévèrement infestés par *A. dispersus*. Sur les 61 arbres les plus jeunes examinés, seuls 5 (8,2 %) sont infestés par l'aleurode. Les plants de mûrier en parcelle, utilisés pour l'élevage des vers à soie ou ceux qui sont utilisés pour les expériences et les plants en pot sont aussi infestés. Le nombre d'adultes sur une feuille de mûrier infestée est compris entre 4 et 98. Cet insecte infeste les feuilles matures ou moyennes mais n'est pas présent sur les feuilles tendres au bout des branches. Les adultes se rassemblent sur la partie la plus basse des feuilles. Ils sont blancs et ont des écailles poudreuses ou cireuses sur tout le corps et des ailes. Les mâles mesurent de 1,9 à 2,46 mm (Moyenne = $2,09 \pm 0,25$ mm) et les femelles de 1,46 à 1,85 mm (Moyenne = $1,63 \pm 0,17$ mm) de longueur. Les adultes volent librement d'une plante à l'autre à l'aube et sont capables de voler sur de longues distances. Les femelles fécondées pondent sur la surface inférieure des feuilles matures ou moyennes. Leurs œufs sont elliptiques et mesurent de 0,29 à 0,31 mm de longueur (Moyenne = $0,30 \pm 0,008$ mm) et de 0,09 à 0,12 mm (Moyenne = $0,11 \pm 0,01$ mm) sur la partie la plus large. Ils sont marron clair et sont recouverts par une matière blanche cireuse en spirale d'où le nom d'aleurode à spirale. A l'éclosion, les insectes s'installent sur la surface inférieure des feuilles. Ils sont de couleur blanche et sont fortement recouverts par un matériel cireux blanc. Douressamy et coll., (1977) ont signalé que *A. dispersus* finit son cycle de vie au bout de 21 à 32 jours sur le mûrier au Tamil Nadu, en Inde. Hungchich et coll., (1996) ont étudié la durée de développement, la mortalité immature et la fécondité d'*A. dispersus* sur poinsettia, la canne à sucre, la goyave et les papayes.

Après le début des pluies, la population diminue considérablement, car les œufs et les nymphes sont balayés. Les feuilles infestées sur les vieux arbres sont recouvertes par une moisissure fuligineuse et deviennent noires en octobre. On a signalé la présence saisonnière d'*A. dispersus* et de ses ennemis naturels sur la goyave en 1996-97 à Bangalore et on a constaté que la densité d'*A. dispersus* est plus élevée en février-mars et en juillet-août et que le pic a lieu en août. (Anonyme, 1997). On remarque que l'aleurode à spirale est présent pendant toute l'année dans le sud de Taiwan ; la population se développe rapidement en octobre et atteint un pic en décembre (Hungchich et coll., 1996). On soupçonne *A. dispersus* d'être un vecteur de la maladie mortelle du jaunissement des cocotiers en Floride, aux USA (Weems, 1971). On ne connaît pas le rôle d'*A. dispersus* comme vecteur des maladies du mûrier et du ver à soie.

2. Autres plantes hôtes :

C'est un insecte polyphage infestant plus de 140 espèces de plantes. Pendant nos recherches, nous avons constaté que *A. dispersus* infeste plus de 41 espèces de plantes (Tableau I). On a constaté qu'il

provoque des dégâts sévères chez de nombreuses plantes ornementales, chez des cultures végétales et chez des arbres bordant les avenues dans et autour de la zone de Bangalore. L'aleurode à spirale a fait des dégâts importants chez de nombreuses cultures, dont vingt plantes de culture et trois espèces de mauvaises herbes dans le Kasargod, au Kerala pendant l'été 1996 (Ranjith et coll., 1996). Prathapan (1996) a répertorié soixante douze plantes hôtes d'*A. dispersus* à Calicut, au Kerala. Douressamy et coll., (1997) ont observé *A. dispersus* sur du mûrier à Coimbatore, au Tamil Nadu en 1996. Récemment, on a aussi remarqué sa présence à Pune, et à Maharashtra (Prof. C. A. Viraktamath, communication personnelle). Il a été observé que l'infestation est des plus sévères chez plusieurs plantes de rapport économique, telles que l'avocat, la banane, le manioc, le citron, la noix de coco, la goyave, la mangue et de nombreuses plantes ornementales etc... Cherry (1980) a étudié la préférence d'*A. dispersus* en matière de plante hôte en utilisant sept espèces d'arbres ou d'arbustes fruitiers importantes sur le plan économique dans une serre en Floride et observé que la préférence à la ponte est corrélée de manière significative avec la survie.

3. Lutte contre le parasite :

3. 1. Ennemis naturels :

Pendant nos recherches, nous avons constaté que les œufs et les nymphes de l'aleurode à spirale sur *M. alba* sont la proie de *Cryptolaemus montrouzieri* (Muls.) (Coleoptera : Coccinellidae), *Solenopsis geminata* (F.) et *Crematogaster walshi* Forel (Hymenoptère : Formicidae). On a observé plusieurs ennemis naturels d'*A. dispersus*. En Inde, on a constaté que *Scymnus* sp. (Mani & Krishnamoorthy, 1996) et *C. montrouzieri* (Mani & Krishnamoorthy, 1997) s'attaquent à *A. dispersus* quand il infeste la goyave. On a constaté une présence prédominante de chrysopes, *Mallada astur* quand *A. dispersus* infeste la goyave et une larve consomme environ 230 nymphes de l'aleurode à spirale en 10 à 12 jours. On a isolé un champignon entomopathogène, *Paecilomyces farinosus* sur l'aleurode à spirale à Bangalore (Anonyme, 1998). D'autres ennemis naturels signalés sur l'aleurode à spirale sont *Cheilomenes sex-maculata*, *Harmonia sedecimnotata*, *Coelophora inaequalis* (Coccinellidae), *Cybocephala* sp., (Nitidulidae), *Paragus serratus* (Syrphidae), *Iridomyrmex anceps* (Formicidae), un chrysopide et un parasitoïde eulophide *Euderomphale vittata* (Anonyme, 1996). Une étude menée autour de Bangalore, Coimbatore et Dharmapuri en 1996-97 a montré que l'aleurode à spirale infeste 43 plantes hôtes et que ses ennemis naturels sont *Axinoscymnus puttarudriahi*, *C. montrouzieri*, *Chilocorus nigrita*, *Cheilomenes sexmaculata* et *Chilocorus nigrita* (Coccinellidae) ; *Acletoxenus indicus* (Cecidomyiidae) ; *Apertochrysa* sp., *Mallada astur*, *M. boninensis* et *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae) (Anonyme, 1997). Des détails sur la présence saisonnière de l'aleurode à spirale et sur ses ennemis naturels chez la goyave dans la même zone ont aussi été donnés dans ce rapport. Douressamy et coll., (1997) ont suggéré d'utiliser des larves et des adultes des scarabées coccinéides, *Menochilus sexmaculatus*, *Scymnus* sp., *C. montrouzieri*, *Coccinella septempunctata* et des larves de *Mallada boninensis* qui mangent les nymphes et les larves de l'aleurode pour lutter contre *A. dispersus*. Des efforts sont faits par le Bureau des Projets de Lutte Biologique à Bangalore pour importer un parasitoïde aphelinide, *Encarsia haitiensis* de Guam (Anonyme, 1997).

