

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (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

- Degummed silk fibers of *Bombyx mori* consist of an H-chain, L-chain and P25 (fibrohexamerin) in a 6: 6: 1 molar ratio** 157
 Les fibres de soie décreusées de *Bombyx mori* sont constituées par la chaîne H, la chaîne L et par P25 (fibrohexamerine) dans un rapport molaire 6 : 6 : 1 165
 S. INOUE, H. TSUDA, H. TANAKA, Y. MAGOSHI & S. MIZUNO

- Effect of methoprene and MH alone and in combination on the ultrastructural changes in the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L.** 169
 Effet du méthoprene et de l'hormone de mue seuls et en combinaison sur les changements ultrastructuraux dans la glande séricigène postérieure du ver à soie, *Bombyx mori* L. 177
 MIAO YUNGEN & D. BHARATHI

- Effect of UV-light on the larval growth, fecundity, cocoon characters and silk quality of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.** 181
 Effet de la lumière UV sur la croissance larvaire, la fécondité, les caractères du cocon et la qualité de la soie du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. 189
 D. BHARATI & MIAO YUNGEN

- Optimal crop planning under production risk for sericulture based cropping system – an application of Motad model** 193
 Planification optimale des cultures en gérant les risques pour la sériculture – une application du modèle Motad 201
 P. KUMARESAN, N. B. VIJAYA PRAKASH & R. K. DATTA

- Efficient regeneration from mature leaf explants of Indian mulberry via organogenesis** 207
 Régénération efficace à partir d'explants de feuille adulte chez le mûrier indien 215
 A. KAPUR, S. BHATNAGAR & P. KHURANA

- Evaluation of improved genotypes of mulberry through leaf chemical analysis and bioassay with silkworm race NB4D2** 219
 Evaluation de génotypes de mûriers améliorés par analyse chimique de la feuille et évaluation biologique avec la variété de ver à soie NB4D2 227
 S. V. PATIL, R. S. MALLIKARJUNAPPA, S. B. DANDIN & M. S. ESWARA RAO

Rapport techniques / Technical reports

- Evaluation of multivoltine × bivoltine F1 hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. in two different seasons** 231
 Evaluation d'hybrides F1 polyvoltins × bivoltins du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. au cours de deux saisons différentes 239
 RAVINDRA SINGH, RACHNA GOEL, D. RAGHAVENDRA RAO, M. REKHA, V. PREMALATHA, M. M. AHISAN & R. K. DATTA

- Cadmium toxicity in silkworm *Bombyx mori* L. and its impact on the economic benefit of sericulture industry** 243
 Toxicité du cadmium chez le ver à soie *Bombyx mori* L. et son impact sur les profits de l'industrie séricicole 249
 S. P. M. PRINCE W. & V. SUBBURAM

Changes in microbial population during fermentation of silkworm pupae	253
Variations de la population microbienne au cours de la fermentation de chrysalides de ver à soie	263
K. P. YASHODA, N. M. SACHINDRA, D. NARASIMHA RAO & N. S. MAHENDRAKAR	

Thidiazuron-induced organogenesis from mature leaf cultures in mulberry (<i>Morus indica</i>) cv. S54	269
Organogénèse induite par le thidiazuron à partir de feuilles de mûrier matures (<i>Morus indica</i> L.) chez le cultivar S54	275
R. CHAKRAVARTHY, U. PAVAN, M. RAMESH, K. SRINIVASA REDDY & A. SADANANDAM	

Phosphorus uptake in three improved varieties of mulberry (<i>Morus indica</i> L.) under irrigated field cultivation	279
Absorption de phosphore chez trois variétés de mûrier améliorées (<i>Morus indica</i> L.) en cultures irriguées	287
R. M. SHIVAPRAKASH, U. D. BONGALE, S. B. DANDIN, BASAVAIHA, S. N. NARAYANAGOWDA & N. SIDDALINGASWAMY	

Identification and tackling the factor hindering the regeneration of <i>Terminalia arjuna</i> (Bedd.) through cutting – a breakthrough	291
Identification du facteur empêchant la régénération de <i>Terminalia arjuna</i> (Bedd.) par bouturage	297
P. S. SINHA, M. C. JOSHI, S. BECK, R. KHARE, A. GANGOPADHYAY, A. K. SINHA, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU	

Note brève / Brief note

Preliminary observations on embryonic development of uzifly, <i>Blepharipa zebina</i> Walker (Diptera: Tachinidae)	301
Observations préliminaires sur le développement embryonnaire de la mouche uzi, <i>Blepharipa zebina</i> Walker (Diptera : Tachinidae)	307
RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU	

Bibliographie / Bibliography	311
---	-----

Sériciculture générale / General sericulture	313
Mûrier / Mulberry	315
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	319
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology	327
Vers à soie : génétique / Silkworms : genetics	329
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms : physiology, biochemistry	333
Vers à soie : œufs, embryologie / Silkworms : eggs, embryology	337
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms : silk glands	339
Soie / Silk	341

DEGUMMED SILK FIBERS OF *BOMBYX MORI* CONSIST OF AN H-CHAIN, L-CHAIN AND P25 (FIBROHEXAMERIN) IN A 6 : 6 : 1 MOLAR RATIO

S. INOUE^{1,2}, H. TSUDA^{2,3}, H. TANAKA², Y. MAGOSHI² & S. MIZUNO^{1,4*}

1. Laboratory of Molecular Biology, Department of Molecular and Cell Biology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan.
2. National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
3. Division of Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation.
4. Department of Agricultural and Biological Chemistry, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kamcino, Fujisawa 252-8510, Japan.

Degummed silk fibers were prepared from cocoons of three different breeds of Bombyx mori : J-138, Sekko and Turkish yellow cocoon, with the use of a standard degumming procedure. These materials consisted of partially disintegrated H-chains, L-chains and P25 (fibrohexamerin), in which the disulfide linkage between the H and L chains, non-covalent interactions of P25 with H-chain and N-linked oligosaccharide chains of P25 were maintained. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay with specific polyclonal antibodies demonstrated that the molar ratio of the H-chain, L-chain and P25 in the degummed silk fibers was close to 6:6:1, suggesting that the molecular composition of the elementary unit of fibroin [Inoue et al., J. Biol. Chem. 275: 40517-40528 (2000)] is maintained in commercial silk fibers.

Keywords: Degummed silk, *Bombyx mori*, molar ratio of H-chain, L-chain, P25 (fibrohexamerin), elementary unit of fibroin.

INTRODUCTION

Silk fibroin secreted into the lumen of a posterior silk gland (PSG) of *Bombyx mori* consists of three protein components; an H-chain (about 350 kDa; Shimura *et al.*, 1982; Zhou *et al.*, 2000), an L-chain (26 kDa; Yamaguchi *et al.*, 1989) and a glycoprotein P25 (30 kDa; Chevillard *et al.*, 1986a, b). Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the specific antibody for each protein component has shown that the molar ratio of H-chain : L-chain : P25 is 6:6:1 for the fibroin secreted into the PSG lumen and for the 60 % LiSCN-soluble proteins of cocoon shells. Subsequently, a 2.3 Mda protein complex consisting of H-chain, L-chain and P25 with a molar ratio of 6:6:1 was isolated from PSG cells (Inoue *et al.*, 2000). This complex, designated as an elementary unit of fibroin, has been suggested to be assembled with six sets of H-L dimers surrounding a single molecule of P25 and its complex structure is maintained by hydrophobic and hydrogen-bonding interactions between H-chains and P25. The N-linked oligosaccharide chains of P25 have been suggested to be involved in the latter interactions (Inoue *et al.*, 2000). Because of the central role of P25 in maintaining the

* To whom correspondence should be addressed at above address 4.

structure of elementary unit, *fibrohexamerin* was proposed as a functional name of P25 (Inoue *et al.*, 2000).

The disulfide linkage between Cys-172 of the L-chain and Cys-c20 (twentieth residue from the C terminus) of the H-chain (Tanaka *et al.*, 1999a) is not responsible for the maintenance of the once-formed elementary unit (Inoue *et al.*, 2000). But the H-L linkage is essential for the large scale production of fibroin (Mori *et al.*, 1995), because fibroin is retained in ER in the absence of disulfide linkage between the H and L-chains (Gamo and Sato, 1985). The three-component type fibroin (H-chain, L-chain and P25) seems to be rather common among different silk producing insects in the class Lepidoptera, although the fibroin of Saturniidae species has been suggested to be secreted as a dimer of H-chain (Tanaka and Mizuno, 2001).

In the present study, we aimed at analysing the molar ratio of H-chain, L-chain and P25 in silk fibers which were prepared through the conventional processes of degumming under hot alkaline conditions. Because of the non-covalent nature of the association of P25 in the elementary unit (Tanaka *et al.*, 1999b; Inoue *et al.*, 2000), there might be a possibility that P25 is dissociated during the degumming processes and its stoichiometric content in the resultant silk fibers might be altered significantly. We prepared degummed silk fibers from cocoons of three different breeds of *B. mori* and determined the molar ratio of H-chain, L-chain and P25 by a quantitative ELISA.

MATERIALS AND METHODS

Cocoons of *Bombyx mori*:

Cocoons of three normal-level fibroin-producing breeds of *B. mori*; J-138, Sekko and Turkish yellow cocoon, were supplied from the National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Japan.

Preparation of degummed silk fibers:

Cocoon silk was treated in a degumming solution [0.4 g / l CLEWAT-K (Teikoku Chemical Industry), 10.0 g/l Marseilles soap] for 2 h at 95 °C, rinsed in 35 °C distilled water three times and then in cold distilled water once. The material was kept at 45 °C for 3h, followed by drying at 20 °C, 65% relative humidity for three days. The amount of material lost during the above processes was calculated as a percentage from weight of the fiber before and after degumming.

Immunoblotting:

Degummed silk fibers were dissolved in 60% LiSCN at a concentration of 10 mg / ml and dialyzed twice against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 M urea. A 1.5 µl (15 µg) aliquot was subjected to 0.1% sodium dodecylsulphate (SDS)-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before or after reducing the disulfide bonds with 1% 2-mercaptoethanol. For reduced samples, 1% 2-mercaptoethanol was also included in the polyacrylamide gel. Immunoblotting with the rabbit anti-H-chain polyclonal antibody, the rabbit anti-L-chain polyclonal antibody or the mouse anti-P25 polyclonal antibody, each of which was affinity purified with the cognate antigen and proved to be antigen-specific, was carried out according to Inoue *et al.*, (2000).

Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):

The total protein content of a sample solution used for the immunoblotting was determined with the Protein assay (Bio-Rad). The rabbit immunoglobulin G (IgG; Sigma) powder was weighed accurately to prepare 10-150 µg / ml solutions, which were used to make a standard curve. A portion of the sample solution was diluted with 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M urea to a volume of 100 µl (Table II) and subjected to quantitative ELISA for the H-chain, L-chain or P25 as described previously (Inoue *et al.*, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

In order to analyse molar ratios of the H-chain, L-chain and P25 in degummed silk fibers, we chose cocoons of three different breeds of *B. mori*, all of which are normal-level producers of fibroin; J-138 (a Japanese breed), Sekko (a Chinese breed) and Turkish Yellow Cocoon (a Turkish breed). Silk fibers were prepared from ten cocoons for each breed by applying the standard procedure of degumming. The weight percentage of material removed with this procedure was 17 to 26% (Table I). The dissolved silk fibers were subjected to SDS-PAGE before and after reductive cleavage of disulfide bonds and silver staining or immunoblotting with a specific polyclonal antibody to each protein component. Although the H-chain in the degummed silk preparations were partially disintegrated (Fig. 1a, b: cf. lanes 1 and lanes 2-4; lane 5 and lanes 6-8), the disulfide linkage of the L-chain with the H-chain was maintained because a free L-chain appeared only after the reduction with 2-mercaptoethanol (Fig. 1C, lanes 5-8). Furthermore, the non-covalent association of P25 with the H-L complex was also maintained, because a free P25 appeared in the absence of 2-mercaptoethanol treatment under the conditions of SDS-PAGE (Fig. 1D, lanes 1-4). There were no signs of disintegration of the L-chain and P25, as judged from their immunoblotting patterns (Fig. 1c, d). The slightly slower electrophoretic mobility of P25 after treatment with 2-mercaptoethanol (Fig. 1d, lanes 5-8) has been interpreted as a result of the loss of a compact structure after reductive cleavage of intramolecular disulfide bonds (Tanaka *et al.*, 1999b). The N-linked oligosaccharide chains of P25 (Tanaka *et al.*, 1999b) were also maintained in the degummed silk fibers as indicated by the reaction with biotinylated Con A (Fig. 1E).

Table I. Preparation of silk fibers by degumming cocoon silk of J-138, Sekko and Turkish yellow cocoon.

Tableau I. Préparation des fibres de soie par le décreusage de la soie des cocons (J-138, Sekko et cocon turc jaune).

Breed	Weight (g)		Percent of materials lost by degumming *
	Before ^a	After ^b	
	degumming		
	Poids (g)		
	le décreusage		
Lignée	Avant ^a	Après ^b	Pourcentage de matériaux perdus avec le décreusage *
J-138	0.3169	0.2616	17.45
Sekko	0.1254	0.0924	26.32
Turkish yellow cocoon Cocon turc jaune	0.2248	0.1805	19.71

* $\{(a-b) / a\} \times 100 (\%)$

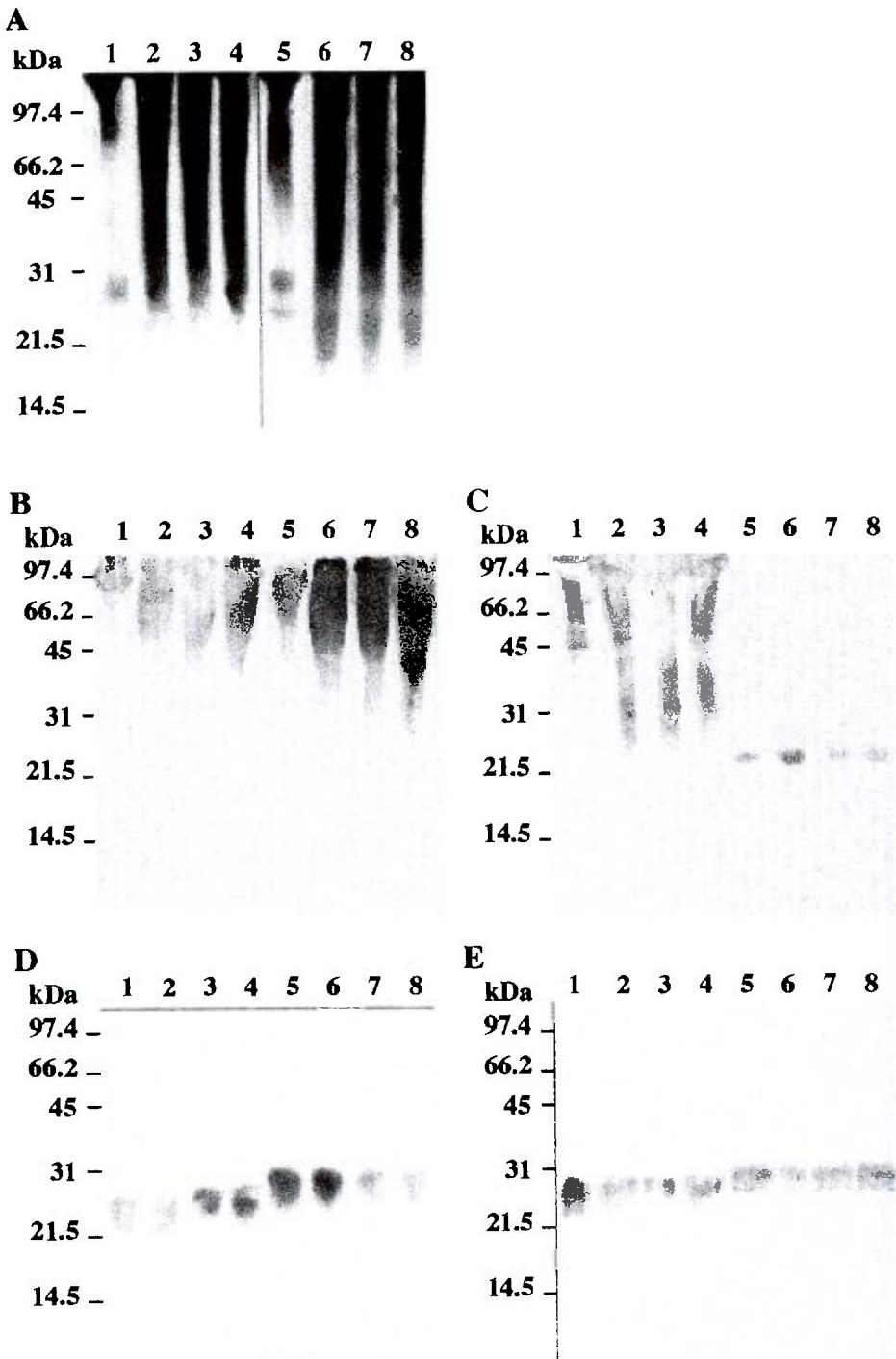


Fig. 1. SDS-PAGE, silver staining and immunoblotting of proteins in degummed silk fibers and the reaction of P25 with biotinylated Con A.

Protein samples were subjected to electrophoresis before (lanes 1 to 4) or after reduction (lanes 5 to 8) with 2-mercaptoethanol. Samples were degummed silk fibers from J-138 (lanes 2, 6), Sekko (lanes 3, 7), Turkish yellow cocoon (lanes 4, 8) and fibroin secreted into the lumen of a posterior silk gland of J-139 as a control (lanes 1, 5). Patterns of silver staining (A), immunoblotting with the anti-H-chain antibody (B), the anti-L-chain antibody (C), the anti-P25 antibody (D) and the reaction of P25 with biotinylated Con A (E) are shown.

Fig. 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS, coloration argentique et immunoempreinte des protéines des fibres de soie décreusées et réaction de P25 avec de la Con A biotinylée.

Les échantillons de protéines sont soumis à une électrophorèse avant (trajets 1 à 4) ou après réduction (trajets 5 à 8) avec du 2-mercaptoéthanol. Les échantillons sont des fibres de soie décreusées de J-138 (trajets 2, 6), de Sekko (trajets 3, 7), du cocon turc jaune (trajets 4, 8) et de fibroïne sécrétée dans la lumière de la glande séricigène postérieure de J-139 comme témoin (trajets 1, 5). Les diagrammes de coloration argentique (A), l'immunoempreinte avec l'anticorps anti-H (B), l'anticorps anti-L (C), l'anticorps anti-P25 (D) et la réaction de P25 avec la Con A biotinylée (E) sont présentés.

The solubilized degummed silk fibers were then subjected to quantitative ELISA with a specific polyclonal antibody to the H-chain, L-chain or P25 according to published procedures (Inoue *et al.*, 2000) and the results are summarized in Table II. The sum of weights of H-chain, L-chain and P25 which were determined by the quantitative ELISA was 96 to 98% of the weight of total proteins in each solubilized silk sample. These results indicated that sericin and other protein components in the cocoons were removed effectively by the degumming procedure applied. The molar ratio of the H-chain : L-chain : P25 was close to 6 : 6 : 1 for each sample, which was very similar to the ratio obtained for the fibroin secreted into the PSG lumen or for the protein samples solubilized from the cocoon shells with 60% LiSCN (Inoue *et al.*, 2000).

The present results indicate that the molecular constitution of the elementary unit of fibroin, that is H₆L₆P25₁, is maintained in the degummed silk fibers from different breeds of *B. mori*, although the conformational integrity of the elementary unit may not be fully retained because of the partial disintegration of H-chains. The reason why the molar ratio of H-chain does not decrease appreciably in spite of its partial disintegration, is most likely explained by the use of a polyclonal anti-H-chain antibody which recognizes H-chain fragments of as small as about 30 kDa (Fig. 1b). It is particularly notable that P25 molecules, which are associated with the H-L dimers by non-covalent interactions, are quantitatively retained in silk fibers after the processes of degumming. This might be caused by several reasons. The strength of the combination of hydrophobic and ionic interactions between P25 and H-chains might be strong enough and resists dissociation under the conditions of detergent concentrations, pH and temperature of the degumming solution. The P25 molecule is situated internally in the structure of elementary unit (Inoue *et al.*, 2000), and it might be denatured as such through the process of spinning from the tip of anterior silk glands, which might cause physical trapping of P25 in the denatured protein matrices.

Table II. Determination of molar ratios of H-chain, L-chain and P25 in degummed silk fibers of *B. mori* J-138, Sekko and Turkish yellow cocoon.

Tableau II. Détermination des rapports molaires de la chaîne H, de la chaîne L et de P25 chez les fibres décreusées de *B. mori* (J-138, Sekko et cocon turc jaune).

Breed	A490*			ng / 100 ng protein			pmol			Molar ratio	
	H-chain	L-chain	P25	H-chain	L-chain	P25	H-chain	L-chain	P25	H-chain:L - chain: P25	
Lignée	A490*			ng / 100 ng protéine			pmoles			Ratio molaire	
	Chaîne H	Chaîne L	P25	Chaîne H	Chaîne L	P25	Chaîne H	Chaîne L	P25		
J-138	0.677	0.375	0.168	89.2	6.6	1.3	2.55×10^{-4}	2.55×10^{-4}	4.33×10^{-3}	5.89 ± 0.08	5.89 ± 0.02 : 1
Sekko	0.684	0.377	0.166	90.1	6.6	1.3	2.57×10^{-4}	2.55×10^{-4}	4.33×10^{-3}	5.94 ± 0.08	5.88 ± 0.05 : 1
Turkish yellow cocoon Cocon turc jaune	0.669	0.371	0.164	88.1	6.5	1.3	2.52×10^{-4}	2.51×10^{-4}	4.33×10^{-3}	5.82 ± 0.14	5.80 ± 0.04 : 1

n = 6 times, / n = 6 fois.

± : standard deviation / écart type.

* Values obtained by ELISA.

Protein contents of degummed silk samples (all in 100 µl) subjected to ELISA were: 9.26 ng (for H-chain), 18.52 ng (for L-chain) and 92.6 ng (for P25)

* Valeurs obtenues par ELISA.

Teneurs en protéines des échantillons de soie décreusée (tous dans 100 µl) soumis à l'ELISA sont : 9,26 ng (pour la chaîne H), 18,52 ng (pour la chaîne L) et 92,6 ng (pour P25).

The presence of the H-chain, L-chain and P25 in the stoichiometric molar ratio may confer a unique physicochemical property on silk fibers. If this were the case, alterations of the molecular structure of L-chain and / or P25 by genetic engineering, without affecting their essential features required for assembling the elementary unit, may give some additional features to silk fibers. In this view, it would be intriguing to point out that fibroins produced by Saturniidae silkworms are an H-H dimer and lack both an L-chain and P25. The number of potential N-glycosylation sites in P25 is two in *Papilio xuthus*, *Dendrolimus spectabilis* and *Galleria mellonella* (the waxmoth) (Zurovec *et al.*, 1998; Tanaka and Mizuno, 2001) instead of three sites in *B. mori*. Thus the molar ratio of the H-chain, L-chain and P25 in their elementary units may not be 6:6:1, if we assume that the three N-linked oligosaccharide chains of P25 are required to hold six sets of H-L dimers in the elementary units of *B. mori* (Tanaka and Mizuno, 2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Mary A. Becker (CREST, Japan Science and Technology Corp.) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- CHEVILLARD M., COUBLE P., PRUDHOMME J.-C. (1986a) Complete nucleotide sequence of the gene encoding the *Bombyx mori* silk protein P25 and predicted amino acid sequence of the protein. *Nucleic Acids Res.*, 14, 6341-6342.
- CHEVILLARD M., DELEAGE G., COUBLE P. (1986b) Amino acid sequence and putative conformational characteristics of the P25 silk protein of *Bombyx mori*. *Sericologia* 26, 435-449.
- GAMO T., SATO S. (1985) Ultrastructural study of the posterior silk gland in the *Nd*, *Nd-s* and *Nd-s^D* mutants with a defect of fibroin synthesis. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 54, 412-419.
- INOUE S., TANAKA K., ARISAKA F., KIMURA S., OHTOMO K., MIZUNO S. (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.*, 275, 40517-40528.
- MORI K., TANAKA K., KIKUCHI Y., WAGA M., WAGA S., MIZUNO S. (1995) Production of a chimeric fibroin light-chain polypeptide in a fibroin secretion-deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 251, 217-228.
- SHIMURA K., KIKUCHI A., KATAGATA Y., OHTOMO K. (1982) The occurrence of small component proteins in the cocoon of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51, 20-26.
- TANAKA K., KAJIYAMA N., ISHIKURA K., WAGA S., KIKUCHI A., OHTOMO K., TAKAGI T., MIZUNO S. (1999a) Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1432, 92-103.
- TANAKA K., INOUE S., MIZUNO S. (1999b) Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 269-276.
- TANAKA K. & MIZUNO S. (2001) Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* are present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 665-677.
- YAMAGUCHI K., KIKUCHI Y., TAKAGI T., KIKUCHI A., OYAMA F., SHIMURA K., MIZUNO S. (1989) Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.*, 210, 127-139.
- ZHOU C.-Z., CONFALONIERI F., MEDINA N., ZIVANOVIC Y., ESNAULT C., YANG T., JACQUET M., JANIN J., DUGUET M., PERASSO R., LI Z.-G. (2000) Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.*, 28, 2413-2419.
- ZUROVEC M., KODRIK D., YANG C., SEHNAL F., SCHELLER K. (1998) The P25 component of *Galleria* silk. *Mol. Gen. Genet.*, 257, 264-270.

LES FIBRES DE SOIE DECREUSEES DE *BOMBYX MORI* SONT CONSTITUEES PAR LA CHAINE H, LA CHAINE L ET PAR P25 (FIBROHEXAMERINE) DANS UN RAPPORT MOLAIRE 6 : 6 : 1

S. INOUE^{1,2}, H. TSUDA^{2,3}, H. TANAKA², Y. MAGOSHI² & S. MIZUNO^{1,4*}

1. Laboratory of Molecular Biology, Department of Molecular and Cell Biology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori – Aramiamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japon.

2. National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.

3. Division of Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japon Science and Technology Corporation.

4. Department of Agricultural and Biological Chemistry, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kamcino, Fujisawa 252-8510, Japon.

Les fibres de soie décreusées sont préparées à partir de cocons de trois différentes lignées de Bombyx mori : J-138, Sekko et un cocon turc jaune, en utilisant une procédure de décreusage standard. Ces matériaux sont constitués de chaînes H, de chaînes L et de P25 (fibrohexamérine) partiellement désintégrés, dans lesquels la liaison disulfure entre les chaînes H et L, les interactions non-covalentes de P25 avec la chaîne H et avec les chaînes N-oligosaccharidiques sont maintenues. Le test ELISA quantitatif avec des anticorps polyclonaux spécifiques montre que le ratio molaire pour la chaîne H, la chaîne L et P25 dans les fibres de soie décreusées est proche de 6 : 6 : 1, ce qui suggère que la composition moléculaire de l'unité élémentaire de fibroïne [Inoue et coll., J. Biol. Chem. 275 : 40517-40528 (2000)] est maintenue dans les fibres de soie commerciale.

INTRODUCTION

La fibroïne de soie sécrétée dans la lumière de la glande séricigène postérieure (PSG) de *Bombyx mori* est constituée par trois composants protéiques : une chaîne H (environ 350 kDa ; Shimura et coll., 1982 ; Zhou et coll., 2000), une chaîne L (26 kDa ; Yamaguchi et coll., 1989) et une glycoprotéine P25 (30 kDa ; Chevillard et coll., 1986a, b). Le test ELISA quantitatif avec un anticorps spécifique pour chaque composant protéique montre que le ratio molaire chaîne H : chaîne L : P25 est de 6 : 6 : 1 pour la fibroïne sécrétée dans la lumière de la glande séricigène postérieure (PSG) et pour les protéines solubles dans le LiSCN à 60 % des coques soyeuses. Par la suite, un ensemble de protéines de 2,3 Mda constitué par la chaîne H, la chaîne L et P25 avec un ratio molaire de 6 : 6 : 1 a été isolé des cellules de la glande séricigène postérieure (PSG) (Inoue et coll., 2000). On a suggéré que cet ensemble, désigné comme une unité élémentaire de fibroïne, est composé par six ensembles de dimères H-L entourant une molécule unique P25 et sa structure complexe est maintenue par des interactions hydrophobiques et des liaisons hydrogènes entre les chaînes H et P25. On a suggéré que les chaînes oligosaccharidiques liées à P25 sont impliquées dans les dernières interactions (Inoue et coll., 2000). Compte tenu du rôle central de P25 dans le maintien de la structure de l'unité élémentaire, on a proposé de donner le nom fonctionnel de *fibrohexamérine* à P25 (Inoue et coll., 2000).

La liaison disulfure entre Cys-172 de la chaîne-L et Cys-e20 (vingtième résidu à partir du C terminal) de la chaîne H (Tanaka et coll., 1999a) n'est pas responsable du maintien de l'unité élémentaire qui s'est formée auparavant (Inoue et coll., 2000). Mais la liaison H-L est essentielle pour la production en masse de la fibroïne (Mori et coll., 1995) parce que la fibroïne est retenue dans le reticulum endoplasmique (ER) en l'absence de liaison disulfure entre les chaînes H et L (Gamo et Sato, 1985). Le type de fibroïne à trois composants (chaîne H, chaîne L et P25) semble être assez courant chez les différents insectes Lépidoptères qui produisent de la soie bien qu'on ait suggéré que la fibroïne des espèces de Saturniidae soit sécrétée comme un dimère de la chaîne H (Tanaka et Mizuno, 2001).

Dans cette étude, nous avons cherché à analyser le rapport molaire de la chaîne H, de la chaîne L et de P25 dans les fibres de soie qui ont été préparées en suivant les procédés conventionnels de décreusage dans des conditions alcaline chaudes. Compte tenu de la nature non-covalente de l'association de P25 dans l'unité élémentaire (Tanaka et coll., 1999b ; Inoue et coll., 2000), il se pourrait que P25 soit dissocié pendant les processus de décreusage et que sa teneur stochiométrique dans les fibres de soie qui restent soit altérée de manière significative. Nous avons préparé des fibres de soie décreusées à partir de cocons de trois différentes lignées de *B. mori* et déterminé le ratio molaire chaîne H, chaîne L et de P25 au moyen d'un ELISA quantitatif.

MATERIELS ET METHODES

Cocons *Bombyx mori* :

Les cocons de trois lignées de *B. mori* produisant de la fibroïne à un niveau normal, J-138, Sekko et un cocon ture jaune sont obtenus auprès du National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Japon.

Préparation des fibres de soie décreusées :

La soie du cocon est traitée dans une solution de décreusage [0,4 g / l CLEWAT-K (Teikoku Chemical Industry), 10 g / l de savon de Marseilles] pendant 2 h à 95° C, rincée dans de l'eau distillée à 35° C trois fois et puis une fois dans de l'eau distillée froide. Le matériel est conservé à 45° C pendant 3h, puis séché à 20° C, avec une humidité relative à 65 % pendant trois jours. La quantité de matériel perdu pendant l'opération est calculée comme un pourcentage du poids de la fibre avant et après le décreusage.

Immuno empreinte :

Les fibres de soie décreusées sont dissoutes dans du LiSCN à 60 % à une concentration de 10 mg / ml et dialysées deux fois contre 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), urée 5 M. Un aliquot de 1,5 µl (15 µg) est soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5 % (SDS-PAGE) dans du dodécylsulfate de sodium à 0,1 % (SDS) avant ou après la réduction des liaisons disulfure avec du 2-mercaptoéthanol à 1 %. Pour les échantillons réduits, du 2-mercaptoéthanol à 1 % est aussi inclus dans le gel de polyacrylamide. L'immunoempreinte avec l'anticorps polyclonal de lapin contre la chaîne H, l'anticorps de lapin polyclonal contre la chaîne L ou avec l'anticorps polyclonal de souris contre P25 (qui sont tous purifiés par affinité avec l'antigène correspondant et caractérisés comme spécifique de l'antigène), est réalisée en suivant la procédure de Inoue et coll., (2000).

Test ELISA quantitatif :

La teneur totale en protéines d'une solution échantillon utilisée pour l'immunoempreinte est déterminée avec un dosage de protéines (Bio-Rad). La poudre d'immunoglobuline G de lapin (IgG ; Sigma) est soigneusement pesée pour préparer des solutions de 10-150 µg / ml utilisées pour préparer une courbe standard. Une portion de solution échantillon est diluée avec 20mM de Tris-HCl (pH 8,0),

2 M urée pour constituer un volume de 100 μ l (Tableau II) et soumise à un ELISA quantitatif de la chaîne H, la chaîne L ou de P25 d'après les descriptions précédentes (Inoue et coll., 2000).

RESULTATS ET DISCUSSION

Pour analyser les ratios molaires de la chaîne H, de la chaîne L et de P25 dans les fibres de soie décreusées, nous avons choisi des cocons de trois lignées différentes de *B. mori*, qui sont tous producteurs de fibroïne à un niveau normal : J-138 (une lignée japonaise), Sekko (une lignée chinoise) et un cocon jaune ture (une lignée turque). Les fibres de soie sont préparées à partir de dix cocons de chaque lignée en utilisant la procédure standard de décreusage. Le pourcentage du matériau perdu avec cette procédure en poids est de 17 à 26 % (Tableau I). Les fibres de soie dissoutes sont soumises à une SDS-PAGE avant et après la réduction des liaisons disulfure et la coloration à l'argent ou l'immunoempreinte avec un anticorps polyclonal spécifique à chaque composant protéique. Bien que la chaîne H dans les préparations de soie décreusée soit partiellement désintégrée (Fig. 1a, b : cf. trajet 1 et trajets 2-4 ; trajet 5 et trajets 6-8), la liaison disulfure de la chaîne L avec la chaîne H est maintenue parce qu'une chaîne-L libre apparaît seulement après la réduction avec du 2-mercaptoéthanol (Fig. 1 C, trajets 5-8). De plus, l'association non-covalente de P25 avec l'ensemble H-L est aussi maintenue, puisqu'un P25 libre apparaît en l'absence de traitement avec du 2-mercaptoéthanol en SDS-PAGE (Fig. 1D, trajets 1-4). Il n'y a pas de signe de désintégration de la chaîne L et de P25, d'après leurs immuno-empreintes (Fig. 1c, d). La mobilité électrophorétique légèrement plus lente de P25 après le traitement avec du 2-mercaptoéthanol (Fig. 1d, trajets 5-8) a été interprétée comme le résultat de la perte de la structure compacte après la division réductrice des liaisons disulfure intramoléculaires (Tanaka et coll., 1999b). Les chaînes oligosaccharide de P25 liées à N (Tanaka et coll., 1999b) sont aussi maintenues dans les fibres de soie décreusées comme l'indique la réaction avec la Con A biotinylée (Fig. 1E).

Les fibres de soie décreusées solubilisées sont ensuite soumises à un ELISA quantitatif avec un anticorps polyclonal spécifique à la chaîne H, à la chaîne L ou à P25 selon les procédures qui ont été publiées (Inoue et coll., 2000) et les résultats sont présentés dans le Tableau II. La somme des poids de la chaîne H, de la chaîne L et de P25 qui est déterminée avec un ELISA quantitatif représente 96 à 98 % du poids des protéines totales dans chaque échantillon de soie solubilisée. Ces résultats indiquent que la sérécine et les autres composants protéiques des cocons sont retirés de manière efficace avec la procédure de décreusage utilisée. Le rapport molaire chaîne-H : chaîne L : P25 est proche de 6 : 6 : 1 pour chaque échantillon, ce qui est très similaire au ratio obtenu pour la fibroïne sécrétée dans la lumière de la glande sérécigène postérieure ou pour les échantillons de protéines solubilisées avec 60 % de LiSCN provenant des coques soyeuses (Inoue et coll., 2000).

Ces résultats indiquent que la constitution moléculaire de l'unité élémentaire de la fibroïne, en l'occurrence H₆L₆P25₁, est maintenue dans les fibres de soie décreusées provenant de différentes lignées de *B. mori* bien que l'intégrité conformationnelle de l'unité élémentaire ne soit pas complètement maintenue à cause de la désintégration partielle des chaînes H. La raison pour laquelle le rapport molaire de la chaîne H ne baisse pas de manière appréciable malgré sa désintégration partielle, s'explique très probablement par l'utilisation d'un anticorps polyclonal contre la chaîne H qui reconnaît des fragments de la chaîne H très petits, à partir de 30 kDa (Fig. 1b). Il est particulièrement notable que les molécules P25, qui sont associées aux dimères H-L par des interactions non-covalentes, sont quantitativement retenues dans les fibres de soie après les processus de décreusage. Cela peut être dû à plusieurs raisons. La force de la combinaison des interactions hydrophobique et ionique entre P25 et les chaînes H pourrait être assez puissante et résister à la dissociation dans les conditions de concentrations en détergeant, de pH et de température de la solution de décreusage. La molécule P25 est située à l'intérieur de la structure de l'unité élémentaire (Inoue et coll., 2000) et elle pourrait être dénaturée en tant que telle par l'opération de filage à partir de

l'extrémité des glandes séricigènes antérieures, ce qui pourrait piéger physiquement P25 dans les matrices de protéines dénaturées.

La présence de la chaîne H, de la chaîne L et de P25 dans le rapport molaire stoichiométrique pourrait conférer une propriété physico-chimique unique aux fibres de soie. Si c'était le cas, des altérations de la structure moléculaire de la chaîne L et / ou de P25 grâce au génie génétique, pourraient donner des caractères supplémentaires aux fibres de soie sans affecter leurs traits essentiels nécessaires à l'assemblage de l'unité élémentaire. A cet égard, il est étonnant de remarquer que les fibroïnes produites par les vers à soie Saturniidae sont des dimères H-H et n'ont pas de chaîne L et de P25. Il y a deux sites de N-glycosylation potentiels dans P25 chez *Papilio xuthus*, *Dendrolimus spectabilis* et *Galleria mellonella* (la teigne des ruches) (Zurovcc et coll., 1998 ; Tanaka et Mizuno, 2001) au lieu de trois sites comme chez *B. mori*. Ainsi, le rapport molaire chaîne H, chaîne L et P25 dans leurs unités élémentaires pourrait ne pas être 6 : 6 1, si nous partons du principe que les trois chaînes d'oligosaccharides de P25 N liées sont nécessaires pour contenir six lots de dimères H-L dans les unités élémentaires de *B. mori* (Tanaka et Mizuno, 2001).

EFFECT OF METHOPRENE AND MH ALONE AND IN COMBINATION ON THE ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE POSTERIOR SILKGAND OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUNGEN & D. BHARATHI

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

The effect of methoprene and molting hormone alone and in combination on the ultrastructural changes of the posterior silk gland and biosynthesis of fibroin during 6th day of the 5th instar silkworm larva was studied. In the posterior part of the silk gland, the columnar fibroin located in the lumen consists of numerous spherical masses of molecular fibroin fibers. Rough endoplasmic reticulum (ER), Golgi complexes (GC) and mitochondria distribute randomly in the cytoplasm of the cells. Rough endoplasmic reticulum is circular or lamellar or irregular in shape. Fibroin synthesized in posterior silk gland cells was secreted and stored more in the gland lumen in combination of methoprene and MH treated larvae than in methoprene and MH alone treated larvae. On sixth day of the fifth larval instar, the biosynthesis of fibroin proceeds at a maximum rate and utilizes the cellular structures of early stage of fifth instar. The biosynthesis of fibroin secreted in the gland lumen was more in experimental larvae than in the control.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., fibroin, methoprene, MH, endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, Golgi complex.

INTRODUCTION

During the larval instars, the posterior silk glands develop much more than the middle silk gland. The posterior silk gland cells secrete fibroin and the middle silk gland secretes two types of sericin (Oba, 1958). Silk fibroin synthesized in the posterior silk gland cells is secreted and stored in the gland lumen, and finally is spun through the spinneret as a cocoon filament (Akai, 1976; 1984). Fibroin, which is the most important silk protein with a simple amino acid composition; it is rich in glycine, alanine, serine and tyrosine (Kirimura and Suzuki, 1962). It was confirmed that molecular fibroin fibres synthesized on polyosomes in the posterior silk gland cells are concentrated in Golgi complexes and the fibroin globules are released into the silk layer by exocytosis. Finally, these elementary fibroin fibres combine in an unorganised manner to form a spherical mass of fibroin fibres (MFF).

In this report, we investigated the effect of methoprene and molting hormone alone and in combination on the ultrastructural changes of the posterior silk gland cells of silkworm, *Bombyx mori* L. to know the mechanism of biosynthesis of fibroin.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals:

The larvae used were hybrid silkworms: Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese), supplied by Sericultural Department of Zhejiang Agricultural Bureau. The silkworms were reared on fresh mulberry leaves at 24° C - 28° C under 12L: 12D photoperiod. After the fourth molt, the larvae were separated into three groups. Each group consisted of three replications, each of 125 larvae for each treatment.

Application of juvenile hormone analogue (methoprene):

Juvenile hormone analogue, (methoprene) was dissolved in acetone to make 20 mg/l solution. The solution was sprayed on the silkworm body at the 3rd day of the 5th instar at the rate of 1.5 μ g/larva. The control silkworm larvae were sprayed with acetone.

The larvae were dissected on 6th day of the 5th instar and used for the experiment in triplicate.

Application of molting hormone analogue (MH-III-Phytoecdysone):

One vial (1 ml) of molting hormone analogue, (MH-III, phytoecdysone) solution was dissolved in water to make 10 mg/l solution. MH solution was sprayed on mulberry leaves and fed to silkworms during 96-120 hrs of the fifth instar at the rate of 2 μ g/larva. The control silkworm larvae were sprayed with distilled water. After treatment, a standard rearing method was practised till spinning.

The larvae were dissected during 6th day of the 5th instar. Each experiment was performed in triplicate.

Application of combination of methoprene and MH:

Juvenile hormone analogue (methoprene) was dissolved in acetone to make 20 mg/l solution. The solution was sprayed on the silkworm body during 3rd day of 5th instar at the rate of 1.5 μ g/larva. For these larvae, the mulberry leaf fortified with molting hormone analogue (MH-III) was given during 96-120 hrs of the 5th instar at the rate of 2 μ g/larva. Leaves were sprayed with distilled water and are fed to the control silkworm larvae. After treatment, a standard rearing method was practised till spinning. The larvae were dissected on 6th day of the 5th instar and the posterior silk glands were used for studying the ultrastructure. Each experiment was performed in triplicate.

Electron microscopic study:

For electron microscopic study, the posterior silk glands of silkworm were dissected from the control and experimental larvae in cold physiological saline solution and kept in 2.5% glutaraldehyde at 4°C. Following 1h of fixation at room temperature, the tissues were rinsed in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, and post fixed in O₃O₄ (1% in phosphate buffer, W/V) for 2hrs. The tissues were rinsed again in phosphate buffer and dehydrated in graded ethanol, embedded in Epon 812. Thin sections (50 nm) were cut with LKB diamond knife and stained with 5% uranyl acetate and 2.6% lead citrate for 6-7 minutes (Sato, 1968). The electron microscopic observation was performed with Jem-1200 EX electron microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

The nuclei ramify and penetrate deeply into the cytoplasmic area in the cell during the 5th larval instar. The nucleus contains large numbers of nucleoli and chromatin bodies indicating that the cells continue endomitosis during its larval stage and part of the nucleolar material appears to be transferred into the cytoplasm passing through the nuclear membrane, another indication of the active communication between nucleus and cytoplasm. Such an ultrastructural phenomenon can frequently be seen in the posterior silk gland of *Bombyx mori* (Akai, 1964 and Tashiro *et al.*, 1968).