Des ennemis naturels ont été signalés et introduits dans plusieurs pays pour lutter contre l'aleurode à spirale. *Nephaspis bicolor* Gordon, un nouveau prédateur coccinellide a été importé de Trinidad à Hawaï pour lutter contre *A. dispersus* sur la goyave et on a aussi rapporté un autre nouveau coccinellide, *N. namolica* Gordon attaquant un aleurodide sur la goyave en Colombie (Gordon, 1982). Kumashiro et coll., (1983) ont signalé une introduction, un établissement et une lutte réussis contre *A. dispersus* sur la goyave en utilisant *N. annicola* Wingo et *Encarsia* ? *haitiensis* Doz. à Hawaï (USA) en 1980-81. Deux parasitoïdes *Encarsia* sp., nr. *haitiensis* et *E. guadeloupae* (Hymenoptère : Aphelinidae) ont été trouvés sur *A. dispersus* au Bénin en 1993 et on pense qu'ils sont venus par un heureux hasard (Neuenschwander, 1994).

3.2 Méthodes culturales et mécaniques :

Les méthodes de culture recommandées pour lutter contre l'aleurode à spirale dans les mûraies consistent à recueillir et à détruire les feuilles de mûrier où les œufs, les nymphes et les adultes sont massés, à supprimer les mauvaises herbes hôtes, à utiliser des pièges adhésifs jaunes à raison de 10 / arpent et à appliquer des engrais azotés en plusieurs fois (Douressamy et coll., 1997). Srinivasan et Mohansundaram (1997) ont recommandé l'utilisation d'un piège lumineux, avec un tube lumineux, et un couvercle transparent recouvert de vaseline, pour attraper les adultes d'*A. dispersus*. A Taiwan, Hungchich et coll., (1995) ont recommandé une vaporisation d'eau à raison de 12,5 l / min à 2 jours d'intervalle pour lutter contre l'aleurode.

3.3. Lutte chimique :

La lutte chimique est limitée dans l'industrie séricicole parce qu'elle est toxique pour les vers à soie. Cependant, pour lutter contre *A. dispersus*, nous avons testé du phosphate de diméthyl dichlorovinyl (DDVP) ou du Dichlorovos, dont la durée de toxicité est plus courte par rapport aux autres insecticides. De plus, il n'est pas nocif pour les ennemis naturels de *M. hirsutus*, surtout pour les coccinelles, qui jouent un rôle important pour supprimer la population de cochenilles dans les champs (Manjunath et coll., 1993). Il est aussi utilisé pour lutter contre plusieurs autres insectes du mûrier, tels que l'insecte responsable de l'enroulement de la feuille, *Diaphania pulverulentis* (Geetha Bai et coll., 1997), le pyralidé du mûrier, *Margaronia pyloalis*, la chenille poilue du Bihar, *Spilosoma obliqua*, la chenille poilue moringa, *Eupterote mollifera*, la chenille tussock, *E. fraterna*, la sésie *Amata passalis* et *Ceryx godarti* (Sengupta et coll., 1990).

Pendant notre étude, quand on vaporise du DDVP (Nuvan, EC = 76 %) à cinq concentrations différentes, (soit 0.1 ; 0.3 ; 0.5 ; 1 ou 2 ml de DDVP dans 1 litre de solution savonneuse à 0.5 %) sur des feuilles de mûrier infestées en laboratoire, tous les adultes et les nymphes meurent au bout de respectivement 18, 16, 12, 10 ou 9 minutes. Quatre mûriers sévèrement infestés, choisis pour un test sur le terrain ont été vaporisés avec cinq litres chacun de solution de DDVP à 0,038 %, 0,076 % ou à 0,15 %. Trente minutes après la vaporisation, la plupart des aleurodes sont morts. Tous les arbres vaporisés sont surveillés quotidiennement. Quatre jours après la vaporisation, on peut voir quelques adultes. On procède à une deuxième vaporisation cinq jours après la première vaporisation. Par la suite tous les arbres vaporisés se révèlent exempts d'infestation par l'aleurode à spirale.

Les méthodes chimiques recommandées en Inde pour lutter contre *A. dispersus* sur le mûrier comprennent la vaporisation avec du savon Rosin à base d'huile de poisson (FORS) à raison de 40 ml / l, avec du dichlorvos 76 WSC à raison de 2 ml / l, la période d'attente la plus courte étant de 15 jours (Douressamy et coll., 1997). A Taiwan, Hungchich et coll., (1995) ont signalé que le bifenthrin à 2,8 % EC est efficace contre les œufs, le méthomyl WP à 90 % contre les nymphes et les adultes ; on constate aussi, que l'huile de margousier à 50 % mélangé avec du Triton donne un des meilleurs résultats quand on l'applique à des taux faibles.

RECOMMANDATIONS POUR LUTTER CONTRE L'ALEURODE

Les méthodes suivantes de lutte sont recommandées contre l'infestation par l'aleurode sur le mûrier :

1. Quand l'infestation est faible, couper les parties affectées et les détruire en les trempant dans une solution de savon à 2 % qui tue les insectes.
2. Utiliser un jet d'eau puissant pour enlever les œufs et les nymphes.
3. Utiliser des pièges lumineux pour détruire les adultes.

4. Ne transporter que des boutures de mûrier recouvertes, pour les utiliser dans les nouvelles plantations.

5. Eviter de cultiver d'autres plantes hôtes comme la goyave, la mangue, la tomate, l'hibiscus, la rose, la poinsettia près des mûriers et des plantations. Enlever et détruire périodiquement les mauvaises herbes qui sont atteintes par l'aleurode à spirale dans et autour des plantations de mûrier.

6. Utiliser des ennemis naturels tels que les prédateurs coccinellides (*Cryptolaemus montrouzieri*, *Scymnus* sp. etc..) et les parasitoïdes (*Encarsia* spp.).

7. Vaporiser une émulsion de DDVP à 0,038 % (Nuvan, EC = 76 %) (mélanger 0,5 ml de DDVP dans 1 litre de solution savonneuse à 0,5 %) sur les parties affectées des plantes. Quand l'infestation est importante, une deuxième vaporisation, 5 jours après la première vaporisation est nécessaire. Les feuilles de mûrier peuvent être utilisées pour l'élevage de vers à soie 10 jours après la dernière vaporisation. Un à deux litres d'émulsion ou 150 litres / arpent sont nécessaires, en fonction de la taille du mûrier. L'application d'insecticide ne doit être entreprise qu'en dernier recours.

8. Prendre simultanément des mesures de lutte sur toutes les espèces de plantes affectées, poussant près de la plantation de mûriers.

A NEW RECORD OF *DENDROPHTHOE* SPP. ON MULBERRY PLANT AND ITS INFESTATION BY *DELIAS EUPHARIS* (DRURY)

CHALUVACHARI, U. D. BONGALE, M. KRISHNA, R. S. MALLIKARJUNAPPA,
M. S. ESWAR RAO & M. GEETHABAI

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

Keywords: *Delias eupharis* (Drury), *Dendrophthoe*, food plant, Loranthaceae, *Morus*, mulberry, parasite.

Mulberry (*Morus* spp.) of the family Moraceae (Rangaswami *et al.*, 1976) is cultivated in the tropics as small to medium bush through repeated pruning for producing the foliage for silkworm rearing. *Dendrophthoe* of the family Loranthaceae, an evergreen facultative stem parasite is known to parasitise on different plant species (Lawrence, 1951; Ramamoorthy, 1976) more commonly on mango and jackfruit trees and a few other tree species. Mulberry under cultivation as bushes is so far not reported to be the host for such parasitic plant species. In the experimental plantation of six mulberry varieties (namely Mysore Local, S₁₃, S₃₄, DD and S₁₆₃₅ varieties of *M. indica*) under rainfed cultivation in the campus of KSSRDI at Bangalore, two species of *Dendrophthoe* namely *D. falcata* and *D. trigona* of the family Loranthaceae were found growing abundantly at the nodal region on the stems of mulberry during May – June 2000. The stem of mulberry at the nodal region was swollen owing to the entry of roots of the parasite and was anchored by the modified roots or haustoria growing downwards on the stem of mulberry and were attached with suckers. This parasitic plant was more commonly found on Mysore Local and S₁ mulberry varieties compared to other varieties. Such a preference is attributed to higher rate fruiting in these varieties of mulberry, facilitating the attraction of birds which help in the dispersal of seeds of the parasite. Similar incidence was also found on Bendola mulberry variety growing as an ornamental creeper in the same campus. At later stages, larvae of *Delias eupharis* (Drury) (Lepidoptera: Pieridae) were found feeding on the leaves of *Dendrophthoe falcata* and *D. trigona* being the food plant for *Delias eupharis* (Gunathilagaraj, 1998).

REFERENCES

- GUNATHILAGARAJ K. (1998) Some south Indian butterflies – Field guide. Mytec process Pvt. Ltd., Bangalore pp. 270.
- LAWRENCE G. H. M. (1951) Taxonomy of vascular Plants. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, pp 823.
- RAMAMOORTHY J. P. (1976) Loranthaceae pp 305-311. In: Flora of Hassan district; Karnataka, India. Eds. Saldanha, C. J. & Nicolson, D. H. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 923.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., JOLLY M. S. (1976) Manual on Sericulture, volume I, Mulberry cultivation. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome – 1976, pp 150.

SIGNALEMENT DE *DENDROPHTHOE* SPP. SUR DES PLANTS DE MURIER ET DE SON INFESTATION PAR *DELIAS EUCHARIS* (DRURY)

CHALUVACHARI, U. D. BONGALE, M. KRISHNA, R. S. MALLIKARJUNAPPA,
M. S. ESWAR RAO & M. GEETHABAI

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

Le mûrier (*Morus* spp.) de la famille des Moraceae (Rangaswami et coll., 1976) est cultivé sous les tropiques sous forme de buisson petit ou moyen que l'on taille régulièrement pour donner des feuilles pour l'élevage du ver à soie. On sait que *Dendrophthoe*, de la famille Loranthaceae, un parasite qui apparaît parfois sur le tronc des arbres à feuilles persistantes, parasite plusieurs espèces de plantes (Lawrence, 1951 ; Ramamoorthy, 1976), plus couramment le manguier et le jacquier et quelques autres espèces d'arbres. Jusqu'à présent, il n'avait pas été observé que les buissons de mûrier pouvaient être l'hôte d'une telle espèce de plante parasite. Nous avons trouvé en mai et juin 2000 dans la plantation expérimentale non irriguée comprenant six variétés de mûrier (Mysore Local, S₁₃, S₃₄, DD et les variétés S₁₆₃₅ de *M. indica*) du campus du KSSRDI à Bangalore, deux espèces de *Dendrophthoe*, *D. falcata* et *D. trigona* de la famille des Loranthaceae poussant abondamment dans la zone nodale des troncs de mûrier. Le tronc de mûrier dans la zone nodale est enflé à cause de l'entrée des racines du parasite et est ancré par des racines modifiées ou haustorium qui poussent au bas du tronc du mûrier et sont accrochées par des suçoirs. On rencontre plus couramment cette plante parasite sur les variétés Mysore Local et S₁ que sur les autres variétés. On attribue une telle préférence à un taux plus élevé de fructification chez ces variétés de mûrier, ce qui attire les oiseaux, et aide à répandre les graines du parasite. On a observé le même phénomène sur le même campus chez la variété de mûrier Bendola qui pousse comme une plante rampante ornementale. Aux stades ultérieurs, on observe des larves de *Delias eucharis* (Drury) (Lepidoptera : Pieridae) qui se nourrissent sur les feuilles de *Dendrophthoe falcata* et de *D. trigona*, les plantes hôtes de *Delias eucharis* (Gunathilagaraj, 1998).