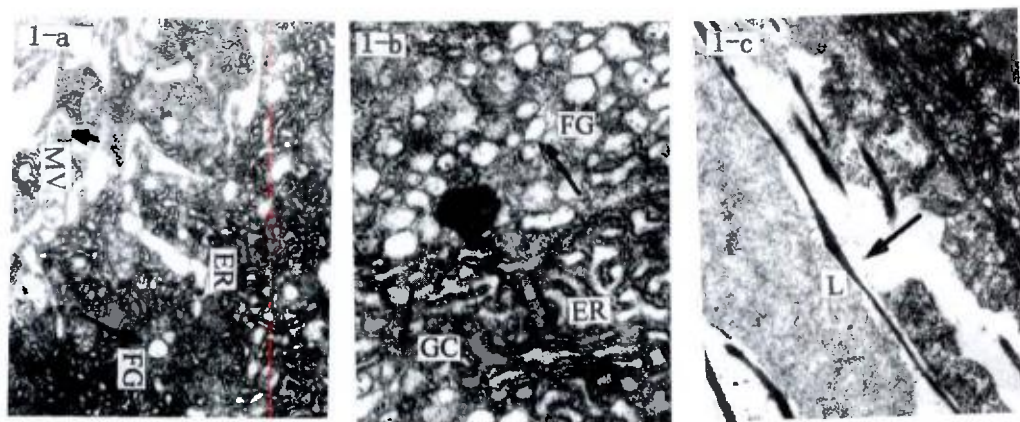


Fig. 1. Ultrastructure of posterior silk gland cell of the 6th day of the 5th instar silkworm larva of *Bombyx mori* L. (Control).

1-a: Part of cytoplasm near outer membrane of posterior silk gland cell (7500 ×). Microvilli (MV); Endoplasmic reticulum (ER); Fibroin globules (FG).

1-b: Part of cytoplasm of middle layer of posterior silk gland cell (20000 ×). Endoplasmic reticulum (ER); Fibroin globules (FG); Golgi complexes (GC).

1-c: Part of cytoplasm near inner layer of posterior silk gland cell (7500 ×). Lumen (L).

Fig. 1. Ultrastructure de la glande séricigène postérieure le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge chez la larve de ver à soie de *Bombyx mori* L. (Témoin)

1-a : Partie du cytoplasme près de la membrane extérieure de la cellule de la glande séricigène postérieure (7500 ×). Microvilli (MV); Reticulum endoplasmique (ER); Globules de fibroïne (FG).

1-b: Partie du cytoplasme de la couche médiane de la cellule de la glande séricigène postérieure (20000 ×). Reticulum endoplasmique (ER); Globules de fibroïne (FG); Appareil de Golgi (GC).

1-c : Partie du cytoplasme près de la couche intérieure de la cellule de la glande séricigène postérieure (7500 ×). Lumière (L).

Mitochondria distribute randomly in the cytoplasm of the cells. Rough endoplasmic reticulum shows various shapes during the last larval instar (Fig 1-a). Rough endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complexes (GC) are well developed in the cytoplasm during 6th day of 5th instar (Fig 1-b). It is sparsely scattered in sand like form only in the cytoplasm. These strands quickly develop into lamellar, concentric-circular, and irregular shapes (Akai *et al.*, 1986).

Golgi complexes also developed throughout the cytoplasm connecting to the rough endoplasmic reticulum in the posterior silk gland treated with methoprene on 3rd day of the 5th instar. During 6th day of the 5th instar, small numbers of molecular fibroin fibres can be seen in Golgi complexes in the posterior silk gland cell. These become fibroin globules which are densely packed with elementary fibroin fibres and then released from Golgi complexes (Fig 2b). The fibroin globules accumulated in the apical cytoplasmic region and the elementary fibroin fibres are released into the lumen by exocytosis (Fig 2-c).

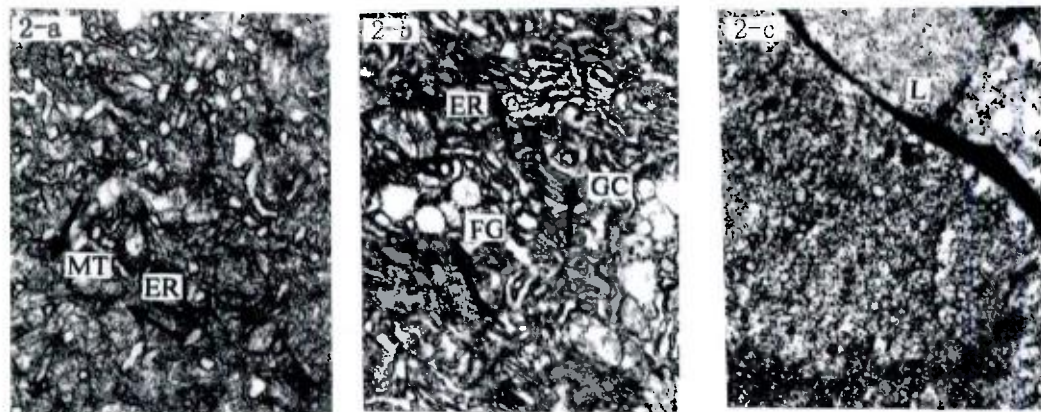


Fig. 2. Ultrastructure of posterior silk gland cell of the 6th day of the 5th instar silkworm larva of *Bombyx mori* L. (Methoprene treatment during 3rd day of 5th instar)

2-a: Part of cytoplasm near outer membrane of posterior silk gland cell (12000 ×). Microvilli (MV); Endoplasmic reticulum (ER); Mitochondria (MT);

2-b: Part of cytoplasm of middle layer of posterior silk gland cell (12000 ×). Endoplasmic reticulum (ER); Fibroin globules (FG); Golgi complexes (GC).

2-c: Part of cytoplasm near inner layer of posterior silk gland cell (12000 ×). Lumen (L)

Fig. 2 : Ultrastructure de la cellule de la glande séricigène postérieure le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge chez la larve du ver à soie *Bombyx mori* L. (Traitement au méthoprène pendant le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge).

2-a : Partie du cytoplasme près de la membrane extérieure de la cellule de la glande séricigène postérieure (12000 ×). Microvilli (MV); Réticulum endoplasmique (ER); Mitochondries (MT).

2-b : Partie du cytoplasme de la couche médiane de la cellule de la glande séricigène postérieure (12 000 ×). Réticulum endoplasmique (ER); Globules de fibroïne (FG); Appareil de Golgi (GC).

2-c : Partie du cytoplasme près de la couche interne de la cellule de la glande séricigène (12 000 ×). Lumière (L).

The lumen of the posterior silk gland is filled with a large quantity of liquid silk material of two types, masses of numerous irregular fibroin fibers (Fig 2-c and 3-c). This was in consonance with the earlier reports (Akai and Kataoka, 1978; Kataoka and Akai, 1979 and Akai *et al.*, 1987).

The newly synthesized fibroin appears rapidly in the glandular lumen after administration of methoprene and MH alone or in combination, showed that an increase in the biosynthesis of fibroin will result in an increase in the total amount of luminal fibroin (Fig. 2, 3 and 4).

Synthesis of molecules of fibroin fibers in posterior silk gland cells is more in experimental larvae when compared to control larvae (Fig. 1, 2, 3 and 4). This fibroin is secreted and stored in the gland lumen and finally spun through spinneret as cocoon filament. The molecular fibroin fibers synthesized

on ribosomes in the posterior silk gland cells are concentrated in Golgi complex and the fibroin globules are released into the silk layer by exocytosis. In control and methoprene treated silkworm larvae, the posterior silk gland cells have clear endoplasmic reticulum (ER) and the fibroin globules (FG) are stored in the cytoplasm (Fig 1 and 2). This result suggests that the silk gland cells of control and methoprene treated silkworm larvae have active fibroin synthesis and have no secretion on 6th day of 5th instar.

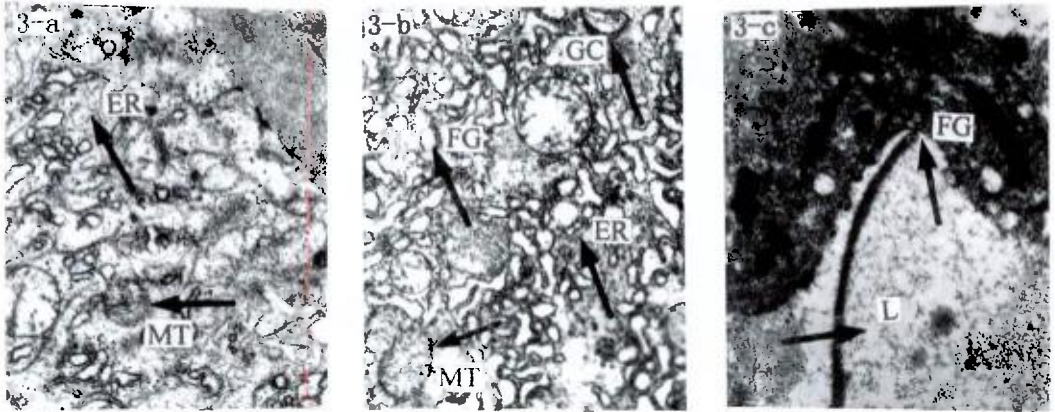


Fig. 3. Ultrastructure of posterior silk gland cell during 6th day of the 5th instar silkworm larva of *Bombyx mori* L. (MH treatment during 96-120 hrs of 5th instar).

3-a. Part of cytoplasm near outer membrane of posterior silk gland cell (12000 ×). Endoplasmic reticulum (ER); Mitochondria (MT);

3-b. Part of cytoplasm of middle layer of posterior silk gland cell (12000 ×). Endoplasmic reticulum (ER); Mitochondria (MT); Fibroin globules (FG); Golgi complexes (GC).

3-c. Part of cytoplasm near inner layer of posterior silk gland cell (6000 ×). Fibroin globules (FG); Lumen (L).

Fig 3. Ultrastructure de la cellule de la glande séricigène postérieure pendant le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge chez la larve du ver à soie *Bombyx mori* L. (traitement MH pendant 96 à 120 h pendant le 5^{ème} âge).

3-a. Partie du cytoplasme près de la membrane externe de la cellule de la glande séricigène postérieure (12000 ×). Reticulum endoplasmique (ER) ; Mitochondries (MT);

3-b. Partie du cytoplasme de la couche médiane de la cellule de la glande séricigène (12000 ×). Reticulum endoplasmique (ER); Mitochondries (MT); Globules de fibroïne (FG) ; Appareil de Golgi (GC).

3-c. Partie du cytoplasme près de la couche interne de la cellule de la glande séricigène postérieure (6000 ×). Globules de fibroïne (FG); Lumière (L).

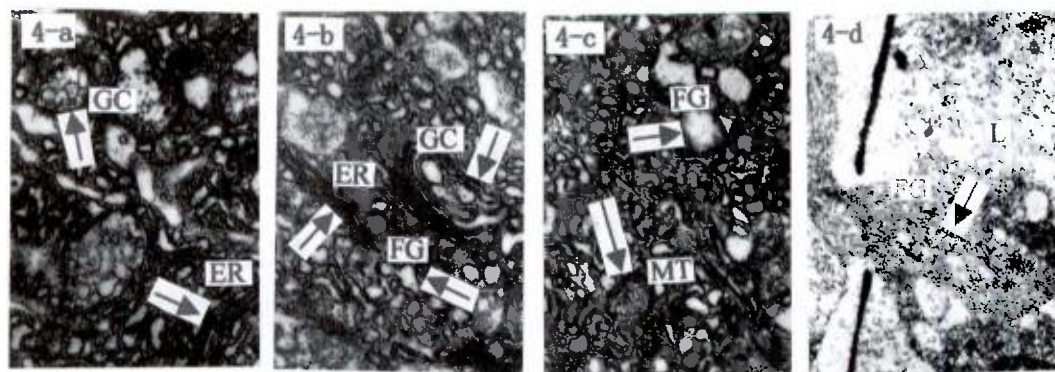


Fig. 4. Ultrastructure of posterior silk gland cell during 6th day of 5th instar silkworm larva of *Bombyx mori* L. (Combination of methoprene and MH).

4-a: Part of cytoplasm near outer membrane of posterior silk gland cell (12000 x). Endoplasmic reticulum (ER); Golgi complexes (GC).

4-b: Part of cytoplasm of middle layer of posterior silk gland cell (12000 x). Endoplasmic reticulum (ER); Fibroin globules (FG); Golgi complexes (GC).

4-c: Part of cytoplasm of middle layer of posterior silk gland cell (12000 x). Mitochondria (MT); Fibroin globules (FG).

4-d: Part of cytoplasm near inner layer of posterior silk gland cell (7500 x). Lumen (L); Fibroin globules (FG).

Fig. 4. Ultrastructure de la cellule de la glande séricigène postérieure chez la larve de ver à soie *Bombyx mori* du 5^{ème} âge. (Traitée par méthoprene et HM en combinaison).

4-a: Partie du cytoplasme près de la membrane extérieure de la cellule de la glande séricigène postérieure (12000 x). Reticulum endoplasmique (ER); Appareil de Golgi (GC).

4-b: Partie du cytoplasme de la couche médiane de la cellule de la glande séricigène postérieure (12000 x). Reticulum endoplasmique (ER); Globules de fibroïne (FG); Appareil de Golgi (GC).

4-c: Partie du cytoplasme de la couche médiane de la cellule de la glande séricigène postérieure (12000 x). Mitochondries (MT); Globules de fibroïne (FG).

4-d: Partie du cytoplasme près de la couche intérieure de la cellule de la glande séricigène (7500 x). Lumière (L), Globules de fibroïne (FG).

But there are few fibroin globules (FG) stored in the silk gland cells of MH and combination of methoprene and MH treated silkworm larvae and the clear secretion phenomenon can be found on 6th day of 5th instar (Fig. 3 and 4). It implies that the MH and combination of methoprene and MH treated silkworms of 96-120 hrs of 5th instar will initiate the synthesis of fibroin protein earlier and shorten the duration of larvae.

REFERENCES

- AKAI H. (1964) Micromorphological changes of the glandular cell in the posterior division of the silk gland during the 5th larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Seric. Exp. Sta., 18: 474-511.
- AKAI H. (1976) The silk gland: in ultrastructural morphology of insect. University of Tokyo press, Tokyo (Japanese) pp: 57-114.
- AKAI H. & KATAOKA K. (1978) Fine structure of liquid fibroin in the posterior silk gland of *Bombyx mori* larvae. J. Seric. Sci. Jpn., 47: 273-278.
- AKAI H., IMAI T. & TSUBOUCHI K. (1987) Fine structural changes of liquid silk in the silk gland during the spinning stage of *Bombyx mori* larvae. J. Seric. Sci. Jpn., 56: 131-137.
- KATAOKA K. & AKAI H. (1979) Histological changes of liquid fibroin in the silk gland. J. Seric. Sci. Jpn., 48: 171-176.
- KIRIMURA J. & SUZUKI N., (1962), Bull. Agric. Chem., Soc. Japan, 36: 265-336.
- OBA H. (1958) Studies on the secretion of liquid silk in two lepidopterous insects, *Philosamia ricini* (Boisd) and *Antheraea Pernyi*. J. Seric. Sci. Jpn., 27: 303-311.
- SATO T. (1968) A modified method for lead staining of thin sections. J. Electron Micr., 17: 157-159.
- TASHIRO Y., MATSUMURA S., MORIMOTO & NAGATA S. (1968) Extrusion of nuclear materials into the posterior silk glands of silkworm, *Bombyx mori* J. Cell Bio., 36: C5.

EFFET DU METHOPRENE ET DE L'HORMONE DE MUE SEULS ET EN COMBINAISON SUR LES CHANGEMENTS ULTRASTRUCTURAUX DANS LA GLANDE SERICIGENE POSTERIEURE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUNGEN & D. BHARATHI

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

Nous avons étudié l'effet du méthoprene et de l'hormone de mue seuls et en combinaison sur les changements ultrastructuraux de la glande séricigène postérieure et sur la biosynthèse de la fibroïne au cours du 6^{ème} jour chez la larve de ver à soie du 5^{ème} âge. Dans la partie arrière de la glande séricigène, la fibroïne colonnaire située dans la lumière est constituée de nombreuses masses sphériques de fibres de fibroïne moléculaire. Le réticulum endoplasmique rugueux (ER), les complexes Golgiens (GC) et les mitochondries sont distribués au hasard dans le cytoplasme des cellules. Le réticulum endoplasmique rugueux est circulaire ou lamellaire ou de forme irrégulière. La fibroïne synthétisée dans les cellules de la glande séricigène postérieure est sécrétée et stockée en plus grande quantité dans la lumière chez les larves traitées avec une combinaison de méthoprene et d'HM que chez les larves traitées avec seulement du méthoprene ou de l'HM. Le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge, la biosynthèse de la fibroïne se produit à un taux maximum et elle utilise les structures cellulaires du début du cinquième âge. La biosynthèse de la fibroïne sécrétée dans la lumière de la glande est plus importante chez les larves d'expérimentation que chez les témoins.

INTRODUCTION

Au cours des âges larvaires, la partie postérieure des glandes séricigènes se développe beaucoup plus que la partie médiane. Les cellules de la partie postérieure sécrètent de la fibroïne et celles de la partie médiane sécrètent deux types de séricine (Oba, 1958). La fibroïne de soie synthétisée dans la glande séricigène postérieure est sécrétée et stockée dans la lumière de la glande et est finalement filée par la filière sous la forme d'un filament de cocon (Akai, 1976 : 1984). La fibroïne, qui est la protéine de soie la plus importante avec une composition simple en acides aminés est riche en glycine, alanine, sérine et tyrosine (Kirimura et Suzuki, 1962). Il a été confirmé que les fibres de fibroïne moléculaire synthétisées sur les polysomes dans la glande séricigène postérieure sont concentrées dans les appareils de Golgi et que les globules de fibroïne sont libérés dans la couche de soie par exocytose. Finalement, ces fibres de fibroïne élémentaires se combinent d'une manière désorganisée pour former une masse sphérique de fibres de fibroïne (MFF).

Dans ce rapport, nous avons étudié l'effet du méthoprene et de l'hormone de mue seuls et en combinaison sur les changements ultrastructuraux dans les cellules de la glande séricigène postérieure, de *Bombyx mori* L. pour connaître le mécanisme de la biosynthèse de la fibroïne.

MATERIELS ET METHODES

Animaux d'expérimentation :

Les larves utilisées sont des vers à soie hybrides : Jufang (Chinois) × Chenxin (Japonais), fournis par le Département Séricicole du Bureau Agricole de Zhejiang. Les vers à soie sont élevés sur des feuilles de mûrier fraîches à 24° C - 28° C avec une photopériode de 12L : 12J. Après la quatrième mue, les larves sont séparées en trois groupes. Chaque groupe est constitué de trois répétitions, contenant 125 larves chacune pour chaque traitement.

Application de l'analogue d'hormone juvénile (méthoprène) :

L'analogue d'hormone juvénile (méthoprène) est dissout dans de l'acétone pour obtenir une solution à 20 mg / l. La solution est vaporisée sur le corps du ver à soie le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge au taux de 1,5 µg / larve. Les larves de ver à soie témoins sont vaporisées avec de l'acétone.

Les larves sont disséquées le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge et utilisées pour l'expérience.

Application de l'analogue d'hormone de mue (HM-III-Phytoecdysone) :

Un flacon (1 ml) de solution d'analogue d'hormone de mue, (HM-III, phytoecdysone) est dissout dans de l'eau pour obtenir une solution à 10 mg / l. La solution HM est vaporisée sur les feuilles de mûrier qui sont données en nourriture aux vers à soie pendant 96 à 120 heures au 5^{ème} âge au taux de 2 µg / larve. Les larves de ver à soie témoins sont vaporisées avec de l'eau distillée. Après le traitement, on adopte une méthode d'élevage standard jusqu'au filage.

Les larves sont disséquées pendant le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge. Chaque expérience est triplée.

Application de la combinaison de méthoprène et d'HM :

L'analogue d'hormone juvénile (le méthoprène) est dissout dans de l'acétone pour constituer une solution à 20 mg / l. La solution est vaporisée sur le corps du ver à soie pendant le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge au taux de 1,5 µg / larve. Pour ces larves, la feuille de mûrier avec l'analogue d'hormone de mue (MH-III) est donnée de la 96^{ème} à la 120^{ème} heure du 5^{ème} âge au taux de 2 µg / larve. Des feuilles sont vaporisées avec de l'eau distillée et sont données en nourriture aux larves de vers à soie témoins. Après le traitement, on adopte une méthode standard d'élevage jusqu'au filage. Les larves sont disséquées le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge et les glandes séricigènes postérieures sont utilisées pour étudier l'ultrastructure. Chaque expérience est triplée.

Etude au microscope électronique :

Pour l'étude au microscope électronique, les glandes séricigènes postérieures des larves témoins et expérimentales sont disséquées dans une solution saline physiologique froide et conservées dans de la glutaraldéhyde 2,5 % à 4° C. Après 1 h de fixation à température ambiante, les tissus sont rincés dans un tampon phosphate à 0,1 M, au pH de 7,4 puis post fixés dans de l'OsO₄ (à 1 % dans un tampon phosphate, P / V) pendant 2 heures. Les tissus sont rincés une nouvelle fois dans un tampon phosphate et déshydratés dans de l'éthanol, puis inclus dans de l'Epon 812. Des coupes fines (50 nm) sont réalisées avec un couteau à pointe de diamant et colorées avec de l'acétate d'uranyl à 5 % et du citrate de plomb pendant 6 à 7 minutes (Sato, 1968). L'observation est réalisée au moyen d'un microscope électronique Jem-1200 EX.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les noyaux se ramifient et pénètrent profondément dans la région cytoplasmique de la cellule pendant le 5^{ème} âge. Le noyau contient un grand nombre de nucléoles et de corps chromatiques, ce qui indique que les cellules continuent l'endomitose pendant le stade larvaire et une partie du matériel nucléolaire semble être transféré dans le cytoplasme en passant par la membrane nucléaire, une autre indication de la communication active entre le noyau et le cytoplasme. Un tel phénomène

ultrastructural se produit fréquemment dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* (Akai, 1964 et Tashiro et coll., 1968).

Les mitochondries sont distribuées au hasard dans le cytoplasme des cellules. Le réticulum endoplasmique granulaire (ER) et les appareils de Golgi (GC) sont bien développés dans le cytoplasme le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge (Fig 1-b). Il est légèrement éparpillé comme du sable dans le cytoplasme uniquement. Ces éléments se développent rapidement en formes lamellaires, concentriques – circulaires et irrégulières (Akai et coll., 1986).

Les appareils de Golgi se développent aussi dans le cytoplasme relié au réticulum endoplasmique rugueux dans la glande séricigène postérieure traitée avec du méthoprène le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge. Pendant le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge, un petit nombre de fibres de fibroïne moléculaire peuvent être vues dans les appareils de Golgi. Elles deviennent des globules de fibroïne qui sont densément rassemblés avec des fibres de fibroïne élémentaire et puis libérés à partir des appareils de Golgi (Fig 2b). Les globules de fibroïne s'accumulent dans la zone cytoplasmique apicale et les fibres de fibroïne élémentaires sont libérées dans la lumière par exocytose (Fig 2-c).

La lumière de la glande séricigène est remplie avec une grande quantité de matériau de soie liquide de deux types, des masses de nombreuses fibres de fibroïne irrégulières (Fig 2-c et 3-c). Ceci confirme les études antérieures (Akai et Kataoka, 1978 ; Kataoka et Akai, 1979 et Akai et coll., 1987).

La fibroïne nouvellement synthétisée apparaît rapidement dans la lumière glandulaire après l'administration du méthoprène et de l'HM seuls ou en combinaison ce qui montre qu'une augmentation de la biosynthèse de la fibroïne entraîne une augmentation de la quantité totale de fibroïne dans la lumière (Fig 2, 3 et 4).

La synthèse des molécules de fibres de fibroïne dans les cellules de la glande séricigène postérieure est plus importante chez les larves expérimentales que chez les larves témoins (Fig. 1, 2, 3 et 4). Cette fibroïne est sécrétée et stockée dans la lumière de la glande et finalement filée par la filière sous la forme du filament de cocon. Les fibres de fibroïne moléculaire synthétisées sur les ribosomes dans les cellules de la glande séricigène postérieure sont concentrées dans l'appareil de Golgi et les globules de fibroïne sont libérés dans la couche de soie par exocytose. Chez les larves témoins et traitées au méthoprène, les cellules de la glande séricigène ont un réseau endoplasmique lisse (ER) et les globules de fibroïne (FG) sont stockés dans le cytoplasme (Fig 1 et 2). Ce résultat montre que les cellules de la glande séricigène des larves de ver à soie témoins et traitées au méthoprène ont une synthèse de fibroïne active et n'ont pas de sécrétion le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge.

Mais il y a peu de globules de fibroïne (FG) stockés dans les cellules de la glande séricigène des larves de vers à soie traitées avec l'HM et avec une combinaison de méthoprène et d'HM et on peut observer un phénomène clair de sécrétion le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge (Fig. 3 et 4). Cela veut dire que les vers à soie traités avec l'HM et la combinaison de méthoprène et d'HM dans les 96 à 120 heures du 5^{ème} âge commencent la synthèse de la fibroïne plus tôt, ce qui diminue la durée de vie des larves.

EFFECT OF UV-LIGHT ON THE LARVAL GROWTH, FECUNDITY, COCOON CHARACTERS AND SILK QUALITY OF MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

D. BHARATI & MIAO YUNGEN

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

*The effect of UV-light on the larval growth, cocoon characters and silk quality of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. were investigated in two popular bivoltine hybrids, Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese) and Chenxin × Jufang. The larvae of first day of fifth instar were used for the present investigation. The larvae were irradiated with 20W of UV-light at the intensity of 40 cm above the larvae and three exposure times (30 min, 60 min and 120 min) were given just before feeding. The results suggest that UV-light of 30 minutes has no effect on growth of larvae, fecundity rate, cocoon characters and silk quality. Whereas the larvae exposed to 120 minutes showed significant decrease in the percent of survival, larval growth, fecundity rate, cocoon characters and silk quality when compared to larvae exposed to 60 minutes.*

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., UV light, eclosion, fecundity, reelability.

INTRODUCTION

Bombyx mori L., a domesticated mulberry silkworm is the target of intensive scientific studies because of its industrial importance. The use of optical brightness as radiation protectant for gypsy moth nuclear polyhedrosis virus was studied (Shapiro, 1992). The lethal effect of UV-radiation on the adult German cockroach was investigated by Okamoto (1992). Two strains of *Bacillus thuringiensis* were tested with NTG and UV-light, resulting in the production of 3 non-spore bearing mutants (Wu *et al.*, 1993). The mortality, inherited sterility and phototactic responses of mosquitoes to laser beams of different spectra were studied (Ikeshoji, 1992).

Hence, in the present study an attempt has been made to study the effect of UV-light on larval growth, fecundity, eclosion, cocoon characters and silk quality of *Bombyx mori* L.

MATERIAL AND METHODS

Disease free layings of two bivoltine hybrids, Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese) and Chenxin (Japanese) × Jufang (Chinese) were supplied by Sericulture Department of Zhejiang Agricultural Bureau, Hangzhou, Zhejiang, China.

The silkworms were reared on fresh mulberry leaf at 25 °C, RH 70-85% and 12L:12D photoperiod. Each experiment was conducted in three replications. 200 larvae per each replication were reared. The larvae of first day of fifth instar were used for the present investigation. The larvae were irradiated with 20W of UV-light at the intensity of 40cm above the larvae and three exposure times were given just before feeding. After exposure to UV-light, the larvae were transferred to control light and feeding was given.

The larval duration of fifth instar, weight of fully grown larva, % of dead larvae, cocoon weight, shell weight, shell ratio, eclosion, fecundity rate, filament length, filament weight, non-breakable filament length, denier, reelability % and size deviation were investigated in control and experimental bivoltine hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L.

RESULTS AND DISCUSSION

The results presented in Tables I to IV reveal the extent of changes in larval weight, larval duration, percentage of dead larvae, eclosion, fecundity, cocoon characters and silk quality of two bivoltine hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. treated with UV-light.

Fifth instar larval duration:

The larval duration of fifth instar after exposure to UV-light for 30 minutes showed non-significant changes over control (2 bivoltine hybrids). The increase in larval duration was observed to be of 14.29% and 35.71% after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (Jufang × Chenxin). The same trend was noticed in the other bivoltine hybrids, Chenxin × Jufang.

Weight of fully-grown larva:

The weight of fully grown larva after exposure to UV-light for 30 minutes showed non-significant changes over control (2 bivoltine hybrids). A decrease of 11.03% and 27.83% was observed after treatment with UV-light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (Jufang × Chenxin). Almost the same trend was observed in the other bivoltine hybrid, Chenxin × Jufang.

Percentage of dead larvae:

The percentage of dead larvae was 2% both in control (two bivoltine hybrids) and after exposure to UV-light (30 minutes). The percentage of dead larvae observed was of 15% and 35% after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively.

Cocoon weight:

The cocoon weight after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control. The decrease observed was 22.76% and 30.45% after exposure to UV-light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (Jufang × Chenxin). The decrease in cocoon weight was 20.54% and 37.80% after UV-light (60 minutes and 120 minutes) over control (Chenxin × Jufang).

Shell weight:

The weight of cocoon shell after exposure to UV-light for 30 minutes showed non-significant over control (2 bivoltine hybrids). The decrease in shell weight observed was 21.01% and 37.32% after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (Jufang × Chenxin). The decrease in shell weight was of 25.98% and 55.38% after treatment with UV light (60 minutes and 120 minutes) over control (Chenxin × Jufang).

Shell ratio:

The cocoon shell ratio after exposure to UV light for 30 minutes was 17.23% almost the same (17.69%) as control (Jufang × Chenxin). The shell ratio observed was 15.60% and 12.25% after exposure to UV-light for 60 minutes and 120 minutes respectively. Whereas in Chenxin × Jufang (bivoltine hybrid), the shell ratio after exposure to UV-light for 30 minutes was 20.89%, almost the same (20.93%) as control. The shell ratio observed was of 19.50% and 15.02% after exposure to UV-light for 60 minutes and 120 minutes.

Table I. Fifth instar larval duration (days), weight of fully grown larva (g) % of dead larvae, cocoon weight (g), shell weight (g), shell ratio (%), eclosion (days) and fecundity (number) in control and experimental (UV light for 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes) silkworm, *Bombyx mori* L. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance. "NS" non-significant.

Tableau I. Durée larvaire du 5^{ème} âge (jours), poids des larves adultes (g), % de larves mortes, poids du cocon (g), poids de la coque (g), richesse soyeuse (%), éclosion (jours) et fécondité (nombre) chez le ver à soie *Bombyx mori* L. témoin et expérimental (lumière UV pendant 30 minutes, 60 minutes et 120 minutes). Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne et écart type ; "+" et "-" indiquent respectivement l'augmentation et la baisse en pourcentage par rapport au témoin. "P" montre la signification statistique. "NS" – non significatif.

Bivoltine hybrid : Jufang $\times$ Chenxin

Hybride bivoltin : Jufang $\times$ Chenxin

Sl. no.	Parameter	Control	Experimental (UV – light)		
			30 min	60 min.	120 min
No. de série	Paramètre	Témoin	Expérimental (lumière UV)		
			30 min	60 min	120 min
1	Fifth instar larval duration (days) Durée larvaire du 5 ^{ème} âge (jours)	7.00 $\pm$ 0.51	7.0 $\pm$ 0.49 NS	8.0 $\pm$ 0.62 + 14.29 P < 0.001	9.5 $\pm$ 0.73 + 35.71 P < 0.001
2.	Weight of fully grown larvae (g) Poids des larves complètement développées (g)	3.762 $\pm$ 0.28	3.750 $\pm$ 0.31 - 0.32 NS	3.397 $\pm$ 0.30 - 11.03 P < 0.001	2.715 $\pm$ 0.26 - 27.83 P < 0.001
3	% of dead larvae % de larves mortes	2.0	2.0	15.0	35.0
4.	Cocoon weight (g) Poids du cocon (g)	1.56 $\pm$ 0.12	1.549 $\pm$ 0.13 - 0.70 NS	1.205 $\pm$ 0.10 - 22.76 P < 0.001	1.085 $\pm$ 0.08 - 30.45 P < 0.001
5	Shell weight (g) Poids de la coque (g)	0.276 $\pm$ 0.023	0.268 $\pm$ 0.022 - 2.89 NS	0.188 $\pm$ 0.019 - 21.01 P < 0.001	0.133 $\pm$ 0.012 - 37.32 P < 0.001
6	Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	17.69	17.23	15.60	12.25
7	Eclosion (days) Éclosion (jours)	11.0 $\pm$ 0.98	11.0 $\pm$ 0.85 0 NS	14.0 $\pm$ 1.29 + 27.27 P < 0.001	16.00 $\pm$ 1.57 + 45.45 P < 0.001
8	Fecundity (number) Fécondité (nombre)	496.0 $\pm$ 21.32	488.0 $\pm$ 26.54 - 1.61 NS	412.0 $\pm$ 22.64 - 16.93 P < 0.001	321.0 $\pm$ 18.89 - 35.28 P < 0.001

Table II. Fifth instar larval duration (days), weight of fully-grown larva (g), % of dead larvae, cocoon weight (g), shell weight (g), shell ratio (%), eclosion (days) and fecundity (number) in control and experimental (UV-light for 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes) silkworm, *Bombyx mori* L. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance. "NS" = non significant.

Tableau II. Durée larvaire du 5^{ème} âge (jours), poids de larves complètement développées (g), % de larves mortes, poids du cocon (g), poids de la coque (g), richesse soyeuse (%), éclosion (jours) et fécondité (nombre) chez le ver à soie *Bombyx mori* L. témoin et expérimental (lumière UV pendant 30 minutes, 60 minutes et 120 minutes). Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne et écart type ; "+" et "-" indiquent respectivement le pourcentage d'augmentation et de baisse par rapport au témoin. "P" montre l'importance statistique. "NS" : non significatif.

Bivoltine hybrid: Chenxin (Japanese) $\times$ Jufang (Chinese)

Hybride bivoltin : Chenxin (japonais) $\times$ Jufang (chinois)

Sl. No.	Parameter	Control	Experimental (UV light)		
			30 min	60 min	120 min
No. de série	Paramètre	Témoin	Experimental (lumière UV)		
			30 min	60 min.	120 min.
1	Fifth instar larval duration (days) <i>Durée larvaire du 5^{ème} âge (jours)</i>	7.00 $\pm$ 0.68	7.0 $\pm$ 0.63 0 NS	8.0 $\pm$ 0.76 + 14.29 P < 0.001	9.5 $\pm$ 0.83 35.71 P < 0.001
2	Weight of fully grown larva (g) <i>Poids de larves complètement développées (g)</i>	4.310 $\pm$ 3.18	4.298 $\pm$ 3.82 -0.28 NS	3.733 $\pm$ 2.86 - 13.97 P < 0.001	3.251 $\pm$ 2.14 - 25.64 P < 0.001
3	% of dead larvae / % de larves mortes	2.0	2.0	15.0	35.0
4	Cocoon weight (g) <i>Poids du cocon (g)</i>	1.820 $\pm$ 0.16	1.795 $\pm$ 0.15 - 1.37 NS	1.446 $\pm$ 0.121 - 20.54 P < 0.001	1.132 $\pm$ 0.092 - 37.80 P < 0.001
5	Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	0.381 $\pm$ 0.029	0.375 $\pm$ 0.032 - 1.57 NS	0.282 $\pm$ 0.022 - 25.98 P < 0.001	0.170 $\pm$ 0.013 - 55.38 P < 0.001
6	Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	20.93	20.89	19.50	15.02
7	Eclosion (days) <i>Éclosion (jours)</i>	11.0 $\pm$ 0.96	11.0 $\pm$ 0.80 0 NS	14.0 $\pm$ 1.28 + 27.27 P < 0.001	16.0 $\pm$ 1.50 + 45.45 P < 0.001
8	Fecundity (number) <i>Fécondité (nombre)</i>	558.0 $\pm$ 23.19	548.0 $\pm$ 21.48 - 1.79 NS	456.0 $\pm$ 15.32 - 18.28 P < 0.001	354 $\pm$ 11.71 - 36.56 P < 0.001

Tableau III. Filament length (m), filament weight (g), non-breakable filament length (m), denier (d), reelability (%) and size deviation in control and experimental (UV light for 30 minutes, 60 minutes and 120 min.) silkworm, *Bombyx mori* L. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D., "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance; "NS" non significant.

Tableau III. Longueur du filament (m), poids du filament (g), longueur du filament sans rupture (m), titre (d), dévidabilité (%) et déviation du titre chez le ver à soie *Bombyx mori* L. témoin et expérimental (lumière UV pendant 30 minutes, 60 minutes et 120 minutes). Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne et écart type. "+" et "-" indiquent respectivement le pourcentage d'augmentation et de baisse par rapport au témoin. "P" montre la signification statistique. "NS" : non significatif.

Bivoltine hybrid : Jufang (Chinese) $\times$ Chenxin (Japanese)

Hybride bivoltin : Jufang (chinois) $\times$ Chenxin (japonais)

Sl. no.	Parameter	Control	Experimental (UV light)		
			30 min.	60 min.	120 min.
No. de série	Paramètre	Témoin	Expérimental (lumière UV)		
			30 min	60 min	120 min
1	Filament length (m)	855.0 $\pm$ 18.28	840.0 $\pm$ 12.41	715.0 $\pm$ 10.53	583.0 $\pm$ 9.89
	Longueur du filament (m)		-1.75 NS	-16.37 P < 0.001	-31.81 P < 0.001
2	Filament weight (g)	0.249 $\pm$ 0.021	0.238 $\pm$ 0.018	0.190 $\pm$ 0.016	0.160 $\pm$ 0.013
	Poids du filament (g)		-4.42 NS	-23.69 P < 0.001	-35.74 P < 0.001
3	Non breakable filament length (m)	733.0 $\pm$ 9.46	716.0 $\pm$ 10.87	528.0 $\pm$ 9.35	396.0 $\pm$ 8.42
	Longueur du filament sans rupture (m)		-2.32 NS	-27.97 P < 0.001	-45.97 p < 0.001
4	Denier (d) / Titre (d)	2.62 $\pm$ 0.19	2.57 $\pm$ 0.17	2.10 $\pm$ 0.15	1.75 $\pm$ 0.12
			-1.91 NS	-19.85 P < 0.001	-33.21 P < 0.001
5	Reelability (%) / Dévidabilité (%)	85.73	85.24	73.85	67.92
6	Size deviation / Déviation du titre	0.40 $\pm$ 0.035	0.39 $\pm$ 0.025	0.50 $\pm$ 0.038	0.58 $\pm$ 0.042
			-2.5 NS	+25.0 P < 0.001	+45.0 P < 0.001

Table IV. Filament length (m), filament weight (g), non-breakable filament length (m), denier (d), reelability (%) and size deviation in control and experimental (UV light for 30 min., 60 min. and 120 min.) silkworm, *Bombyx mori* L. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D., "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance; "NS" non significant.

Tableau IV. Longueur du filament (m), poids du filament (g), longueur du filament sans rupture (m), titre (d), dévidabilité (%) et régularité du titre chez le ver à soie *Bombyx mori* L. témoin et expérimental (lumière UV pendant 30 min., 60 min. et 120 min.). Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne et écart type, "+" et "-" indiquent respectivement le pourcentage d'augmentation et de baisse par rapport au témoin. "P" montre la signification statistique. "NS" non significatif.

Bivoltine hybrid: Chenxin (Japanese) $\times$ Jufang (Chinese)

Hybride bivoltin : Chenxin (Japonais) $\times$ Jufang (Chinois)

Sl. No.	Parameter	Control	Experimental (UV light)		
			30 min.	60 min.	120 min.
No. de série	Paramètre	Témoin	Expérimental (lumière UV)		
			30 min.	60 min.	120 min.
1	Filament length (n) Longueur du filament (n)	889.0 $\pm$ 20.58	855.0 $\pm$ 17.39 - 3.98 NS	754.0 $\pm$ 11.84 - 15.18 P < 0.01	623.0 $\pm$ 9.63 - 29.92 P < 0.001
2	Filament weight (g) Poids du filament (g)	0.278 $\pm$ 0.023	0.269 $\pm$ 0.021 - 3.24 NS	0.201 $\pm$ 0.018 - 27.69 P < 0.001	0.174 $\pm$ 0.015 - 37.41 P < 0.001
3	Non-breakable filament length (m) Filament sans rupture (m)	776.0 $\pm$ 9.84	799.0 $\pm$ 8.53 + 4.12 NS	571 $\pm$ 7.60 - 26.42 P < 0.001	428.0 $\pm$ 5.89 - 44.84 P < 0.001
4	Denier (d) / Titre (d)	2.81 $\pm$ 0.21	2.74 $\pm$ 0.19 - 2.49 NS	2.28 $\pm$ 0.18 - 18.86 P < 0.001	1.88 $\pm$ 0.16 - 33.09 p < 0.001
5	Reelability (%) Dévidabilité (%)	87.28	87.01	75.73	68.69
6	Size deviation Régularité du titre	0.42 $\pm$ 0.032	0.41 $\pm$ 0.035 - 2.38 NS	0.52 $\pm$ 0.046 + 23.81 P < 0.001	0.63 $\pm$ 0.058 + 50.0 p < 0.001

Eclosion:

The eclosion period after exposure to UV-light showed non-significant change over control after exposure for 30 minutes (2 bivoltine hybrids). The increase in eclosion period was observed to be of 27.27% and 45.45% after exposure to UV-light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (2 bivoltine hybrids).

Fecundity:

The fecundity rate, after exposure to UV-light for 30 minutes showed non-significant change over control (2 bivoltine hybrids). The decrease in fecundity observed was of 16.93% and 35.28% after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control (Jufang × Chenxin).

Whereas in the other bivoltine hybrid (Chenxin × Jufang), the decrease in fecundity observed was of 18.28 % and 36.56% after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

Filament length:

The filament length after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control. The decrease in filament length observed was of 16.37% and 31.81% in Jufang × Chenxin and 15.18% and 29.92% in Chenxin × Jufang after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

Filament weight:

The filament weight after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control (2 bivoltine hybrids). The decrease in filament weight observed was of 23.69% and 35.74% in Jufang × Chenxin and 27.69% and 37.41% in Chenxin × Jufang after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

Non-breakable filament length:

The non-breakable filament length after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control. The decrease in non-breakable filament length was 27.97% and 45.97% in Jufang × Chenxin and 26.42% and 44.84% in Chenxin × Jufang after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

Denier:

The silk filament size (denier) observed after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control (2 bivoltine hybrids). The decrease in denier was 2.10 d and 1.75d in Jufang × Chenxin and 2.28d and 1.88d in Chenxin × Jufang after exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

Reelability %:

The percentage of reelability of control was 85.73% in Jufang × Chenxin and 87.28% in Chenxin × Jufang. The reelability percentage observed was of 85.29%, 73.85% and 67.92% in Jufang × Chenxin and 87.01%, 75.73% and 68.69% in Chenxin × Jufang after treatment with UV light for 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes respectively.

Size deviation:

The size deviation after exposure to UV light for 30 minutes showed non-significant change over control. The increase in size deviation was of 25% and 45% in Jufang × Chenxin and of 23.81% and 50% in Chenxin × Jufang after treatment with UV light for 60 minutes and 120 minutes respectively over control.

The above results clearly showed that effect of UV light for 30 minutes was congenial for the larval growth, per cent survival, eclosion, fecundity, cocoon characters and silk quality of two popular bivoltine hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. Whereas the larvae exposure to UV light for 60 minutes and 120 minutes has affected the larval growth, per cent survival, eclosion, fecundity, cocoon characters and silk quality over control. Hence we can conclude that effect of UV light for 60 minutes and 120 minutes has shown physiological damage to silkworm. The larvae are resistant to UV light for 30 minutes but susceptible to UV light for 60 and 120 minutes.

REFERENCES

- IKESHOJI T., 1992. Mortality, inherited sterility and phototactic responses of mosquitoes (Diptera: culicidae) to laser beams of different spectra. *Applied Entomol., Zool.*, 27: 277-284.
- SHAPIRO M., 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 85: 1682-1686.
- OKAMOTO K., 1992. The lethal effect of UV-radiation on the adult German cockroach. 1. Differences in the lethal effect by irradiation regimes. *Jap. J. of Sanitary-Zoology*, 43: 235-241.
- WUJX, CHEN-ZE, XIE T. J., ZHONG L. S., 1993. Breeding of non-spore bearing mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 9: 5-8.

EFFET DE LA LUMIERE UV SUR LA CROISSANCE LARVAIRE, LA FECONDITE, LES CARACTERES DU COCON ET LA QUALITE DE LA SOIE DU VER A SOIE DU MURIER, *BOMBYX MORI* L.