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	140
General sericulture	
Mûrier	143
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	147
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	150
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	151
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	153
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	154
Silkworms: eggs, embryology	
Soie	155
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

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

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

Sériciculture générale

General sericulture

Epidemy of grasserie and its prevention and control in Zhejiang Sericultural Areas.

Epidémie de grasserie et contrôles et préventions dans la zone séricicole de Zhejiang.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4),39-40. (C)

Spring rearing season.

Elevages de printemps.

CAIZHEN X., *et al.*

Sericultural Management Station of Jiaxing City, Jiaxing 314001, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4), 23-24. (C,e)

La tradizione serica in Madagascar. Sericulture tradition in Madagascar.

La tradition de la soie à Madagascar.

CRIPPA F., *et al.*

Stazione Sperimentale per la Seta, Milano, Italia.

2000 La Seta, Vol. 2, 34-41. (I)

A breakthrough in tropical bivoltine sericulture.

Une percée dans la sériciculture tropicale bivoltine.

DATTA R.K.

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

2001 Indian Silk, Vol.39(9),19-23. (E)

Status and expectation in sericulture development.

Position et prévision dans le développement de la sériciculture.

HONGLI W., *et al.*

Department of Sericulture, Shangdong Agricultural University, Tai'an 271018, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol 31(4), 1-3.(C,e)

Analyses on the decrease of cocoon production in mid-autumn rearing season in 1999 in Nanxun region of Huzhou city.

Analyses des baisses de production pendant la saison d'élevage de la mi-automne 1999 dans la région de Manxun à Huzhou.

HUIGENG Q., *et al.*

Nanxun Extension Station of Sericultural Technique in Huzhou, Nanxun 313009, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),33-34. (C,e)

The present situation and breeding direction of silkworm races in Zhejiang province.

La situation actuelle et l'orientation du breeding des vers à soie dans la région de Zhejiang.

JINQIAN Z., *et al.*

Agricultural Department of Zhejiang Province, Hangzhou 310004, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),4-6. (C,e)

Sericulture in Zhejiang province for 21st century.

Sériciculture dans la région de Zhejiang au 21ème siècle.

PICHENG W.

Agricultural Department of Zhejiang Province, Hangzhou 310004, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),1-3. (C,e)

Application of information technology in sericulture.

Application des technologies de l'information en sériciculture.

RAJAGOPAL REDDY C., *et al.*

Department of Sericulture, Government of Andhra Pradesh, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 9-10. (E).

Sericultural by-products and human health.

Produits dérivés de la sériciculture et santé humaine.

RUI Z.

Animal Sciencetech College, Xinjiang Talimu Agriculture and Reclamation University, Alaer 843300, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),51-53. (C,e)

An analysis of factors discriminating technology use among sericulturists in Karnataka.

Une analyse des facteurs discriminants l'usage des technologies utilisées parmi les sériculteurs du Karnataka.

SHANKAR L., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 52-59. (E)

Pest management in sericulture.

Lutte contre les pestes en sériciculture.

SINGH R.N., *et al.*

Indians Publishers Distributors 156-D, Kamla Nagar, Delhi-110007, Bangalore, India.

2001 Indian Silk, Vol.39(9), 2. (E)

Tropical bivoltine sericulture : a new era in the offing.

La sériciculture bivoltine tropicale : une nouvelle ère.

SINHA R.K.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560068, India.

2001 Indian Silk, Vol.39(9),5-11. (E)

Pesticides, mulberry plants and silkworms.

Pesticides, mûriers et vers à soie.

SURENDRA NATH B.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560068, India.

2001 Indian silk, Vol.39(11),9-10 and 27. (E)

Comparative economics of silk growers on the basis of land holding.

Comparatifs économiques de sériciculteurs.

TRIPATHI P.

Department of Economics, JMV, Ajitmal Etawah, Uttar Pradesh, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 5-6. (E)

On the construction of the sericultural modernization.

Sur la construction de la modernisation séricicole.

XIUKANG M., *et al.*

Huzhou General Station of Sericultural Supervision, Huzhou 313000, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),1-3. (C,e)

Future directions of bivoltine silkworm breeding in India.

Voies futures pour le breeding de vers à soie bivoltins en Inde.

YAMAGUCHI A.

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

2001 Indian Silk, Vol.39(9),26-28. (E)

Comparison of commercial varieties for summer-autumn rearing in Zhejiang province.

Comparaison des variétés commerciales pour les élevages d'été-automne dans la province de Zhejiang.

YUANXIANG J., *et al.*

Department of Sericulture and Apiculture, College of animal sciences, Zhejiang University Hangzhou 310020, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(3),26-28. (C,e)

Investigation on the resources of mulberry trees in Northeast of China.

Investigation sur les ressources en mûriers dans le nord-est de la Chine.

YUBI W., *et al.*

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol. 26(4), 254-256. (C)

New record of insect pests of mulberry from Jammu and Kashmir.

Nouveaux insectes nuisibles du mûrier au Kashmir.

ZEYA S.B., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, P. Bag 88 GPO, Srinagar - 109001, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1),89-90. (E)

Relation between wild insects and pebrine disease control.

Rapport entre insectes sauvages et la lutte contre la pébrine.

ZHIWEI C., *et al.*

Silkworm Egg Production Station of Deqing City, Zhejiang Province, Deqing 313200, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),5-8. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Experiment on prevention of mulberry rust in spring pruned mulberry garden through shoot top clipping in summer.

Expérience sur la prévention de la maladie de la rouille sur les mûriers taillés au printemps en rabattant le haut de la pousse en été.

BAIHE S., *et al.*

Nanxun Extension Station of Sericultural Technique, Huzhou City, Nanxun 313009, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2), 22-23. (C,e)

Identification of an improved mulberry variety suitable for north eastern part of India.

Identification d'une meilleure variété de mûrier convenable pour le Nord-Est de l'Inde.

CHAKRAVORTY R., *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Jorhat -785002, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 74-75. (E)

Optimum size and shape of the plot for mulberry experiments.

Dimensions et forme optimales du terrain pour les expériences sur le mûrier.

CHATURVEDI H.K., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 67-69. (E)

Test on the preservation of mulberry fresh sorosis.

Test sur la conservation des soroses de mûriers frais.

CHENGJUN L., *et al.*

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

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),13-15. (C,e)

Evaluation of fresh plant extracts for control of mulberry powdery mildew.

Evaluation d'extraits de plantes frais pour le contrôle des moisissures poudreuses du mûrier.

GANGWAR S.K., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 76-78.(E)

Study on labor - saving harvesting and its corresponding techniques of mulberry trees.

Etude sur l'économie de main d'oeuvre pour la récolte de mûriers et les techniques correspondantes.

GUOXIN S., *et al.*

Sericulture Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(3),24-25. (C,e)

Studies on the mulberry growth progress and rationality of leaves harvest.

Etudes sur la croissance et la rationalité de la récolte des feuilles de mûrier.

JIANXIN W., *et al.*

Zhejiang Province Plant Protection station, Hangzhou 310020, China.

2000 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.26(4), 248-253. (C,e)

A study on synergism of some kinds of insecticide for mulberry fields.

Une étude sur la synergie de quelques types d'insecticides pour les champs de mûriers.

JIANXUN D., *et al.*

2000 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 26(4), 265-267. (C)

Study on manuring techniques of high yielding mulberry field in irrigation region of Ningxia.

Etudes sur les techniques d'irrigation pour répandre de l'engrais dans les champs de haute production de mûrier dans la région de Ningxia.

JUN M., *et al.*

Forest Department of Qingtongxia city, Ningxia, China.

2000 *Bulletin of sericulture*, Vol.31(1),15-17. (C,e)

Control of bacterial leaf spot of mulberry caused by *xanthomonas campestris* pv Mori.

Contrôle des taches bactériennes sur les feuilles de mûrier causées par *Xanthomonas campestris* pv Mori.

MAJI M.D., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore -742101 India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.39(1), 49-51. (E)

Heritability and genetic advance of quantitative traits in mulberry (*Morus* spp).

Héritabilité et avance génétique des traits quantitatifs chez le mûrier *Morus* spp.

MASILAMANI S., *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Coonoor - 643101, India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol 39(1), 16-20. (E)

Investigation on economic efficiency of mulberry-tea tree interplanting.

Recherche sur l'efficacité économique des plantations intercalées de mûrier et de thé.

MEIQIU M., *et al.*

Agricultural Bureau of Songyang County, Zhejiang Province, Songyang 323400, China.

2000 *Bulletin of Sericulture*, Vol.31(2),39-40. (C,e)

Shoot organogenesis from mulberry leaf tissue : origin and development of regenerated shoots.

Organogénèse de la pousse à partir de tissus de feuille de mûrier : origine et développement des pousses régénérées.

MIYAZAKI J., *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology Matsugasaki, Sakio Kyoto 606-0962, Japan.

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(5), 319-325. (E,j)

Development of a reliable method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of mulberry callus.

Développement d'une méthode fiable de transformation de cals de mûrier par *Agrobacterium tumefaciens*.

NOZUE M., *et al.*

Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan.

2000 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.69(6),345-352. (E,j)

Biofertilizer and triacontanol boosts mulberry leaf yield in Kerala.

Biofertilisants et triacontanol améliorent le rendement en feuilles de mûrier au Kérala.

PHILIP T.

Research Extension Centre, Angamaly, Kerala, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 7-8. (E).

Growth and leaf yield of a few improved mulberry strains as influenced by soil and agroclimatic conditions in N.E. India.

La croissance et la production de feuilles de quelques lignées de mûriers améliorés sont influencées par le sol et les conditions agroclimatiques dans le Nord-Est de l'Inde.

PHUKAN J.D., *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Jorhat - 785002, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 84-85. (E)

Biological Control of *Phyllactinia corylea* (Pers.) karst, using composted plant extracts.

Contrôle biologique de *Phyllactinia corylea* (Pers.) karst, par des extraits de compost.

PRATHEESH KUMAR P.M., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 81-83. (E)

Inquiring into mathematics models of the relations in mulberry shoot length with shoot weight and leaf.

Recherche de modèles mathématiques concernant les relations entre la longueur de la tige, le poids de la tige et le poids des feuilles chez le mûrier.

RYAN S., *et al.*

The Sericultural Research Institute of Shandong Province, Yantai 264002, China.

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol. 26(4), 244-247. (C,e)

The effects of K⁺ on the growth, leaves yields and nutrient uptake of mulberry tree.

Effet du K⁺ sur la croissance, la production de feuilles et l'absorption des nutriments chez le mûrier.

SHUYA Y., *et al.*

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol. 26(4), 261-264. (C)

Ammonium sulphate for leaf yield and quality.

Sulfate d'ammonium pour la production et la qualité de la feuille.

SUBBASWAMY M.R., *et al.*

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

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 5-6. (E)

Leaf nutrient status of a few popular mulberry varieties.

Valeurs nutritives de quelques mûriers populaires.

SUBBASWAMY M.R., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 93-96. (E)

Evaluation of some nitrogen fixing bacteria for control of foliar diseases of mulberry (*Morus alba*).

Evaluation de quelques bactéries fixant l'azote pour contrôler les maladies foliaires du mûrier *Morus alba*.

SUDHAKAR P., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 9-11. (E)

Relationship between leaf yield and branch number, length of mulberry tree and manuring quantity in an unit acreage of mulberry field.

Relation entre la production de feuilles et le nombre de branches, la longueur du mûrier et la quantité d'engrais répandue sur une superficie de champs de mûrier.

WENQI G.

Tongxiang General Station of Sericultural Supervision, Tongxiang 314500, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),31-33. (C,e)

Identification of resistance on different mulberry varieties to *Pseudomonas solanacearum*.