D. BHARATI & MIAO YUNGEN

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

*Nous avons étudié l'effet de la lumière UV sur la croissance larvaire, les caractères du cocon et la qualité de la soie du ver à soie du mûrier, **Bombyx mori** L. chez deux hybrides bivoltins populaires, Jufang (Chinois) × Chenxin (Japonais) et Chenxin × Jufang. Les larves du 1^{er} jour du 5^{ème} âge sont utilisées pour cette étude. Les larves sont irradiées avec 20 W de lumière UV 40 cm au-dessus des larves avec trois temps d'exposition (30 minutes, 60 minutes et 120 minutes) avant le nourrissage. Les résultats suggèrent qu'une exposition à une lumière UV pendant 30 minutes n'a pas d'effet sur la croissance des larves, le taux de fécondité, les caractères du cocon et la qualité de la soie. Tandis que les larves qui sont exposées pendant 120 minutes présentent une baisse significative du taux de survie, de la croissance larvaire, du taux de fécondité, des caractères du cocon et de la qualité de la soie par comparaison aux larves exposées pendant 60 minutes.*

INTRODUCTION

Bombyx mori L., le ver à soie du mûrier fait l'objet d'études scientifiques poussées en raison de son importance économique. L'utilisation de la lumière comme protecteur contre le virus de la polyédrose nucléaire chez le papillon Gypsy a déjà été étudiée (Shapiro, 1992). L'effet mortel de l'irradiation UV a été étudié chez la blatte par Okamoto (1992). On a testé l'effet de la lumière UV et de la NTG sur deux souches de *Bacillus thuringiensis*, ce qui a produit 3 mutants ne présentant pas de spores (Wu et coll., 1993). La mortalité, l'hérédité de la stérilité et les réponses phototactiques de moustiques avec des rayons laser de spectres différents ont également été étudiées (Ikeshoji, 1992).

Nous avons donc essayé dans cette recherche d'étudier l'effet de la lumière UV sur la croissance larvaire, la fécondité, l'éclosion, les caractères du cocon et la qualité de la soie chez *Bombyx mori* L.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines de deux hybrides bivoltins, Jufang (Chinois) × Chenxin (Japonais) et Chenxin (Japonais) × Jufang (Chinois) ont été obtenues auprès du Département Séricicole du Bureau Agricole de Zhejiang, à Hangzhou, Zhejiang, en Chine.

Les vers à soie sont élevés sur des feuilles de mûrier fraîches à 25° C, avec une humidité relative (H. R.) de 70 à 85 % et une photopériode de 12 L : 12 O. Chaque expérience est répétée trois fois. On élève 200 larves pour chaque répétition. On utilise des larves du 1^{er} jour du 5^{ème} âge pour cette étude. Les larves sont irradiées avant le nourrissage avec une lumière UV de 20 W à 40 cm au-dessus des larves et trois temps d'exposition différents. Après avoir été exposées à la lumière UV, les larves sont transférées sous une lumière ordinaire et sont nourries.

Nous avons étudié la durée larvaire du 5^{ème} âge, le poids des larves matures, le % de mortalité des larves, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, l'éclosion, le taux de fécondité, la longueur du filament, le poids du filament, la longueur du filament sans rupture, le titre, le % de dévidabilité et la régularité du titre chez les hybrides bivoltins du ver à soie *Bombyx mori* L témoins et expérimentaux.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans les Tableaux I à IV montrent l'étendue des changements de poids larvaire, de durée larvaire, de pourcentage de mortalité larvaire, d'éclosion, de fécondité, des caractères du cocon et de la qualité de la soie chez les deux hybrides bivoltins du ver à soie *Bombyx mori* traités avec de la lumière UV.

Durée du cinquième âge larvaire :

La durée du 5^{ème} âge larvaire après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changements significatifs par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). On observe une augmentation de la durée larvaire de 14,29 % et de 35,71 % après exposition à la lumière UV pendant respectivement 60 minutes et 120 minutes par rapport au témoin (Jufang × Chenxin). On remarque la même tendance chez les autres hybrides bivoltins Chenxin × Jufang.

Poids des larves adultes :

Le poids des larves adultes après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). On observe une baisse de 11,03 % et 27,83 % par rapport au témoin après un traitement à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes (Jufang × Chenxin). On observe presque la même tendance chez l'autre hybride bivoltin Chenxin × Jufang.

Pourcentage de mortalité larvaire :

Le pourcentage de mortalité larvaire s'élève à 2 % à la fois chez le témoin (deux hybrides bivoltins) et après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes. On observe un pourcentage de mortalité larvaire de 15 % et 35 % après une exposition à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes.

Poids du cocon :

Le poids du cocon après l'exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin. On observe une baisse de 22,76 % et 30,45 % après une exposition à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes (Jufang × Chenxin). La baisse du poids du cocon s'élève à 20,54 % et 37,80 % après une exposition à la lumière UV de 60 et 120 minutes chez Chenxin × Jufang.

Poids de la coque :

Le poids de la coque soyeuse après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). On observe une baisse du poids de la coque de 21,01 % et 37,32 % après une exposition à une lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes par rapport au témoin chez Jufang × Chenxin. La baisse du poids de la coque s'élève à 25,98 % et 55,38 % après le traitement avec la lumière UV (60 minutes et 120 minutes) chez Chenxin × Jufang.

Richesse soyeuse :

La richesse soyeuse après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes s'élève à 17,23 % soit presque autant (17,69 %) que le témoin (Jufang × Chenxin). On enregistre une richesse soyeuse de respectivement 15,60 % et 12,25 % après exposition à une lumière UV de 60 et 120 minutes. Chez Chenxin × Jufang, la richesse soyeuse après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes s'élève à 20,89 %, presque autant (20,93 %) que le témoin. On observe que la richesse soyeuse s'élève à respectivement 19,50 % et 15,02 % après une exposition à une lumière UV pendant 60 minutes et 120 minutes.

Eclosion :

La période d'éclosion après l'exposition à la lumière UV ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins) après exposition pendant 30 minutes. On observe que l'augmentation de la durée d'éclosion s'élève à 27,27 % et 45,45 % après exposition à la lumière UV pendant 60 minutes et 120 minutes respectivement (2 hybrides bivoltins).

Fécondité :

Le taux de fécondité après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). On observe que la baisse de la fécondité s'élève à 16,93 % et 35,28 % après exposition à une lumière UV pendant respectivement 60 minutes et 120 minutes chez Jufang × Chenxin. Tandis que chez l'autre hybride bivoltin (Chenxin × Jufang) on observe une baisse de la fécondité de 18,28 % et de 36,56 % après exposition à une lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes par rapport au témoin.

Longueur du filament :

La longueur du filament après exposition à une lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas un changement significatif par rapport au témoin. On observe que la baisse de la longueur du filament s'élève à 16,37 % et 31,81 % chez Jufang × Chenxin et à 15,18 % et 29,92 % chez Chenxin × Jufang après une exposition à une lumière pendant 60 minutes et 120 minutes respectivement.

Poids du filament :

Le poids du filament après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes présente un changement non significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). La baisse du poids du filament que l'on observe s'élève à 23,69 % et 35,74 % chez Jufang × Chenxin et à 27,69 % et 37,41 % chez Chenxin × Jufang après exposition à la lumière UV pendant respectivement 60 minutes et 120 minutes.

Longueur du filament sans rupture :

La longueur du filament sans rupture après exposition à la lumière pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin. La baisse de la longueur du filament sans rupture s'élève à 27,97 % et 45,97 % chez Jufang × Chenxin et à 26,42 % et 44,84 % chez Chenxin × Jufang après exposition à une lumière UV pendant 60 minutes et 120 minutes respectivement par rapport au témoin.

Titre :

On observe que le titre de la bave après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin (2 hybrides bivoltins). Le titre est de 2,10 d et de 1,75 d chez Jufang × Chenxin et de 2,28 d et de 1,88 d chez Chenxin × Jufang après exposition à la lumière UV pendant 60 minutes et 120 minutes respectivement.

% de dévidabilité :

Le pourcentage de dévidabilité du témoin est de 85,73 % chez Jufang × Chenxin et de 87,28 % chez Chenxin × Jufang. Le pourcentage de dévidabilité est de 85,29 %, 73,85 % et 67,92 % chez Jufang × Chenxin et de 87,01 %, 75,73 % et de 68,69 % chez Chenxin × Jufang après le traitement avec la lumière UV pendant respectivement 30 minutes, 60 minutes et 120 minutes.

Régularité du titre :

La régularité du titre après exposition à la lumière UV pendant 30 minutes ne présente pas de changement significatif par rapport au témoin. La baisse de la régularité du titre est de 25 % et de 45 % chez Jufang × Chenxin et de 23,81 % et de 50 % chez Chenxin × Jufang après traitement avec la lumière UV pendant respectivement 60 minutes et 120 minutes.

Les résultats ci-dessus montrent clairement que l'effet de la lumière UV pendant 30 minutes convient à la croissance larvaire, au pourcentage de survie, à l'éclosion, à la fécondité, aux caractères du cocon et à la qualité de la soie chez deux hybrides bivoltins populaires du ver à soie, *Bombyx mori* L. Tandis que l'exposition à la lumière UV pendant 60 minutes et 120 minutes a des effets néfastes sur la croissance larvaire, le pourcentage de survie, l'éclosion, la fécondité, les caractères du cocon et la qualité de la soie. Nous pouvons donc conclure que l'effet de la lumière UV pendant 60 minutes et 120 entraîne des dommages physiologiques chez le ver à soie. Les larves résistent à la lumière UV pendant 30 minutes mais sont sensibles à une lumière UV pendant 60 et 120 minutes.

OPTIMAL CROP PLANNING UNDER PRODUCTION RISK FOR SERICULTURE BASED CROPPING SYSTEM – AN APPLICATION OF MOTAD MODEL

P. KUMARESAN, N. B. VIJAYA PRAKASH & R. K. DATTA

Central Sericulture Research & Training Institute, Mysore - 570 008, India.

Optimal crop planning was evolved with trade-off between risk and return by integrating crop, dairy and sericulture enterprises in minimization of total absolute deviation (MOTAD) framework. Five optimal plans with dual objectives of minimization of risk and attainment of expected revenue were developed for an average farm size of 3.70 acres. The model did not recommend the fodder crops and summer crop of paddy in the optimal plans. The area under mulberry was constant throughout all the plans. Thus, the normative plans developed suggested changes in the existing plan so as to minimize the risk and obtain the stable income.

Keywords: Risk, return, minimization of total absolute deviation (MOTAD) approach.

INTRODUCTION

Risk and uncertainty have been considered as important constraints especially in agricultural production. Risk affects the production decisions of the farmers resulting in inefficiency in allocation of resources for farm activities. Hence, it is necessary to incorporate risk in crop planning in agricultural production to evolve more realistic plans (Hazell and Northon, 1986). Many mathematical programming models such as quadratic risk programming, game theory, maximum admissible loss approach, minimization of total absolute deviation (MOTAD) approach, Monte Carlo programming, safety first principle and stochastic programming are available for programming risk (Anderson *et al.*, 1977). However, most of the applications in agriculture deal with quadratic risk programming or MOTAD decision criteria. The quadratic algorithm is expensive to run for large models. MOTAD provides similar results, which can be generated by linear programming algorithm (Hazell, 1971). Studies have been conducted on the risk taking behaviour of farmers in different regions by Mruthyunjaya and Sirohi (1979), Biswinger (1980), Singh and Jain (1983), Timothy Randhir (1993) and Brajesh Kumar Jha and Dayanath Jha (1995) in India. However, attempts have not been so far made to model the risk taking behaviour of farmers in sericulture. In this study, optimal crop planning was evolved with trade-off between risk and return by integrating crop, dairy and sericulture enterprises using MOTAD model.

METHODOLOGY

The MOTAD developed by Hazell (1971) and used by Timothy Randhir and Krishnamoorthy (1993) and Jha (1996) was employed in the present study with the required modifications. The specification of the model is as under:

Objective function:

$$\text{Minimize Risk } Z_r = \sum_{h=1}^5 p Y_h^-$$

where

Z = Value of the objective function

Y_h = Absolute value of negative deviation in gross income in h th year from mean return

Expected income:

$$\sum_{i=1}^8 C_i X_i + \sum_{j=1}^4 C_j D_j - \sum_{i=1}^{12} W_i L_m - \sum_{j=1}^{12} W_j L_f - H_i \text{BULH} - H_j \text{TRAH} - I_i \text{WC} - \sum_{i=1}^5 P_i F_i - \sum_{i=1}^5 S_i \text{FODP}_i - \sum_{j=1}^5 S_j \text{FODS}_j = \lambda$$

where

Parameters:

C_i = Gross margin from one unit of crop/sericulture activity, i (Rs./acre)

C_j = Gross margin from one unit of dairy activity, j (Rs./acre)

W_i = Wage rate (Rs.) paid to male labour in i th month

W_j = Wage rate (Rs.) paid to female labour in j th month

H_i = Hiring charges of bullock power (Rs. / day)

H_j = Hiring charges of tractor power (Rs. / hour)

I_i = Interest rate for working capital (%)

P_i = Unit price of fertilizers N, P and K (Rs/Kg) and farm yard manure (Rs./Tonne), i applied for crop

S_i = Unit purchase price of green fodder and concentrates, i for cattle (Rs./Kg)

S_j = Unit sale price of green fodder and concentrates, j (Rs./Kg)

λ = expected return (Rs.)

Decision variables:

X_i = Level of i th crop / sericulture activity (No. of acres)

D_j = Level of j th dairy activity (No.)

L_m = Quantity of male labour required during i th month

L_f = Quantity of female labour required during j th month

BULH = Quantity of bullock power used for crop and sericulture activities

TRAH = Quantity of tractor power used for crop and sericulture activities

WC = Amount of working capital required (Rs.)

F_i = Quantity of fertilizers (Kg) and FYM (tonnes), i required

FODP_i = Quantity of fodder and concentrates, i purchased for cattle

FODS_j = Quantity of fodder and concentrates, j sold

Subjected to

Land restrictions:

$$\sum a_{ij} X_i \leq LH$$

where

a_{ij} = Area of land (acres) used by one unit of the harvested crop, i in j th month

LH = Land holding (acres)

Labour constraints:

$$\sum M_{Lim}X_i + \sum M_{Lkm}D_k \leq LABM_m$$

$$\sum F_{Lim}X_i + \sum F_{Lkm}D_k \leq LABF_m$$

Where

M_{Lim} = Quantity of male labour required for i th crop activity during m th month

M_{Lkm} = Quantity of male labour required for k th dairy activity during m th month

F_{Lim} = Quantity of female labour required for i th crop activity during m th month

F_{Lkm} = Quantity of female labour required for k th dairy activity during m th month

$LABM_m$ = Quantity of total male labour available during m th month

$LABF_m$ = Quantity of total female labour available during m th month

Working capital constraints

$$\sum K_iX_i + \sum K_jD_k + \sum P_wC_w - C_w \leq W_c$$

Where

K_i = Working capital required for one unit of crop / sericulture activity, X_i

K_j = Working capital required for one unit of dairy activity, D_j

P_w = Interest rate of working capital to be borrowed (%)

C_w = Amount of working capital required (Rs.)

W_c = Amount of working capital available during the year

Integration of crop and dairy enterprises with nutrients required for crops:

$$\sum F_iX_i - \sum F_kD_k - \sum F_sX_s - F_p = 0$$

F_i = Quantity of farm yard manure (Tonnes) required for the i th crop activity

F_k = Quantity of farm yard manure (Tonnes) produced from the j th dairy activity

F_s = Quantity of farm yard manure (Tonnes) produced from sericulture activity

F_n = Quantity of farm yard manure (Tonnes) purchased

X_s = level of sericulture activity

Integration of crop and dairy enterprises with fodder required for cattle:

$$\sum R_kD_k - \sum R_iX_i - R_p + R_s = 0$$

where

R_i = Quantity of fodder (kg) produced from the i th crop activity

R_k = Quantity of fodder (kg) required for the j th dairy activity

R_p = Quantity of fodder (kg) purchased

R_s = Quantity of fodder (kg) sold

Integration of crop and dairy enterprises with concentrates required for cattle:

$$\sum C_kD_k - \sum C_iX_i - C_p + C_s = 0$$

where

C_i = Quantity of concentrates (kg) produced from the i th crop activity

Ck = Quantity of concentrates (kg) required for jth dairy activity
 Cp = Quantity of concentrates (kg) purchased
 Cs = Quantity of concentrates (kg) sold

Deviation from mean return constraints:

$$\sum (C_{ih} - G_i)X_i + \sum (C_{kh} - G_k)D_j + Y_h^- \geq TR$$

where

C_{ih} = Gross margin of ith crop activity in hth year (Rs./acre)
 G_i = Mean value of gross return of the ith crop activity
 C_{kh} = Gross margin of jth dairy activity in hth year (Rs./ head)
 G_k = Mean value of gross return of the kth dairy activity
 TR = Target return

Maximum restriction:

$$X_i \leq X_i^*; D_k \leq D_k^*$$

where

X_i* = Maximum possible acre
 D_k* = Maximum possible number of cattle

Non-negative constraints:

$$X_i, D_k \geq 0$$

The objective function was defined by the dual criteria of parameterisation of expected return and minimization of risk associated with expected return. The decision variables included in the linear programming model are the area to be allocated for different crop enterprises and the number of different types of cattle to be reared under different levels of risk and expected return. In addition, hiring of labour, borrowing of capital, purchasing of fertilizers and purchasing or selling of fodder were incorporated in the model.

The parameters used in the MOTAD are as follows:

□ The revenue from different crop enterprises and cattle were estimated from the data collected from the sample farmers

□ The initial level of parameterized return was assumed 10 per cent less than the existing farm return. The maximum parameterized return was estimated as the potential return on the farm obtained through deterministic linear programming solution. Thus, five normative plans were developed by fixing the returns between the maximum and minimum parameterized returns.

The model constraints were selected based on the following considerations:

□ Since each crop had different growing season, land constraint was fitted with 12 restricted periods.

□ The average farm holding size of the sample farmers was 3.70 acres, which was considered as the maximum possible area available for cultivation.

□ The nutrients required for the crop enterprises were obtained from the cowdung generated from cattle, sericulture wastes and the farmyard manure and fertilizers purchased from outside.

□ The fodders and concentrates required for cattle were obtained from crop enterprises. The feeds were purchased from outside at the time of shortage and sold when there were excess.

The data were collected from 30 randomly selected farmers practising agriculture, sericulture and dairy activities from 6 villages in Salem taluk of Salem district in Tamil Nadu during October 1998.

RESULTS AND DISCUSSION

Five optimal plans with dual objectives of minimization of risk and attainment of expected revenue were developed for an average farm size of 3.70 acres and the results are presented in Table I. Plan 1 had the maximum expected income as well contained maximum risk. On the other hand, the expected income and risk were minimum in Plan 5.

The total area under crops decreased progressively from Plan 1 to Plan 5. Paddy-I, which is cultivated during the period between August and December, occupied a stable berth in all the optimal plans and the area of paddy increased over the plans. The incremental entry may be due to lower level of risk at lower income levels and the higher negative deviation component of the crop (Timothy Randhir and Krishnamoorthy, 1993). The reduction of entry in the earlier plans might be due to the competition from the other remunerative crops. Paddy-II (summer crop) cultivated during the months of February to June was picked up only in plan 1 responding to higher income level. But eliminated in other plans due to high risk involved in cultivation of paddy in summer months due to water shortage.

The area of banana and tapioca decreased in the subsequent plans demonstrating a higher preference under higher income expectations. Though tapioca and banana were offering high income, these crops were associated with high risk due to wide fluctuations in yield and price. Cotton was found in all the plans occupying 0.6 acres in plan 1 and plan 2 and 0.5 acre in other plans. Groundnut, which is the oilseed crop associated with high yield and price fluctuations is observed in plan 1 through plan 3. Mulberry entered in all the plans with 0.5 acre, which indicated that mulberry provided a stable income to the farmers compared to other crops. The average price of mulberry cocoon and yield did not fluctuate much during the study period and hence, the revenue from sericulture was more or less stable. The fodder crops were not taken up in the optimal solution due to low income per acre compared to other crops. As the model recommended for cultivating paddy, sorghum, groundnut and mulberry and the waste leaves of mulberry and dried leaves (straw) of paddy, sorghum and groundnut are fed to cattle, the model might not have recommended for inclusion of fodder crops in the optimal plans.

The model recommended 2.96 units of milk buffaloes in plan 1 and plan 2 and 3.34 units in other plans. The incremental recommendation of buffaloes over the plans may be due to lower risk allowance at lower income levels. Goat entered into only first 3 plans demonstrating the higher preference under higher income expectations. Bullock and cow were not picked up in the optimal solutions due to less income compared to milk buffaloes.

The utilization of resources such as land, human labour and working capital decreased in successive farm plans. There was a decline in total area with the minimization of risk in the farm plans. This resulted in a decrease in other complementary resources namely, labour and capital. The risk per unit capital decreased over consecutive plans indicating the necessity of a large amount of capital under higher income expectations. The average negative deviation from mean declined faster than returns indicating the weakening trade-off possibilities of the expected income with the variability in income. The reason is due to occupation of relatively higher risky crops having higher deviation in the earlier plans compared to the later plans.

Table I. Optimum crop plan at varying level of expected return and risk developed using MOTAD model.

Tableau I. Plans de culture optimums à des niveaux variables de profit et de risque escomptés développés en utilisant le modèle MOTAD.

Sl no.	Particulars	Unit	Plan 1	Plan 2	Plan 3	Plan 4	Plan 5
<i>No.</i>	<i>Paramètres</i>						
1.	Expected return / <i>Profit escompté</i>	Rs.	96573.00	87794.00	81626.00	73463.00	71831.00
2.	Minimized risk / <i>Risque minimisé</i>		2927.34	2446.20	2198.98	1887.54	1784.62
3.	Return / unit of risk <i>Profit / unité de risque</i>		32.99	35.89	37.12	38.92	40.25
4.	Enterprises / <i>Entreprises</i>						
a.	Paddy I (August – December)	Acre	0.4	0.4	1.2	0.8	1.1
a.	<i>Paille de riz I (août – décembre)</i>	<i>1/2 hectare</i>					
b.	Paddy II (February – June)	Acre	0.4	-	-	-	-
b.	<i>Paille de riz II (février-juin)</i>	<i>1/2 hectare</i>					
c.	Banana / <i>banane</i>	Acre	1.3	1.2	1.1	1.1	0.6
		<i>1/2 hectare</i>					
d.	Tapioca	Acre	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4
		<i>1/2 hectare</i>					
e.	Cotton / <i>coton</i>	Acre	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5
		<i>1/2 hectare</i>					
f.	Groundnut / <i>arachide</i>	Acre	0.8	0.8	0.4	-	-
		<i>1/2 hectare</i>					
g.	Sorghum / <i>sorgho</i>	Acre	0.8	0.6	0.4	0.4	0.4
		<i>1/2 hectare</i>					
h.	Mulberry / <i>mulier</i>	Acre	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
		<i>1/2 hectare</i>					
i.	Milch buffalo / <i>Lait de buffle</i>	No.	2.9	2.9	3.3	3.3	3.3
5.	Goat / <i>chèvre</i>	No.	1.8	1.8	1.2	-	-
6.	Labour utilization / <i>Utilisation de main d'œuvre</i>						
a.	Male / <i>Mâle</i>	No.	345.97	332.15	326.82	310.61	299.43
b.	Female / <i>Femelle</i>	No.	312.78	265.07	251.22	218.79	187.86
7.	Working capital / <i>Fond de roulement</i>	Rs	45480.54	41491.19	38197.25	34206.59	33378.04
8.	Risk / unit capital <i>Risque / unité de capital</i>		6.77	5.87	5.75	5.52	5.34

Table II. Existing and normative crop plans for the study area.

Tableau II. Plans de cultures existants et normatifs pour la zone d'étude.

Sl. No.	Crops	Percentage of area under	
		Existing plan	Normative plan
<i>No. de série</i>	<i>Cultures</i>	<i>Surface sous (en pourcentage)</i>	
		<i>plan existant</i>	<i>plan normatif</i>
1.	Paddy I / <i>Paille de riz I</i>	19.41	16.96
2.	Paddy II / <i>Paille de riz II</i>	9.71	-
3.	Banana / <i>Banane</i>	9.71	22.77
4.	Tapioca	19.42	16.53
5.	Cotton / <i>Coton</i>	7.77	12.05
6.	Groundnut / <i>Arachide</i>	4.85	8.92
7.	Sorghum / <i>Sorgho</i>	13.59	11.61
8.	Fodder / <i>Fourrage</i>	6.80	-
9.	Mulberry / <i>Murier</i>	8.74	11.16
	Total	100.00	100.00

The normative plan was worked out by using linear interpolation technique used by Timothy Randhir and Krishnamoorthy (1993) and compared with the existing plan (Table II). The normative plan suggested for more allocation of land for banana, cotton, groundnut and mulberry than the present level. While the small reduction in paddy-I, tapioca and sorghum was found in normative plan, paddy-II and fodder were not found economical at the given level of resource endowment specifications.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The primary objective of the paper is to develop optimal crop plans with trade-off between risk and return by integrating crop, dairy and sericulture enterprises. Five optimal plans with dual objectives of minimization of risk and attainment of expected revenue were developed for an average farm size of 3.70 acres using the MOTAD model. The model did not recommend the fodder crops and summer crop of paddy in the optimal plans. The area under mulberry was constant throughout all the plans. Paddy, tapioca, cotton and sorghum were included in all the optimal plans. Thus, the

normative plans developed suggested changes in the existing plan so as to minimize the risk and obtain the stable income.

As risk affects the production decisions of farmers resulting in inefficiency in allocation of resources for farm activities, it is necessary that the policy decisions made on crop planning in sericulture should also consider risk element in crop production to evolve more realistic plans. The methodology discussed in this paper can be adopted with required modifications for developing regional plans by integrating different farm enterprises.

REFERENCES

- ANDERSON J. R., DILLON J. L. & HARDAKER B. (1977) Agricultural decision making, Iowa State University Press.
- BINSWANGER H. P. (1982) Empirical estimation and use of risk preferences, *American Journal of Agricultural Economics*, 64(20): 391-393.
- BRAJESH KUMAR JHA & DAYANATH JHA (1995) Farmers attitude towards risk in green belt of India. *Journal of Rural Development*, 14(3): 231-240.
- HAZELL P. B. R. (1971) A linear alternative to quadratic and semi-variance programming for farm planning under uncertainty, *American Journal of Agricultural Economics*, 53(1): 53-62.
- HAZELL P. B. R. & NORTHON R. D. (1986) Mathematical programming for economic analysis in agriculture, Macmillon Publishing Co., New York.
- JHA B. K. (1996) Risk and return trade off in the farms in the green belt, India, *Agriculture Situation in India*: 501-506.
- MURTHYUNJAYA & A. S. SIROHI (1979) Enterprise system for stability and growth in drought prone farms – An application of parametric linear programming, *Indian Journal of Agricultural Economics*, 34(1): 27-42.
- SINGH A. J. & K. JAIN (1983) Farm planning under risk and uncertainty: An application of parametric linear programming, *Indian Journal of Agricultural Economics*, 38(2): 208-211.
- TIMOTHY RANDHIR O. & S. KRISHNAMOORTHY (1993) Optimal crop planning under production risk in tank fed south Indian farms, *Indian Journal of Agricultural Economics*, 48(4): 678-686.

PLANIFICATION OPTIMALE DES CULTURES EN GERANT LES RISQUES POUR LA SERICULTURE - UNE APPLICATION DU MODELE MOTAD

P. KUMARESAN, N. B. VIJAYA PRAKASH & R. K. DATTA

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

On a mis au point une planification optimale des cultures avec un compromis entre le risque et le rapport en intégrant des cultures, des activités laitières et la sériciculture en utilisant la Minimisation de la Deviation Absolue Totale (MOTAD). Cinq plans optimaux avec des objectifs doubles de minimisation du risque et d'atteinte du rapport escompté sont mis au point pour une ferme de 1,85 hectares. Dans les plans optimaux, le modèle ne recommande pas les cultures fourragères et la culture estivale de la paille de riz. La surface de culture du mûrier est constante dans tous les plans. Les plans normatifs développés proposent ainsi des changements par rapport au plan existant de manière à minimiser le risque et à obtenir un revenu stable.

INTRODUCTION

Le risque et l'incertitude sont considérés comme des contraintes importantes surtout pour la production agricole. Le risque affecte les décisions de production des fermiers, ce qui entraîne une inefficacité de la répartition des ressources pour les activités fermières. Ainsi, il est nécessaire d'intégrer le risque à la planification des récoltes dans la production agricole afin de mettre au point des plans plus réalistes (Hazell et Northon, 1986). De nombreux modèles de programmation mathématique comme la programmation du risque quadratique, la théorie du jeu, l'approche de perte admissible maximum, la minimisation de la déviation absolue totale (MOTAD), la programmation de Monte Carlo, le principe primordial de sécurité et la programmation stochastique existent pour évaluer le risque (Anderson et coll., 1977). Cependant, la plupart des applications pour l'agriculture se basent sur la programmation du risque quadratique ou sur les critères de décision de MOTAD. L'algorithme quadratique est cher à mettre en place pour les grands modèles. Le MOTAD donne des résultats similaires, qui peuvent être générés par un algorithme de programmation linéaire (Hazell, 1971). Des études ont été entreprises par Mruthyunjaya et Sirohi (1979), Biswinger (1980), Singh et Jain (1983), Timothy Randhir (1993) et Brajesh Kumar Jha et Dayanath Jha (1995) en Inde pour étudier le comportement de prise de risques des fermiers dans des régions différentes. Cependant, on n'a pas encore essayé de modéliser le comportement de prise de risques des fermiers en sériciculture. Dans cette étude, une planification optimale des cultures a été mise au point avec un compromis entre le risque et le rapport en intégrant des activités culturelles, laitières et séricoles à l'aide du modèle MOTAD.

METHODOLOGIE

Le MOTAD mis au point par Hazell (1971) et utilisé par Timothy Randhir et Krishnamoorthy (1993) et Jha (1996) a été employé dans cette étude avec les modifications requises. Les caractéristiques du modèle sont comme suit :

Fonction objective :

$$\text{Risque minimisé } Zr = \sum_{h=1}^5 pYh^{-}$$

où

Z = Valeur de la fonction objective

Yh = Valeur absolue de l'écart négatif en revenu brut à la h^{ème} année par rapport au profit moyen

Revenu escompté :

$$\sum_{i=1}^8 CiXi + \sum_{j=1}^4 CjDj - \sum_{i=1}^{12} WiLm - \sum_{j=1}^{12} WjLf - HiBULH - HjTRAH - liWC - \sum_{i=1}^5 PiFi - \sum_{i=1}^5 SiFODPi - \sum_{j=1}^5 SjFODSj = \lambda$$

où

Paramètres :

Ci = Marge brute obtenue d'une unité de culture / activité séricicole, i (Rs. / demi hectare)

Cj = Marge brute d'une unité d'activité laitière, j (Rs. / demi hectare)

Wi = Salaire (Rs.) payé à la main d'œuvre mâle pendant le i^{ème} mois

Wj = Salaire (Rs.) payé à la main d'œuvre femelle pendant le j^{ème} mois

Hi = Frais de location de bœufs (Rs. / jour)

Hj = Frais de location de tracteur (Rs. / heure)

li = Taux d'intérêt pour le fonds de roulement (%)

Pi = Prix unitaire des engrais N, P et K (Rs / kg) et de la fumure (Rs. / tonne), i concerne la récolte

Sj = Prix d'achat de l'ensilage et des farines, i pour le bétail (Rs. / kg)

Sj = Prix unitaire de vente de l'ensilage et des farines, j (Rs. / Kg)

λ = rapport escompté (Rs.)

Variables de décision :

Xi = Niveau de la i^{ème} récolte / activité séricicole (Nbre de demi hectares)

Dj = Niveau de la j^{ème} activité laitière (Nbre)

Lm = Quantité de main d'œuvre mâle nécessaire pendant le i^{ème} mois

Lf = Quantité de main d'œuvre femelle nécessaire pendant le j^{ème} mois

BULH = Quantité d'énergie bovine utilisée pour les récoltes et les activités séricicoles

TRAH = Quantité de tracteur utilisée pour les récoltes et les activités de sériciculture

WC = Niveau de fonds de roulement nécessaire (Rs.)

Fi = Quantité d'engrais (Kg) et de fumure (tonnes), i requise

FODPi = Quantité de fourrage et de farines, i achetée pour le bétail

FODSj = Quantité d'ensilage et de farines, j vendue

Soumis aux

Restrictions de terrain :

$$\sum a_{ij}Xi \leq LH$$

où

a_{ij} = Surface de terrain (demi hectares) utilisée par une unité de culture récoltée, i pendant le j^{ème} mois

LH = Avoir foncier (demi hectares)

Contraintes de main d'œuvre :

$$\sum M_{Lim}X_i + \sum M_{Lkm}D_k \leq LABM_m$$

$$\sum F_{Lim}X_i + \sum F_{Lkm}D_k \leq LABF_m$$

où

M_{Lim} = Quantité de main d'œuvre mâle nécessaire pour la $i^{ème}$ culture pendant le $m^{ème}$ mois

M_{Lkm} = Quantité de main d'œuvre mâle nécessaire pour la $k^{ème}$ activité laitière pendant le $m^{ème}$ mois

F_{Lim} = Quantité de main d'œuvre femelle nécessaire pour la $i^{ème}$ culture pendant le $m^{ème}$ mois

F_{Lkm} = Quantité de main d'œuvre femelle nécessaire pour la $k^{ème}$ activité laitière pendant le $m^{ème}$ mois

$LABM_m$ = Quantité de main d'œuvre mâle totale disponible pendant le $m^{ème}$ mois

$LABF_m$ = Quantité de main d'œuvre femelle totale disponible pendant le $m^{ème}$ mois

Contraintes de fonds de roulement :

$$\sum K_iX_i + \sum K_jD_k + \sum P_wC_w - C_w \leq W_C$$

où

K_i = Fonds de roulement nécessaire pour une unité d'activité de culture / d'activité séricicole, X_i

K_j = Fonds de roulement nécessaire pour une unité d'activité laitière, D_j

P_w = Taux d'intérêt du fonds de roulement à emprunter (%)

C_w = Montant de fonds de roulement nécessaire (Rs)

W_C = Montant de fonds de roulement disponible pendant l'année

Intégration des entreprises de culture et de laiterie avec les nutriments requis pour les cultures :

$$\sum F_iX_i - \sum F_kD_k - \sum F_sX_s - F_p = 0$$

F_i = Quantité de fumure (tonnes) requise pour la $i^{ème}$ activité de culture

F_k = Quantité de fumier de ferme (tonnes) produite à partir de la $j^{ème}$ activité laitière

F_s = Quantité de fumure (tonnes) produite à partir de l'activité séricicole

F_n = Quantité de fumure (tonnes) achetée

X_s = niveau d'activité séricicole

Intégration des cultures et entreprises laitières par rapport à l'ensilage nécessaire au bétail :

$$\sum R_kD_k - \sum R_iX_i - R_p + R_s = 0$$

où

R_i = Quantité d'ensilage (kg) produit à partir de la $i^{ème}$ culture

R_k = Quantité d'ensilage (kg) nécessaire pour la $j^{ème}$ activité laitière

R_p = Quantité d'ensilage (kg) acheté

R_s = Quantité d'ensilage (kg) vendu

Intégration des entreprises culturales et laitières par rapport aux farines nécessaires pour le bétail :

$$\sum C_kD_k - \sum C_iX_i - C_p + C_s = 0$$

où

C_i = Quantité de farines (kg) produites à partir de la $i^{\text{ème}}$ culture

C_k = Quantité de farines (kg) nécessaires pour la $j^{\text{ème}}$ activité laitière

C_p = Quantité de farines (kg) achetées

C_s = Quantité de farines (kg) vendues

Ecarts par rapport aux contraintes de profit moyen :

$$\sum (C_{ih} - G_i)X_i + \sum (C_{kh} - G_k)D_j + Y_h^- \geq TR$$

où

C_{ih} = Marge brute de la $i^{\text{ème}}$ activité de culture pendant la $h^{\text{ème}}$ année (Rs. / demi-hectare)

G_i = Valeur moyenne du rapport brut de la $i^{\text{ème}}$ activité de culture

C_{kh} = Marge brute de la $j^{\text{ème}}$ activité laitière dans la $h^{\text{ème}}$ année (Rs. / tête)

G_k = Valeur moyenne du rapport brut de la $k^{\text{ème}}$ activité laitière

TR = Profit cible

Restriction maximum :

$$X_i \leq X_i^* ; D_k \leq D_k^*$$

où

X_i^* = Surface maximum possible (demi-hectares)

D_k^* = Nombre maximum possible de bétail

Contraintes non-négatives :

$$X_i, D_k \geq 0$$

La fonction objective est définie par le critère double de paramétrage du rapport escompté et de minimisation du risque associé au rapport escompté. Les variables de décision incluses dans le modèle de programmation linéaire sont la surface à allouer aux différentes entreprises de culture et le nombre de différents types de bétail à élever à différents niveaux de risques et de rapport escompté. De plus, la location de main d'œuvre, l'emprunt du capital, l'achat des engrais et l'achat ou la vente d'ensilage sont incorporés dans le modèle.

Les paramètres utilisés dans le MOTAD sont les suivants :

□ Les revenus provenant de différentes entreprises de culture et du bétail sont estimés à partir des données recueillies auprès de l'échantillon de fermiers.

□ On suppose que le niveau initial de rapport paramétré s'élève à 10 pour-cent de moins que le rapport existant de la ferme. Le rapport maximum paramétré est estimé comme le rapport potentiel de la ferme obtenu avec la solution de programmation linéaire déterministe. Ainsi, cinq plans normatifs sont développés en fixant les rapports entre les rapports paramétrés maximums et minimums.

Les contraintes du modèle sont définies d'après les considérations suivantes :

□ Puisque chaque culture a des saisons de croissance différentes, la contrainte du terrain est définie avec 12 périodes restreintes.

□ La taille moyenne d'une ferme dans l'échantillon de fermiers est de 1,80 hectares, ce qui est considéré comme la surface possible maximum disponible pour les cultures.

□ Les nutriments requis pour les cultures sont obtenus à partir de la bouse de vache produite par le bétail, des déchets séricicoles et du fumier de ferme et les engrais sont achetés à l'extérieur.

□ Les ensilages et les farines nécessaires pour le bétail sont obtenus à partir des cultures. Les nourritures sont achetées à l'extérieur en période de manque et vendues quand elles sont en excès.

Les données sont recueillies à partir de 30 fermiers sélectionnés au hasard pratiquant l'agriculture, la sériciculture et une activité laitière dans 6 villages dans le taluk Salem du district de Salem dans le Tamil Nadu en octobre 1998.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cinq plans optimaux avec des objectifs doubles de minimisation des risques et d'atteinte du revenu escompté sont mis au point pour une taille de ferme moyenne de 1,80 hectares et les résultats sont présentés dans le Tableau I. Le plan 1 donne le revenu maximum escompté et présente aussi le risque maximum. D'autre part, le revenu et le risque escomptés sont minimums avec le Plan 5.

La surface totale cultivée baisse progressivement du Plan 1 au Plan 5. La paille de riz I, qui est cultivée entre août et décembre, occupe une place stable dans tous les plans optimaux et la surface occupée par la paille de riz augmente avec les plans. Cette présence plus importante pourrait être due à un niveau plus faible de risques avec des niveaux de revenus plus faibles et au composant plus élevé d'écart négatif de la culture (Timothy Randhir et Krisnamoorthy, 1993). La baisse de cette culture dans les plans précédents pourrait être due à la compétition des autres cultures commerciales. La paille de riz II (culture d'été) cultivée pendant les mois de février à juin n'est récoltée qu'avec le plan 1 qui correspond à un niveau de revenu plus élevé. Mais elle a été éliminée des autres plans à cause du risque élevé que comporte la culture de la paille de riz en été à cause du manque d'eau.

La surface allouée à la banane et au tapioca baisse dans les plans suivants, ce qui montre qu'ils obtiennent la préférence lorsqu'on attend des revenus plus élevés. Bien que le tapioca et la banane offrent des revenus élevés, ces cultures sont associées à un risque élevé à cause des grandes fluctuations de rendement et de prix. Le coton est présent dans tous les plans et il occupe 0,3 hectares dans les plans 1 et 2 et 0,25 hectares dans les autres plans. On observe que l'arachide qui est une culture oléagineuse associée à un rendement et des fluctuations de prix élevés est présente du plan 1 au plan 3. Le mûrier est compris dans tous les plans avec une surface de 0,25 hectares, ce qui indique que le mûrier donne un revenu stable aux fermiers par rapport aux autres cultures. Le prix du cocon et le rendement du mûrier moyens ne fluctuent pas beaucoup pendant la période étudiée et ainsi, le revenu séricicole est plus ou moins stable. Les cultures fourragères ne sont pas sélectionnées dans la solution optimale parce qu'elles donnent un faible revenu par demi-hectare par rapport aux autres cultures. Comme le modèle recommande la culture de la paille de riz, du sorgho, de l'arachide et du mûrier et comme les feuilles de mûrier inutilisées et les feuilles sèches de la paille de riz, du sorgho et de l'arachide sont données au bétail, le modèle pourrait ne pas recommander l'inclusion des plantes fourragères dans les plans optimaux.

Le modèle recommande 2,96 unités de lait de buffle dans les plans 1 et 2 et 3,34 unités dans les autres plans. L'augmentation de la surface allouée au lait de buffle dans les plans pourrait être due au niveau de risque plus faible lorsque les niveaux de revenus sont plus faibles. La chèvre ne fait partie que des 3 premiers plans, ce qui montre qu'elle est préférable quand on souhaite des revenus plus élevés. Le bœuf et la vache ne sont pas sélectionnés dans les solutions optimales parce qu'ils donnent un revenu plus faible par rapport au lait de buffle.

L'utilisation des ressources telles que le terrain, la main d'œuvre et le fonds de roulement baissent dans les plans suivants. Il y a une baisse de la surface totale dans les plans fermiers lorsqu'on cherche à minimiser les risques. Cela entraîne une baisse des autres ressources complémentaires à savoir de la main d'œuvre et du capital. Le risque par unité de capital baisse dans les plans successifs, ce qui indique qu'il faut une quantité plus importante de capital quand on souhaite des revenus plus élevés. L'écart négatif moyen par rapport à la moyenne baisse plus vite que les profits, ce qui indique une diminution des possibilités de compromis entre le revenu escompté et la variabilité du revenu. La raison en est due à l'occupation par des cultures à risques relativement plus élevés ce qui donne un écart plus élevé dans les premiers plans que dans les plans suivants.

Le plan normatif est mis au point en utilisant la technique d'interpolation linéaire de Timothy Randhir et Krishnamoorthy (1993) et on le compare au plan existant (Tableau II). Le plan normatif conseille une plus grande affectation de terrain à la banane, au coton, à l'arachide et au mûrier que ce qui leur est alloué actuellement. Bien qu'avec le plan normatif il y ait une petite baisse de la paille de riz I, du tapioca et du sorgho, la paille de riz II et l'ensilage ne sont pas économiques au niveau donné des dotations en ressources.

RESUME ET CONCLUSIONS

L'objectif primaire de cet article est de mettre au point des plans optimaux de culture avec un compromis entre le risque et le rapport, en intégrant des entreprises de culture, de production laitière et de sériciculture. Cinq plans optimaux avec des objectifs doubles de minimisation du risque et d'atteinte du rapport escompté ont été mis au point pour une taille moyenne de ferme de 1,85 hectares en utilisant le modèle MOTAD. Le modèle ne recommande pas les cultures fourragères et la culture estival de la paille de riz dans les plans optimaux. La surface allouée au mûrier est constante dans tous les plans. La paille de riz, le tapioca, le coton et le sorgho sont inclus dans les plans optimaux. Ainsi, les plans normatifs mis au point conseillent des changements par rapport au plan existant de manière à minimiser le risque et à obtenir un revenu stable.

Comme le risque affecte les décisions de production des fermiers et entraîne une inefficacité de la distribution des ressources allouées aux activités fermières, il est nécessaire que les décisions politiques de planification des cultures en sériciculture prennent en compte l'élément de risque dans la production des cultures pour mettre au point des plans plus réalistes. La méthodologie présentée dans cet article peut être adoptée avec les modifications nécessaires quand on souhaite mettre au point des plans régionaux intégrant différentes activités fermières.

EFFICIENT REGENERATION FROM MATURE LEAF EXPLANTS OF INDIAN MULBERRY VIA ORGANOGENESIS

A. KAPUR, S. BHATNAGAR & P. KHURANA*

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi, India.