Résistance de différentes variétés de mûrier à *Pseudomonas solanacearum*.

XIAOLING C., *et al.*

Sericulture Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(3),32-33. (C,e)

Isolation and N-terminal amino acid sequence analysis of sap protein in mulberry, *Morus alba* L.

Isolément et séquence N-terminale de la protéine de la sève chez le mûrier, *Morus alba* L.

XIUPING J., *et al.*

2000 Acta Sericologica Sinica, vol. 26(4), 257-260. (C)

Investigation on leaf yield and agronomy characters of four mulberry varieties planted in Hai'an county.

Recherches sur la production de feuilles et les caractères agronomiques de quatre sortes de mûriers plantées dans la région de Hai'an.

XIUPING L., *et al.*

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4),34-35. (C)

Changes in the susceptibility of mulberry leaves applied differing amounts of fertilizer to phytopathogenic fungi.

Changements de la sensibilité des feuilles de mûriers aux champignons pathogènes selon la quantité d'engrais appliquée.

YOSHIDA S., *et al.*

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

2000 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(5), 309-311. (E,j)

Comparison of effects between carbaamino acid-ester and common pesticide for mulberry.

Comparaison des effets de l'ester de l'acide carbamique et les pesticides communs pour les mûriers.

YOUNGENG Y.

Deqing guidance Station of Sericulture Technique, Zhejiang Province, Deqing 313200, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),24-25. (C,e)

Effect of the 700G on the growth of mulberry tree.

Effets de l'irondation sur la croissance du mûrier.

YULI S., *et al.*

Linghu Sericultural Instruction Station, Huzhou City, Huzhou 313018, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),34-36. (C,e)

RAPD analysis for the germplasm resources of genus mulberry, *Morus* L.

Analyse de l'ADN par RAPD pour les ressources génétiques du genre *Morus* L.

Zhao WEIGUO, *et al.*

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

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol.26(4), 197-204. (C,e)

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

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

Performance of hard wood stem cuttings of mulberry genotypes under temperate climatic condition of kashmir.

Performance des boutures de génotypes du mûrier sous les conditions de climat tempéré du kashmir.
BAKSH S., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, Srinagar - 190001 India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 30-32. (E)

Comprehensive prevention and control silkworm pebrine disease.

Contrôle et prévention complets de la maladie de la pébrine chez le ver à soie.

BAOYI L., *et al.*

Agricultural Department of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(3),5-8. (C,e)

Introduction of the three molting silkworm to produce fine size raw silk and recommendation for development.

Introduction de vers à soie trimuants pour produire de la soie grège fine et conseils pour le développement.

BENCHANG H., *et al.*

Jinzhai Sericultural Office, Anhui Province, Jinzhai 237300, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),46-48. (C,e)

Increase silkworm rearing profit by application of checker cocooning frames.

Augmentation du profit dans l'élevage du ver à soie par l'utilisation d'encabannages à cases.

BIXIA Z.

Sericultural Management Station of Shengzhou 312400, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4),25-26. (C,e)

Lantana for fabricating silkworm rearing equipments : an alternative to bamboo.

Le Lantaniér pour la fabrication d'équipement d'élevage pour le ver à soie : une alternative au bambou.

CHANGALARAYAPPA, *et al.*

Department of Sericulture, UAS. GKVK. Bangalore. India

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 7-9. (E)

Strategies in genetics and molecular biology for strenghtening silkworm breeding.

Stratégies génétiques et de biologie moléculaire pour consolider le breeding chez le ver à soie.

DATTA R.K., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol.39(1), 1-8. (E)

Evaluation of the effect of wrap-up method of young silkworm rearing on cocoon characters.

Evaluation des effets de la méthode d'emballage des jeunes vers à soie sur les caractères du cocon.

HIMANTHARAJ M.T., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 70-71. (E)

The antibacterial proteins in silkworm (*Bombyx mori*).

Les protéines antibactériennes chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

HONGBIAO W., *et al.*

Sericulture Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences Hangzhou 310021, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol. 31(3), 1-4. (C,e)

Effect of diet rationing on seed crop survivability and grainage aspects of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet du rationnement de la nourriture sur la survie de la récolte de graines et sur le grainage du ver à soie, *Bombyx mori* L.

JAGADEESH N., *et al.*

Silkworm seed technology Laboratory, Bangalore 560035 India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 36-40. (E)

Studies on Karyotype of *Beauveria bassiana*, a pathogenic fungus to *Bombyx mori* L.

Etudes du caryotype de *Beauveria bassiana*, un champignon pathogène de *Bombyx mori* L.

LIANGEN S.

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

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol. 26(4), 219-227. (C,e)

Experience in prevention and control of pebrine disease in eggs - raising station farmer's parent - silkworm rearing.

Expérience sur la prévention et le contrôle de la pébrine dans les élevages de vers à soie pour la production d'oeufs.

MEIXIAN S., *et al.*

2000 Bulletin of Sericulture 31(4), 37-38. (C)

Breeding of practical varieties Xingmiao X Mingri with super-thick filament size.

Breeding de variétés Xingmiao X Mingri donnant un filament très épais.

MENGKUI X., *et al.*

College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310033, China

2000 Acta Sericologica Sinica, Vol. 26(4), 214-218. (C,e)

Identification of bivoltine silkworm hybrids suitable for tropical climate.

Identification d'hybrides de vers à soie bivoltins adaptés au climat tropical.

NASEEMA BEGUM A., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol 39(1), 24-29. (E)

Evaluation of newly evolved bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L. for silk yield contributing traits under hill condition.

Evaluation d'hybrides bivoltins de *Bombyx mori* L. récents pour les caractères contribuant au rendement en soie.

RAJALKSHMIE E., *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Coonoor - 643101, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol 39(1), 21-23. (E)

Study on the use of saw dust to accelerate mounting of silkworm and its effect on cocoon quality.
Etude sur l'utilisation de la sciure pour accélérer la montée du ver à soie et son effet sur la qualité du cocon.

RAJAN R.K., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 72-73. (E)

Studies on sex ratio in normal and sex-limited strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes du sexe ratio chez les souches normales et limitées au sexe chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

RAVINDRA SINGH, *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol.39(1),91-92. (E)

"Trichodermin 6" : a new fungicide to control muscardine.