Leaf explants of two elite cultivars of mulberry, namely, K-2 and DD, were cultured on various media for regeneration. The explants were obtained from field-grown plants, in vitro raised seedlings, and in vitro maintained axillary shoot cultures. The regeneration percentage was maximum (up to 60 %) from leaf explants of field-grown plants followed by the leaf explants taken from in vitro cultures (up to 40 %). The highest percent of regeneration (61.4 %) was observed on MS + IAA (2 mg/l) + TDZ (1.1 mg/l) + AgNO₃ (2mg/l) in both the cultivars. TDZ played an important role in the induction of adventitious buds (up to 60 %) from the basal portion of leaf with 8-10 shoots/culture. Upon regular subculture, regeneration from the callus could be observed over a year with as many as 15-20 shoots/culture. Histological examination indicated regeneration by the organogenetic mode. Rooting was obtained in 95-100 % shoots and field survival rate was 80-85 %.

Key words : *Morus indica*, leaf explants, callus, regeneration, TDZ.

INTRODUCTION

Over 90 % of Indian silk is mori silk as mulberry foliage constitutes the chief feed for the silkworm (Datta, 1994). Besides being an important host plant, mulberry is also one of the important multipurpose trees and referred to as Kalpavaruksha (Dandin and Ramesh, 1987). Mulberry is conventionally propagated through cuttings. However, many desired cultivars do not root easily or have low rooting ability. Also, propagation *via* cuttings is restricted to only certain months of the year, and the saplings obtained by cuttings when compared with micropropagated plants also show inferior morphogenic vigor (Zaman *et al*, 1997). Propagation through seeds is undesirable owing to cross-pollination and heterozygosity in the plants and the dioecious nature of the genus is a serious barrier to genetic improvement by conventional hybridization techniques. Tissue culture methods are, therefore, preferred for plant multiplication of elite strains.

Mulberry is one of the recalcitrant species in terms of tissue culture, although many attempts have been made using different explants i.e., leaf, meristem, cotyledon, hypocotyl, and node explants (Oka and Ohiyama, 1981, Kim *et al*, 1985, Mhatre *et al*, 1985, Jain and Datta, 1992, Thinh and Katagiri, 1994, Tewari *et al*, 1999, Bhatnagar *et al*, 2000). Production of adventitious shoot buds seems to be one of the most promising methods for mulberry propagation (Oka and Ohiyama, 1981, Kim *et al*, 1985, Mhatre *et al*, 1985) and could be adapted for gene transformation for mulberry breeding. However, lack of efficient regeneration protocols hamper the application of molecular gene technology to mulberry improvement programmes.

* Corresponding author, Tel: 91-11-4675096, Fax: 91-11-6885270.

TDZ is a potent morphoregulator of plant differentiation (Capelle *et al*, 1983, Malik and Saxena, 1992) and also an inducer of somatic embryogenesis, especially in woody plant species (Gill and Saxena, 1992, 1993, Visser *et al*, 1992). Our earlier work indicates TDZ being stimulatory for bud induction in mulberry (Tewari *et al*, 1999, Bhatnagar *et al*, 2001). In the present communication we report *in vitro* differentiation of two elite cultivars of *Morus indica*, K-2 and DD, from leaf base callus and maintenance of the regeneration potential for over a year.

MATERIALS AND METHODS

Explant source:

Two elite cultivars of *Morus indica*, K-2 and DD, were used for the present investigation. Leaves as explants were taken from three different sources :

A. *In vivo* or field-grown material ; young leaves were excised from 3-4 years old mature trees grown in the departmental garden. The leaves were excised and cultured after sterilization.

B. *In vitro* raised seedling ; seeds collected from the mature fruits and stored at 28-30°C, were germinated on MS (Murashige and Skoog, 1962) basal medium. Leaf explants were taken from 10-15 day-old seedlings.

C. *In vitro* axillary buds ; axillary buds node explants were excised from the mature trees and after surface sterilization cultured and maintained on MS + 1 mg/l BAP (Tewari *et al*, 1999). Leaves from 3-week old axillary bud cultures maintained on BAP supplemented medium were used as explants.

Culture Pretreatment and Conditions:

The material from field-grown plants were sterilized with 0.1 % HgCl₂ (Qualigens, India.) for 8-10 minutes and rinsed 5-6 times with sterile distilled water prior to culture. *In vitro* axillary buds and seeds were cultured in the culture tubes (Tewari *et al*, 1999). Leaf explants were cultured in the Petri plates after excising the petiole. The culture media were gelled with 0.8 % (w/v) agar (Hi-Media, India) ; prior to autoclaving at 104 kPa at 121°C for 15 minutes and the pH adjusted to 5.8. Each experiment was replicated two or three times and each replicate comprised 24-36 cultures/treatment. Subcultures/transfers were made every four weeks.

Cultures were maintained in the culture room at 25 ± 1°C. Initially, cultures were maintained in dark for 4-6 weeks, thereafter, a photoperiodic regime of 16-hour light and 8-hour darkness was provided. Photosynthetic photon flux of 65 nmol m⁻² s⁻¹ was maintained by cool white fluorescent tubes (Phillips 40 W)

Four media were used for regeneration in mulberry RM1 (MS + 1.1 mg/l TDZ), RM2 (MS + 1.1 mg/l TDZ + 2 mg/l BAP), RM3 (MS + 2 mg/l IAA + 2 mg/l BAP + 2 mg/l AgNO₃) and RM4 (MS + 2 mg/l IAA + 1.1 mg/l TDZ + 2 mg/l AgNO₃).

Plantlet formation:

Shoots formed *in vitro* were excised and cultured on rooting medium (MS + 1 mg/l NAA or 0.1 % activated charcoal). Plantlets with well-developed roots were transferred to earthen pots (diameter 12-15 cm) containing Soilrite : autoclaved soil (1:1).

Histological Investigations:

Callus with adventitious buds were fixed in FAA (5 ml formaldehyde + 5 ml glacial acetic acid + 90 ml of 70 % ethanol) and processed for paraffin embedding and microtomy. Paraffin sections were cut 10-12 µm thick, stained with 0.1 % Safranin and 0.1 % alcoholic Fast Green and mounted in DPX (Johansen, 1940).

RESULTS AND DISCUSSION

On MS basal medium the leaf explants neither callused nor showed any sign of differentiation. Leaf explants (*in vivo/in vitro*) when cultured on MS medium supplemented with IAA, BAP, TDZ and AgNO₃ either alone or in combination, showed morphogenesis (Fig. 1). Upon culture of the leaf explants from various sources on medium supplemented with TDZ, regeneration was observed from both the cultivars (Fig. 2). The regeneration percentage was maximum from the *in vivo* leaf explants on MS + 1.1 mg/l TDZ followed by the *in vitro* raised explants. The callus formed was from the transitional zone between the petiole and midrib and later differentiated shoot buds (Fig. 1d-g). These results are similar to the observations of Oka and Ohyama (1981) and suggests the morphogenic potential of the transitional zone.

When MS medium was supplemented with different growth regulators, with and without TDZ, the best response was observed on MS + 2 mg/l IAA + 1.1 mg/l TDZ + 2 mg/l AgNO₃ (RM4). Addition of BAP to TDZ reduced the response, but presence of IAA and AgNO₃ enhanced the regeneration potential of TDZ from both the *in vitro*-raised and field-grown explants, in the cultivars K-2 and DD (Fig. 3a & b). A similar regeneration pattern of both K-2 and DD cultivars on the four media tested, suggest the relative cultivar independence. The results also indicate that TDZ is better than BAP in inducing shoot buds from the callus of leaf explants similar to the response obtained for multiple shoot formation by bud induction (Tewari *et al.*, 1999). The presence of AgNO₃ is not only beneficial but also improves the quality of the regenerants.

As indicated earlier the best regeneration response was observed on medium containing AgNO₃ with TDZ and IAA. Ethylene, a gaseous plant hormone seems to be involved in growth and differentiation of tissue cultures *in vitro* (Lieberman, 1979, Yang and Hoffman, 1984). Silver nitrate, a potent inhibitor of ethylene action has been shown to promote regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* (Purnhauser *et al.*, 1987), *Zea mays* (Vain *et al.*, 1989), *Brassica campestris* (Chi and Pua, 1989) and *Daucus carota* (Roustan *et al.*, 1990). Ethylene also affects polyamines metabolism by inhibiting arginine decarboxylase activity as shown in carrot somatic embryogenesis from cell suspension cultures (Roustan *et al.*, 1990). In mulberry also, AgNO₃ helps in increasing the induction of adventitious bud by inhibiting the endogenous ethylene level of the explants. Many plant species contain high levels of the ethylene precursor [1-aminocyclopropane-2-carboxylic acid (ACC)] (Jain *et al.*, 1996) and according to Cho and Kasha (1989), an optimal level of ethylene synthesis is essential for differentiation. Therefore, the concentration of ACC in tissue culture and relatedly the exogenous application of AgNO₃ would prove critical to achieve the optimal level of ethylene in cultures. Nonetheless, ethylene remains one of the important factors involved in the induction of organogenesis.

Histological examination of the leaf explant indicated that the process of differentiation in 5-week-old cultures was fast and induction of primordia involved cell divisions and the appearance of small protuberances and formation of shoot and leaf primordia (Fig. 1 d-g). After 5 to 7 weeks of culture, the basal region of the leaf blade enlarged and formed primordial structures, which developed into healthy, green shoot buds. Generally 6-8 shoot buds developed/explant. Along with the differentiation of shoot buds extensive callus formation occurred at the base of the leaf (Fig. 1a). The callus was pale green, nodular and compact. The callus differentiated 15-20 shoot buds on the same medium (Fig 1 b) ; but when subcultured on MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA₃ + 2 mg/l AgNO₃, shoot bud number increased up to 3-4 times and well developed shoots appeared within the next couple of weeks (Fig. 1 h&i).

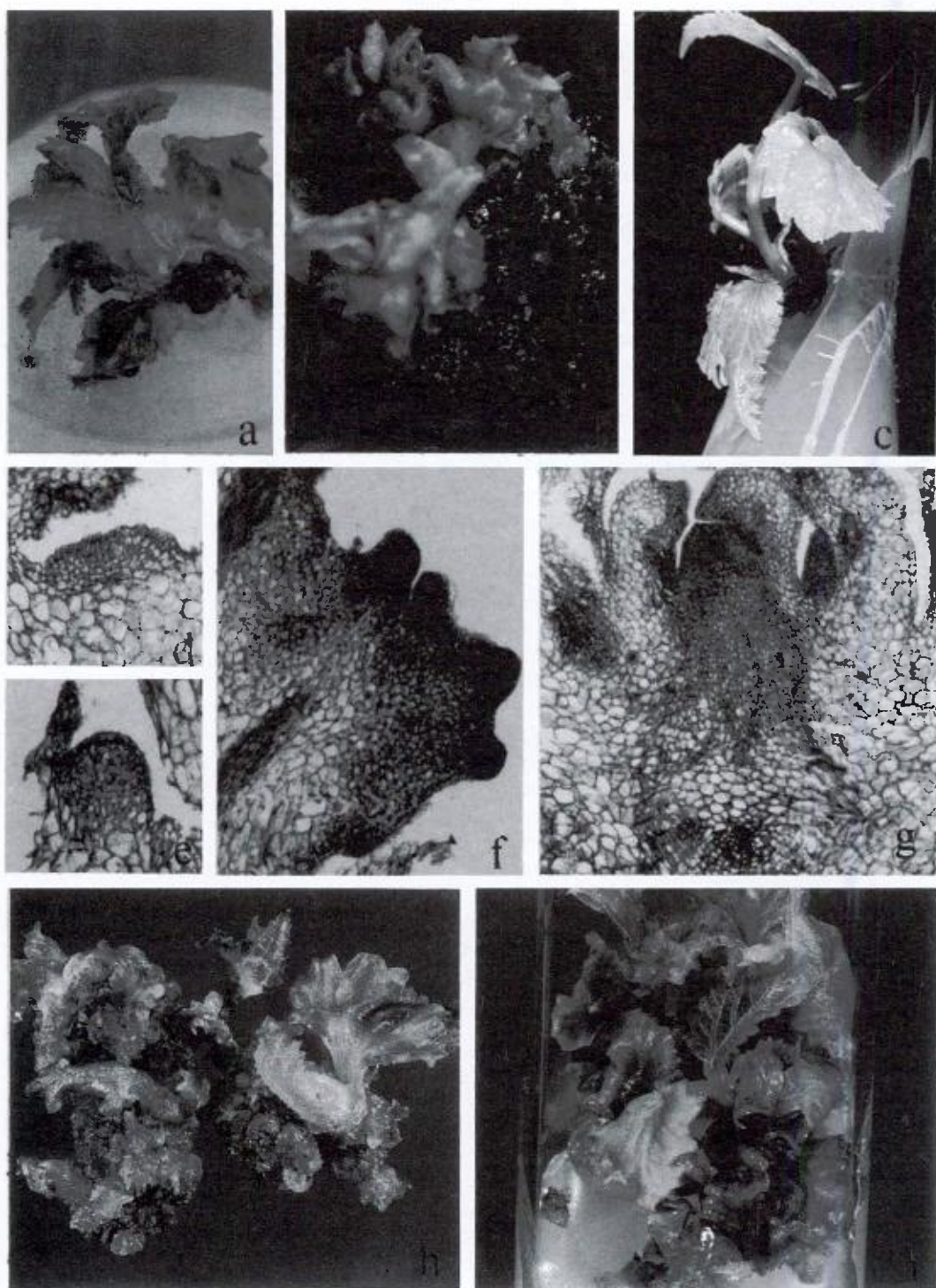


Fig 1. Organogenesis from *Morus indica* leaf explants of mature plants

- a. 5-week-old leaf explant from K-2 cultured on RM4 showing shoots and callus induced from the leaf base.
 b. Callus showing extensive shoot bud formation after subculturing on MS + 0.5mg/l BAP + 0.5 mg/l GA₃ + 2 mg/l AgNO₃.
 c. A plantlet on MS + 0.1 % NAA.
 d-g. Histological details showing induction of shoot buds via differentiation.
 h. Eleven months old leaf base callus, on MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA₃ + 2 mg/l AgNO₃ showing numerous shoot buds.
 i. Emergence of multiple shoots from the above mentioned cultures after a month.

Fig. 1. Organogénèse à partir des explants foliaires de plants adultes de *Morus indica*.

- a. Explant foliaire de 5 semaines, extrait de K-2 cultivé sur RM4 montrant des pousses et des cals induits à partir de la base foliaire.
 b. Cals montrant une formation de bourgeons et de pousses extensives après un repiquage sur MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃ + 2 mg/l AgNO₃.
 c. Un jeune plant sur MS + 0,1 % NAA.
 d-g. Détails histologiques montrant une induction de bourgeons et de pousses par différenciation.
 h. Cals à base foliaire de 11 mois, sur MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃ + 2 mg/l AgNO₃ montrant de nombreux bourgeons de pousses.
 i. Emergence de pousses multiples à partir des cultures mentionnées ci-dessus après un mois.

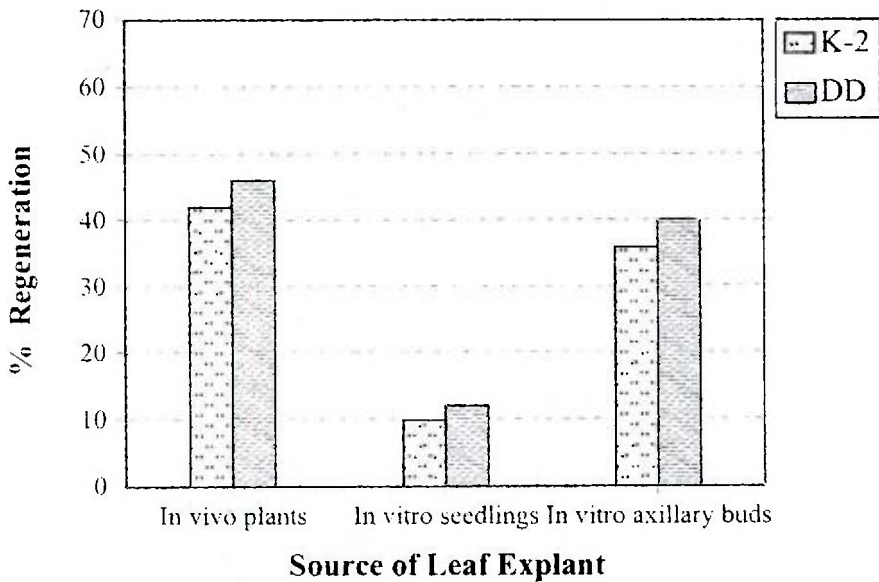


Fig. 2. Regeneration response in leaf explants of *Morus indica* cultivars K-2 and DD derived from three different sources and cultured on TDZ (1.1 mg/l) for 45 days.

Fig. 2. Réaction de régénération dans les explants foliaires de *Morus indica* chez les cultivars K-2 et DD tirés de trois sources différentes et cultivés sur TDZ (1,1 mg/l) pendant 45 jours.

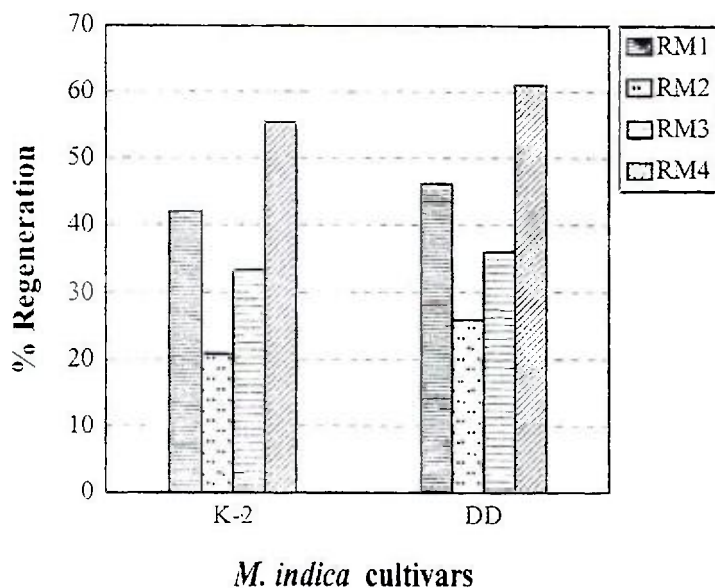


Fig. 3a. Regeneration from field-grown leaf explants of *Morus indica* cultivars K-2 and DD on MS supplemented with various hormones.

Fig. 3a. Régénération à partir d'explants foliaires de *Morus indica* cultivé dans les champs, cultivars K-2 et DD sur MS supplémenté en hormones variées.

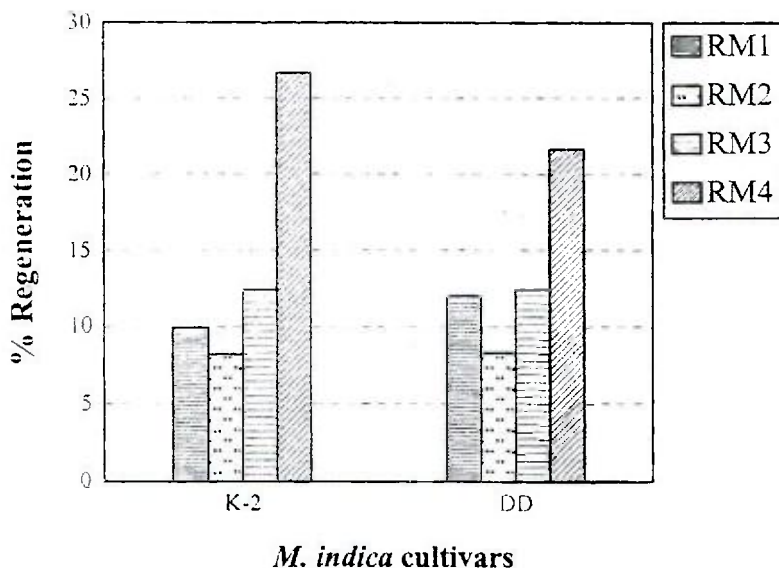


Fig. 3b. Regeneration from leaf explants (*in vitro* raised seedlings) of *Morus indica* cultivars K-2 and DD on MS medium supplemented with various hormones.

Fig. 3b. Régénération à partir d'explants foliaires (plantules élevées *in vitro*) de *Morus indica*, cultivars K-2 et DD sur MS supplémenté en hormones variées.

Shoots, upon excision from callus, were subcultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA or with 0.1 % activated charcoal for rooting. Rooting occurred within 2 weeks from the basal region of the shoots in 90-95 % of the cultures (Fig. 1c). These rooted plantlets were transferred to earthen pots in Soilrite/autoclaved soil and irrigated with 0.5 % MS salts initially on alternate days and thereafter twice a week for a month and then transferred to the field. After hardening, the survival rate was 80-85 % in the field.

In contrast to the results obtained by Oka and Ohyama (1981), Mhatre *et al* (1985) and Kim *et al* (1985), in the present investigation, we observed that presoaking or pretreatment of the explants with BAP is not essential for regeneration. We also observed a higher percentage of regeneration (up to 60 %) in mature leaf explants of elite, field-grown, cultivars of *M. Indica* namely, K-2 and DD, which has not been reported so far. The high morphogenic potential of mature leaf explants may be due to their activated physiological status consequent to the emergence of the dormant lateral bud upon pruning of the field plants. A similar activation of the dormant buds has also been reported for *Lathyrus sativus*, where in the activated axillary bud meristems were able to overcome the inherent genotypic recalcitrance (Gharyal and Maheshwari, 1983).

In conclusion, the present finding on the two elite cultivars of *M. indica* thus demonstrates the possibility for mass propagation of mulberry through culture of leaves from mature plants. This protocol would also be of great advantage not only for multiplying certain cultivars of *Morus*, which are difficult to root, but also aid in gene transfer programmes of Indian mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Department of Biotechnology, Government of India, New Delhi. SB acknowledges the award of a Junior and a Senior Research Fellowship by the Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi.