La "Trichodermine 6" : un nouveau fongicide pour contrôler la muscardine.

SARKAR J., *et al.*

Research Extension Centre, Bagmara, Mothabar, Maela (WB), India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 11-12. (E)

Efficacy of a new silkworm bed desinfectant "resham jyothi" under field conditions.

Efficacité d'un nouveau désinfectant de litières de vers à soie, le "resham jyothi", dans les conditions réelles.

SASIDHARAM T.O., *et al.*

Silkworm seed Technology Laboratory, Bangalore -560035, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 41-48. (E)

Report on application of high-low temperature cocoon drying chamber.

Rapport sur l'utilisation d'un séchoir à cocons à haute et basse température.

SHANLU W., *et al.*

Silk Company of Wulian County in Shangdong Province, Wulian 2623000, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(2),19-21. (C,e)

Effect of low temperature treatment to the 3rd instar larvae of silkworm on the development duration.

Effet d'une basse température au troisième stade larvaire du ver à soie sur la durée de son développement.

SHIQUN H., *et al.*

Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences,

Nanchong 637000, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(1),25-27. (C,e)

Potential of wood ash from mulberry and coconut as desinfectant for sericulture.

Potentiel des cendres de mûriers et de cocotiers comme désinfectant pour la sériciculture.

VIRENDRAKUMAR *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 11-13. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry : rearing, feeding, pathology

Chinese tasar reeling technology : an overview.

Vue d'ensemble sur la technologie du dévidage du tasar chinois.

GHOSE J.

Eco Testing Laboratory, CSB, Bhagalpur, Bihar, India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 15-19. (E)

UNDP assisted programme for development of non-mulberry silks.

Programme pour le développement des soies non mûrier soutenu par le PNUD.

KRISHNA J.V., *et al.*

Central Silk Board, CSB Complex BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560068, India.

2001 Indian Silk, Vol.39(11), 15-19. (E)

Larval colour morphs in muga silkworm.

Les variants de la couleur larvaire chez le ver à soie muga.

MUKHOPADHYAY S.K., *et al.*

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

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 13-14. (E)

Nylon bag - a new egg laying device in tasar.

Les sachets en nylon, un nouveau matériel pour les pontes du tasar.

PRASAD B.C., *et al.*

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

2001 Indian Silk, Vol.39(11), 11-12. (E)

Tropical tasar seed cocoon : pricing formula and biological parameters.

Cocons des tasars tropicaux : formule de fixation des prix et paramètres biologiques.

THANGAVELU K., *et al.*

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

2000 Indian Silk, Vol 39(8), 13-15. (E)

High altitude oak tasar rearing house.

Bâtiment d'élevage en haute altitude pour le tasar du chêne.

TIKEN SINGH N., *et al.*

Appropriate Technology India, Ukhimath, Garhwal, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 17-19. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Nucleotide sequence Analysis on the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Analyse de la séquence nucléotidique du gène p35 du virus de la polyédrose nucléaire.

CHENGLIANG G., *et al.*

Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2000 *Acta Sericologica Sinica*, vol. 26(4), 219-223. (C,e)

Genetic studies on yellow colour of larval body in the local silkworm race "Sihong".

Etudes génétiques sur la couleur jaune des larves chez les vers à soie de la race "Sihong".

DAI FANGYIN, *et al.*

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, China.

2000 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.26(4), 205-213. (C,e)

Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses.

Organisation du génome et son contenu chez les baculovirus des lépidoptères.

HAYAKAWA T., *et al.*

Laboratory of Molecular Life Science, Niigata University, Ikarishi, Niigata, Japan.

2000 *Virology*, Vol. 278(1), 1-12. (E)

Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4.

Caractérisation moléculaire du segment 4 du génome du virus de la polyédrose cytoplasmique.

IKEDA K., *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8565, Japan.

2001 *J. Virol.*, Vol.75(2),988-995. (E)

Characteristics of *tsg*, the low temperature sensitive gray-egg mutation in *Bombyx mori*.

Caractéristiques de *tsg*, la mutation oeuf gris sensible à la basse température chez *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., *et al.*

Laboratory of Silkworm Science, Graduate School, and Kyushu University 6-10 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(5), 289-298. (E,j)

Nucleocapsid protein gene of Chinese isolate of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

Gene de la protéine de la nucléocapside de l'isolat chinois du virus de la polyédrose de *Bombyx mori*.

LIU D., *et al.*

Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, P.R. China.

2000 *Acta Virol.*, Vol.44(3), 157-161. (E)

Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae.

Production d'interferon gamma bovin recombinant par deux systèmes d'expression de baculovirus utilisant des cellules d'insectes et des larves de ver à soie.

MURAKAMI K., *et al.*

National Institute of Animal Health, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856, Japan.

2001 *Cytokine*, Vol.13(1), 18-24. (E)

Construction of *Bombyx mori* transposon expression vector pSVHK1.4.

Construction d'un vecteur d'expression, pSVHK1.4, à partir du transposon de *Bombyx mori*.

QIAOXUE X., *et al.*

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

2000 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.26(4), 228-233. (C,e)

The nature of heterosis, methods of its enhancing and fixation in a series of generations without hybridization.

La nature de l'hétérosis, les méthodes de son accroissement et de sa fixation au fil des générations, sans hybridation.

STRUNNIKOV V.A., *et al.*

Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 117808 Russia.

2000 *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, Vol.6,679-87. (E)

Breakage and subsequent return for W chromosome-pb fragment-fifth linkage group fusion chromosome in the sex-limited pb silkworm strain (TWPB), *Bombyx mori*.

Rupture et retour subséquent du fragment du chromosome-pb W du 5ème groupe de liaison la lignée pb limitée au sexe du ver à soie *Bombyx mori* (TWPB).

TANAKA N., *et al.*

2000 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 69(5), 327-330. (J,e)

Cloning and sequencing analyses of Eco RI 2.0kb fragment of silkworm mitochondrial genome.

Clonage et séquençage des fragments EcoRI de 2kb du génome mitochondrial du ver à soie.

XINGJIA S., *et al.*

Key Laboratory, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2000 *Acta sericologica Sinica*, Vol. 26(4), 234-238. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Transepithelially transported prophenoloxidase in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori* : Identification of its methionyl residues oxidized to methionine sulfoxides.

Prophénoloxydase transportée à travers les tissus épithéliaux dans la cuticule du ver à soie, *Bombyx mori* : identification de ses résidus méthionyl oxydés en sulfoxydes de méthionine.

ASANO T., ASHIDA M.

The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo,
Hokkaido 060-0819 Japan.

2000 J. Biol. Chem. (E)

Insect metamorphosis : Out with the old, in with the new.

Métamorphose des insectes.

BUSZCZAK M., *et al.*

Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University, Connecticut
06520-8103 New Haven, USA.

2000 Curr. Biol., Vol. 10(22), 830-833. (E)

Effect of oral administration with tyrosine on silkworm.

Effet de l'administration orale de tyrosine chez le ver à soie.

HEYU Z., *et al.*

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4), 21-22. (C,e)

Temporally regulated transcription of alkaline phosphatase genes in the midgut of *Bombyx mori*.

Transcription temporellement réglée des gènes de phosphatase alcalins dans l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

ITOH M., *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology Matsugasaki, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8585, Japan.

2000 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 69(5), 297-303. (E,j)

Antibacterial peptides isolated from insects.

Peptides antibactériens isolés à partir d'insectes.

OTVOS L.

The Wistar Institute, 3601 Spruce Street, Philadelphia, PA 19104, USA.

2000 J. Peptide Sci., Vol. 6, 497-511. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Experiment on silkworm eggs by acid treatment after refrigeration in room-temperature.

Expérience sur le traitement des oeufs de vers à soie à l'acide à température ambiante après réfrigération.

JIE X., *et al.*

Industrial Crop Bureau, Agricultural Department of Zhejiang Province, Hangzhou 31006, China.

2000 *Bulletin of Sericulture*, Vol.31(2),9-12. (C,e)

Induction of non-diapause egg by dark and low temperature incubation in local variety of the silkworm, *Bombyx mori*.

Obtention d'oeufs non diapausant par incubation à l'obscurité et à basse température chez une variété locale de ver à soie, *Bombyx mori*.

KOSEGAWA E., *et al.*

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Japon.

2000 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.69(6),369-375. (J,e)

Effects of hydrochloric acid on the metabolism of hydrogen peroxide in the silkworm embryo.

Effet de l'acide chlorhydrique sur le métabolisme du peroxyde d'hydrogène chez l'embryon du ver à soie.

LINCHUANZ., *et al.*

2000 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.26(4), 268-270. (C)

Effect of male moth treatments on egg laying after mated with female.

Effet des traitements du papillon mâle sur la ponte d'oeufs après accouplement.

RIJUN C., *et al.*

Parent silkworm egg production station of Yantai city, Shandong province, Yantai 264000, China.

2000 *Bulletin of Sericulture*, Vol.31(3),16-17. (C,e)

Soie

Silk

Studies on the boil-off loss ratio with reference to the cocoon shell in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

Etude sur le rapport de perte au décreusage en référence à la coque du cocon bivoltin du ver à soie, *Bombyx mori* L.

BASARAVAJA H.K., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(1), 60-65. (E)

Tintura della seta con l'estratto del frutto di *Terminalia arjuna*. Silk dyeing with fruit extract of *Terminalia arjuna*.

Teinture de la soie avec l'extrait de *Terminalia arjuna*.

KAMEL M.M., *et al.*

Textile Research Division - National Research Centre, Dokki, Il Cairo Egitto.

2000 La Seta, Vol. 2,15-23. (I)

Adsorption properties of harmful gas by silk blended paper sheets.

Propriétés d'absorption de gaz nocifs par des feuilles du mélange soie-papier.

KATO H.

2000 J. seric. Sci. Jpn., Vol. 69(5), 331-333. (J,e)

Physical properties for silk fibers from Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*, degummed using hot pressurized water.

Propriétés physiques des fibres de soie décreusées par eau chaude sous pression du ver à soie du chêne japonais, *Antheraea yamamai*.

KAWAHARA Y., *et al.*

2000 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol.69(6),377-379. (J,e)

Eri silk spinning technology.

Technologie de filage de la soie Eri.

MISHRA SN.

Central Silk Board, Sualkuchi, Assam, India.

2000 Indian Silk, Vol. 39(8), 20-23. (E)

Zari in India - a retrospection.

Le sari en Inde-une rétrospective.

NADIGER G.S., *et al.*

Textiles committee, Mumbai, India.

2001 Indian Silk, Vol.39(11),20-23. (E)

Silk fibroin gel-structural characteristics, as influenced by preparation condition.

Les caractéristiques structurales du gel de fibroïne sont influencées par les conditions de préparation.

SHRI N.M.S.

Central Sericultural Research and training Institute, Manandavadi Road, Sirampura, Mysore 570008 India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(10), 10-10. (E)

The characteristics of frozen drying silk fibroin powder.

Les caractéristiques de la poudre de fibroïne lyophilisée.

SIJIA M., *et al.*

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

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(3), 13-15. (C,e)

Estimation of biodegradability of silk yarn embedded in soil using picture processing.

Estimation de la biodégradabilité du fil de soie dans le sol.

TAJIMA F., *et al.*

Yokohama National University, 79-2 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan.

2000 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol.69(6), 353-358. (E,j)

Function of fibroin powder and its research progress.

Fonction de la poudre de fibroïne et évolution des recherches.

XIANGDONG K., *et al.*

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

2000 Bulletin of Sericulture, Vol.31(4), 8-11. (C,e)

The hand performance of black silk yarns dyed via vegetable color dyeing.

Performance de fils de soie noirs teints par des colorants végétaux.

YAMAZAKI K., *et al.*

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

2000 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol.69(6), 363-368. (J,e)

The effects of Pva/chitosan/fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats.

Effets de films spongieux composés du mélange Pva/chitosan/fibroïne (PCF) sur la cicatrisation des blessures chez les rats.

YEO J.H., *et al.*

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture and Technology, Suwon, Korea.

2000 Biol. Pharm. Bull., Vol. 23(10), 1220-1223. (E)