REFERENCES

- BHATNAGAR S., KAPUR A., KHURANA P. (2001) TDZ-mediated differentiation in commercially valuable Indian mulberry, *Morus indica* cultivars K2 and DD. *Plant Biotech.*, 18, 61-65.
- CAPELLE SC., MOK DWS., KIRCHNER SC., MOK MC. (1983) Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N^6 (2'-Isopentenyl) [8- ^{14}C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol.*, 73, 796-802.
- CHI GL., PUA EC. (1989) Ethylene inhibitors enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica campestris* spp. *Chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant Sci.*, 64, 243-250.
- CHO UH., KASHA KJ. (1989) Ethylene production and embryogenesis from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Rep.*, 8, 415-417.
- DANDIN SB., RAMESH SR. (1987) A kalpavruksha called mulberry. *Indian Silk*, 87, 49-53.
- DATTA RK. (1994) Production and demand of silk in India. In : *Global Silk Scenario-2000*, Proceedings of the International Conference on Sericulture. Oxford, IBM, pp. 44-54.
- GHARYAL PK., MAHESHWARI SC. (1983) Genetic and physiological influences on differentiation in tissue cultures of a legume, *Lathyrus sativus*. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 123-126.
- GILL R., SAXENA PK. (1992) Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanuts (*Arachis hypogaea*) : promotive role of thidiazuron. *Can. J. Bot.*, 70, 1186-1192.
- GILL R., SAXENA PK. (1993) Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L: induction by TDZ of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Rep.*, 12, 154-159.

- JAIN A. K., DATTA R. K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis*): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 29, 43-50.
- JAIN MS., SOPORY SK., VEILLEUX R. E. (EDS) (1996) *In vitro* haploid Production in Higher Plants Vol. 1. Fundamental Aspects and Methods. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Boston, London pp. 16339.
- JOHANSEN DA. (1940) *Plant Microtechnique*. New York, London, McGraw-Hill Book Company, Inc.
- KIM H. R., PATEL K. R., THORPE T. A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. *Bot. Gaz.*, 146, 335-346.
- LIEBERMAN M. (1979) Biosynthesis and action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30, 533-591.
- MHATRE M., BAPAT VA., RAO PS. (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica*). *Plant Cell Rep.*, 4, 78-80.
- MALIK K. A., SAXENA P. K. (1992) Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N⁶benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186, 384-389.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- OKA S., OHYAMA K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba* L.). *Can. J. Bot.*, 59, 68-74.
- PURNHAUSER L., MEDGYESY P., CZAKO M., DIX P.J., MARTON L. (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* via tissue culture using ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.*, 6, 1-4.
- ROUSTAN JP., LATCHE A., FALLOT J. (1990) Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action, effect on arginine decarboxylase activity. *Plant Science*, 67, 89-96.
- TEWARI A., BHATNAGAR S., KHURANA P. (1999) *In vitro* response of commercially valuable varieties of *Morus* species to thidiazuron and activated charcoal. *Plant Biotech.*, 16, 413-418.
- THINH NT., KATAGIRI K. (1994) Induction of adventitious buds in mulberry leaves by thidiazuron. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 63, 514-516.
- VAIN P., YEAN H., FLAMENT P. (1989) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 18, 143-151.
- VISSER C., QURESHI JA., GILL R., SAXENA PK. (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiol.*, 99, 1704-1707.
- YANG SF., HOFFMAN NE. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 155-189.
- ZAMAN A., ISLAM R., JOARDER O. I. (1997) Field performance and biochemical evaluation of micropropagated mulberry plants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 51, 61-64.

REGENERATION EFFICACE A PARTIR D'EXPLANTS DE FEUILLE ADULTE CHEZ LE MURIER INDIEN

A. KAPUR, S. BHATNAGAR & P. KHURANA*

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi, Inde.

*Des explants de feuilles de deux excellents cultivars, à savoir K-2 et DD ont été cultivés sur des milieux différents pour être régénérés. Les explants sont obtenus à partir de plants cultivés sur le terrain, de plantules obtenues *in vitro* et de cultures de pousses axillaires maintenues *in vitro*. Le pourcentage de régénération est maximum (jusqu'à 60 %) à partir des explants de feuilles provenant de plants cultivés sur le terrain, suivis par les explants de feuilles pris sur des cultures *in vitro* (jusqu'à 40 %). On observe le pourcentage de régénération le plus élevé (61,4 %) avec du MS + IAA (2 mg/l) + TDZ (1,1 mg/l) + AgNO₃ (2 mg/l) chez les deux cultivars. Le TDZ joue un rôle important dans l'induction de bourgeons adventifs (jusqu'à 60 %) au niveau de la partie basale de la feuille avec 8 à 10 pousses par culture. Au cours de repiquages réguliers, on peut observer une régénération à partir des cals sur une année avec jusqu'à 15 à 20 pousses / culture. L'examen histologique indique une régénération par voie organogénétique. On obtient un racinement de 95 à 100 % des pousses et le taux de survie sur le terrain est de l'ordre de 80 à 85 %.*

INTRODUCTION

Plus de 90 % de la soie indienne est de la soie "mûrier" car le feuillage du mûrier constitue la nourriture principale du ver à soie (Datta, 1994). Le mûrier est non seulement une plante hôte importante mais aussi l'un des arbres importants à usage multiple, que l'on désigne sous le nom de Kalpavaruksha (Dandin et Ramesh, 1987). De manière conventionnelle, on multiplie le mûrier par bouturage. Cependant, de nombreux cultivars désirables ne racinent pas facilement ou ont une faible capacité de racinement. Ainsi, la multiplication par boutures est limitée à certains mois de l'année, de plus les plantules obtenues par bouturage ont une vigueur morphogénétique inférieure quand on les compare aux plants micro-multipliés (Zaman et coll., 1997). La multiplication par les graines est indésirable à cause de la pollinisation croisée et de l'hétérozygotie des plantes et la nature dioïque du genre est un obstacle important à l'amélioration génétique par des techniques d'hybridation conventionnelle. On préfère donc les méthodes de cultures tissulaires pour la multiplication des plants des souches excellentes.

Le mûrier est l'une des espèces récalcitrantes à la culture tissulaire bien que de nombreux essais aient été faits en utilisant différents explants, en l'occurrence la feuille, le méristème, le cotylédon, l'hypocotyle et les explants nodaux (Oka et Ohiyama, 1981 ; Kim et coll., 1985 ; Mhatre et coll., 1985 ; Jain et Datta, 1992 ; Thinh et Katagiri, 1994, Tewari et coll., 1999 ; Bhatnagar et coll., 2000). La production de bourgeons de pousses adventives semble être l'une des méthodes les plus prometteuses pour la multiplication du mûrier (Oka et Ohiyama, 1981 ; Kim et coll., 1985 ; Mhatre et coll., 1985) et pourrait être adoptée pour la transformation génétique pour le lignage du mûrier.

* Auteur auquel adresser la correspondance, Tel : 91-11-4675096, Fax : 91-11-6885270.

Cependant, le manque de protocoles de régénération efficaces est un obstacle pour appliquer la technologie de génétique moléculaire aux programmes d'amélioration du mûrier.

Le TDZ est un morphorégulateur puissant de différenciation des plantes (Capelle et coll., 1983 ; Malik et Saxena, 1992), il induit aussi l'embryogenèse somatique surtout chez les espèces de plantes ligneuses (Gill et Saxena, 1992, 1993, Visser et coll., 1992). Nos travaux précédents ont montré que le TDZ stimule l'induction des bourgeons chez le mûrier (Tewari et coll., 1999, Bhatnagar et coll., 2001). Dans cet article, nous rapportons une différenciation *in vitro* chez deux cultivars exceptionnels de *Morus indica*, K-2 et DD à partir d'un eal basal de la feuille et le maintien du potentiel de régénération pendant un an.

MATERIELS ET METHODES

Source de l'explant :

Deux cultivars exceptionnels de *Morus indica*, K-2 et DD sont utilisés pour cette étude. Les feuilles utilisées comme explants sont obtenues à partir de trois sources différentes :

A. Matériel eultivé *in vitro* ou sur le terrain ; les jeunes feuilles sont excisées sur des arbres adultes de 3 à 4 ans cultivés dans la mûraie du Département. Les feuilles sont excisées et eultivées après stérilisation.

B. Semis eultivés *in vitro* ; les graines sont recueillies sur des fruits murs et stockées à 28-30° C ; elles sont ensuite mises à germer sur un milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962). Les explants de feuilles sont pris sur des plantules de 10 à 15 jours.

C. Bourgeons axillaires *in vitro* ; les explants nodaux de bourgeons axillaires sont excisés chez des arbres adultes et après avoir stérilisé leur surface, ils sont eultivés et maintenus dans du MS + 1 mg / l BAP (Tewari et coll., 1999). Les feuilles provenant de cultures de bourgeons axillaires de trois semaines maintenues sur un milieu additionné de BAP sont utilisées eomme explants.

Conditions de culture et pre-traitement :

Le matériel provenant de plants eultivés sur le terrain est stérilisé avec du HgCl₂ à 0,1 % (Qualigens, Inde) pendant 8 à 10 minutes et rincé 5 à 6 fois dans de l'eau distillée stérile avant la culture. Les graines et les bourgeons axillaires *in vitro* sont eultivés dans des tubes de culture (Tewari et coll., 1999). Les explants de feuilles sont eultivés dans des boîtes de Petri après avoir excisé leur pétiole. Le milieu de culture est gélifié avec de l'agar à 0,8 % (p / v) (Hi-Media, Inde) avant d'être autoclavé à 104 kPa à 121° C pendant 15 minutes et le pH est ajusté à 5,8. Chaque expérience est réalisée deux à trois fois et chaque répétition comprend 24 à 36 cultures / traitement. Les repiquages / transferts sont faits toutes les quatre semaines.

Les cultures sont maintenues dans la pièce de culture à 25 ± 1° C. Au début, les cultures sont maintenues dans l'obscurité pendant 4 à 6 semaines, puis par la suite on adopte un régime photopériodique de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité. Un flux de photon photosynthétique de 65 nmol m⁻² s⁻¹ est maintenu au moyen de tubes fluorescents blancs et froids (Phillips 40 W).

Quatre milieux sont utilisés pour la régénération du mûrier : RM1 (MS + 1,1 mg / l TDZ), RM2 (MS + 1,1 mg / l TDZ + 2 mg / l BAP), RM3 (MS + 2 mg / l IAA + 2 mg / l BAP + 2 mg / l AgNO₃) et RM4 (MS + 2 mg / l IAA + 1,1 mg / l TDZ + 2 mg / l AgNO₃).

Formation du plant :

Les pousses formées *in vitro* sont excisées et eultivées sur un milieu de racinement (MS + 1 mg / l NAA ou 0,1 % de charbon activé). Les plants avec des racines bien développées sont transférés dans des pots en terre (diamètre 12 à 15 cm) contenant du sol autoclavé : Soilrite (1 : 1).

Etudes histologiques :

Les cals avec les bourgeons adventifs sont fixés dans du FAA (5 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide acétique glacial + 90 ml d'éthanol à 70 %) et préparés pour être enrobés de paraffine et pour la microtomie. On fait des coupes de paraffine de 10 à 12 μm d'épaisseur, qui sont colorées avec de la safranine à 0,1 % et du Fast Green alcoolisé à 0,1 % et fixées avec du DPX (Johansen, 1940).

RESULTATS ET DISCUSSION

Sur le milieu de base MS les explants de feuille ne donnent pas de cals ni ne montrent de signe de différenciation. Les explants de feuille (*in vivo* / *in vitro*) quand on les cultive sur un milieu MS additionné avec de l'IAA, du BAP, du TDZ et de l' AgNO_3 soit seul soit en combinaison présentent une morphogénèse (Fig. 1). Quand on cultive les explants de feuilles provenant de sources variées sur le milieu additionné de TDZ, on observe une régénération chez les deux cultivars (Fig. 2). Le pourcentage de régénération est maximum chez les explants de feuilles *in vivo* sur du MS + 1,1 mg/l de TDZ suivi par les explants cultivés *in vitro*. Le cal qui se forme provient de la zone intermédiaire entre le pétiole et la nervure centrale et se différencie ensuite en bourgeons de pousses (Figs 1d-g). Ces résultats sont similaires aux observations de Oka et Ohyama (1981) et laissent supposer un potentiel morphogénétique de la zone intermédiaire.

Quand le milieu MS est complété avec différents régulateurs de croissance, avec et sans TDZ, on observe la meilleure réponse sur du MS + 2 mg/l IAA + 1,1 mg/l TDZ + 2 mg/l AgNO_3 (RM4). L'ajout de BAP au TDZ diminue la réponse, mais la présence d'IAA et d' AgNO_3 renforce le potentiel de régénération du TDZ à la fois chez les explants cultivés *in vitro* et cultivés sur le terrain des cultivars K-2 et DD (Fig. 3a & b). Le mode similaire de régénération chez les deux cultivars K-2 et DD sur les quatre milieux testés suggère qu'il n'y a pas de dépendance relative par rapport au cultivar. Les résultats indiquent aussi que le TDZ est meilleur que le BAP pour induire des bourgeons de pousses à partir de cals d'explants de feuilles, comme on l'a observé pour la formation de pousses multiples par induction de bourgeons (Tewari et coll., 1999). La présence d' AgNO_3 est non seulement bénéfique mais améliore aussi la qualité des régénérants.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la meilleure réponse de régénération est observée avec le milieu contenant de l' AgNO_3 + TDZ + IAA. L'éthylène, une hormone de plante gazeuse semble être impliquée dans la croissance et la différenciation des cultures tissulaires *in vitro* (Lieberman, 1979, Yang et Hoffman, 1984). On a montré que le nitrate d'argent, un inhibiteur puissant de l'action de l'éthylène promeut la régénération chez *Triticum aestivum* et *Nicotiana glauca* (Purnhauser et coll., 1987), *Zea mays* (Vain et coll., 1989), *Brassica campestris* (Chi et Pua, 1989) et *Daucus carota* (Roustan et coll., 1990). L'éthylène a aussi des effets sur le métabolisme des polyamines en inhibant l'activité de l'arginine décarboxylase comme on l'observe pendant l'embryogenèse somatique chez la carotte à partir de cultures cellulaires en suspension (Roustan et coll., 1990). Chez le mûrier aussi, l' AgNO_3 permet d'augmenter l'induction de bourgeons adventifs en inhibant le niveau d'éthylène endogène des explants. De nombreuses espèces de plantes contiennent des niveaux élevés du précurseur de l'éthylène [1-aminocyclopropane-2 acide carboxylique (ACC)] (Jain et coll., 1996) et selon Cho et Kasha (1989), un niveau optimal de synthèse d'éthylène est essentiel pour la différenciation. Ainsi, la concentration en ACC dans la culture tissulaire et par relation l'application exogène d' AgNO_3 s'avérerait critique pour atteindre un niveau optimal en éthylène dans les cultures. Néanmoins, l'éthylène reste l'un des facteurs importants impliqués dans l'induction de l'organogénèse.

L'examen histologique de l'explant de feuille indique que le processus de différenciation dans des cultures de 5 semaines est rapide et que l'induction des ébauches implique des divisions cellulaires, l'apparition de petites protubérances et la formation d'ébauches de pousses et de feuilles (Fig. 1 d-g). Après 5 à 7 semaines de culture, la zone basale du limbe foliaire s'agrandit et forme des structures primordiales, qui se développent en bourgeons de pousses sains et verts. En général, 6 à 8 bourgeons de pousses se développent / explant. Il se produit non seulement une différenciation des

bourgeons de pousses mais aussi une formation importante de cals à la base de la feuille (Fig. 1a). Le cal est vert pâle, nodulaire et compact. Le cal se différencie en 15 à 20 bourgeons de pousses sur le même milieu (Fig. 1b) ; mais quand on les repique sur du MS + 0,5 mg / l de BAP + 0,5 mg / l GA₃ + 2 mg / l d'AgNO₃, le nombre de pousses de bourgeons augmente jusqu'à 3 à 4 fois et des pousses bien développées apparaissent dans les deux semaines qui suivent (Fig. 1 h & i).

Les pousses, après avoir été excisées sur le cal, sont repiquées sur un milieu MS complété avec 1 mg/l de NAA ou avec 0,1 % de charbon actif pour le racinement. Le racinement se produit dans les deux semaines qui suivent dans la zone basale des pousses chez 90 à 95 % des cultures (Fig. 1c). Ces plants racinés sont transférés dans des pots en terre dans du sol Soilrite autoclavé et irrigués avec 0,5 % de sels MS au début un jour sur deux et après deux fois par semaine pendant un mois, puis ils sont transférés sur le terrain. Après durcissement, le taux de survie sur le terrain est de 80 à 85 %.

A l'opposé des résultats obtenus par Oka et Ohyama (1981), Mhatre et coll. (1985) et Kim et coll. (1985), nous avons observé dans notre étude qu'il n'est pas essentiel de faire tremper au préalable ou de pré-traiter les explants avec du BAP pour obtenir la régénération. Nous avons aussi observé un pourcentage plus élevé de régénération (jusqu'à 60 %) chez les explants foliaires adultes de cultivars supérieurs de *M. indica* (en l'occurrence K-2 et DD) cultivés sur le terrain, ce qui n'avait pas été signalé jusqu'à présent. Le potentiel morphogénétique élevé des explants foliaires adultes pourrait être dû au fait que leur état physiologique est activé à la suite de l'émergence de l'œil latéral dormant lorsqu'on taille les plants en champs. On a signalé une activation similaire des yeux dormants chez *Lathyrus sativus*, où les méristèmes des bourgeons axillaires activés sont capables de surmonter l'inhibition génotypique inhérente (Gharyal et Maheshwari, 1983).

En conclusion, les observations de cette étude chez deux cultivars supérieurs de *M. indica* prouvent qu'il est possible de multiplier le mûrier en masse grâce à des cultures de feuilles à partir de plants adultes. Ce protocole serait aussi très utile non seulement pour multiplier certains cultivars de *Morus*, qui racinent difficilement, mais aussi pour permettre des programmes de transfert des gènes chez le mûrier indien.

EVALUATION OF IMPROVED GENOTYPES OF MULBERRY THROUGH LEAF CHEMICAL ANALYSIS AND BIOASSAY WITH SILKWORM RACE NB4D2

S. V. PATIL^{1*}, R. S. MALLIKARJUNAPPA¹, S. B. DANDIN² & M. S. ESWARA RAO¹

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

2. National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Bangalore – 560 082, India.

Six improved mulberry genotypes S36, Viswa, S1, S1635, S799 and M5 are grown at the main campus of the KSSRDI, Bangalore. Moulting and rearing parameters observed from six trials show significant differences among the genotypes at 1% probability level. Silkworm race NB4D2 of *B. mori* larvae fed on the leaves of S36, S1 and S1635 genotypes showed significantly higher larval weight and moulting ratio both during first and second instar than larvae fed on M5 genotype. Of the six mulberry genotypes, S1635 performed better in four rearing parameters out of seven. The correlation coefficients between the nutritional components of mulberry leaves and moulting ratio show that higher leaf water content (LWC), leaf water retention (LWR), total chlorophyll, total soluble sugars, soluble proteins and total nitrogen contents will be required considerably more for first instar larvae, compared to the second instar larvae. Also, higher levels of LWC, total soluble sugars, soluble proteins, total chlorophyll and LWR resulted in decreased larval duration and increased larval weight, effective rate of rearing (ERR) by weight, cocoon weight, shell weight and shell ratio. This information can be utilised effectively in breeding programs to develop desirable mulberry genotypes.

Keywords: Rearing parameters, silkworm and mulberry genotype.

INTRODUCTION

The work of mulberry breeders does not rest with the development of high yielding genotypes but their work will be finally assessed for the qualitative and quantitative improvement, manifested by silkworm rearing. Although the nutritional level of leaves is believed to differ from genotype to genotype, it is not yet conclusively proved in all cases that the difference is exactly reflected in cocoon parameters. In this context, understanding the magnitude of relationship between the nutritional quality of mulberry leaf and rearing parameters of silkworm is essential. Hence, simple correlation coefficients are estimated between the rearing parameters and the leaf quality parameters to know their relationships.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the main campus of the KSSRDI, Bangalore, during 1994-98. Six improved mulberry genotypes evaluated are S36, Viswa (DD), S1, S1635, S799 and M5, genotype M5 as the control. These are evaluated in a randomised complete block design (RCBD), with four replicates. The number of plants per replicate is 260, with a plot size of 12.2 m × 7.9 m. The saplings

* Correspondence address: French Institute of Pondicherry, P. B. 33, Pondicherry 605 001, India.

with 60 × 60 cm spacing are grown according to the package of practices followed in pit system of mulberry cultivation under irrigated conditions of individual leaf picking method (Krishnaswami, 1986a) can be maintained without pruning during the first year.

The bioassay is conducted three times a year for two years (1995-97) during the rainy, winter and summer seasons.

Moulting test:

Newly hatched larvae of NB4D2 bivoltine silkworm race (*Bombyx mori* L.) are reared under standard conditions using isolation chambers (Sekharappa *et al.*, 1995). Four replicates of hundred larvae of each genotype are reared in separate trays to record the moulting parameters during first and second instars by adopting the continuous feeding method of Iwanari and Ohno (1969). The appearance of the first out moult larva is considered as commencement of preparation period for moulting and observations are made every 4 h throughout the preparatory period. The moulting ratio (%) and out of moult larval weight (mg) are recorded for each 4 h interval of time. The period of time in which more than 50 per cent of moulting ratio was obtained for any genotype is fixed for comparing the moulting ratios of all the genotypes under evaluation for first and second instars respectively.

Rearing test:

The same race is also used for full rearing test and this test is conducted under standard rearing conditions (Krishnaswami, 1986b) in cellular beds (400 larvae per replicate after the third instar) with four replicates per genotype. Four feedings per day are given at 6 a.m., 11 a.m., 4 p.m. and 9 p.m. from hatching to spinning except during the moulting period. Observations of selected rearing parameters are recorded.

1) The larval duration is observed from hatching to spinning time and expressed in days / hour (d/h).

2) Ten mature larvae are weighed (selected randomly) on the sixth day of fifth instar to calculate the average larval weight (g) per replicate.

3) The effective rate of rearing (ERR) by weight and ERR by number are calculated by taking the ratio of the total weight (kg) and number of cocoons harvested to the total number of larvae at the beginning of the fourth instar (400 larvae / replicate and the values are expressed for 10,000 larvae in the table).

4) Twenty-five (12 male & 13 female) good cocoons, selected randomly from each replicate are used to calculate the average cocoon weight (g) and the average shell weight (g).

5) The shell ratio is calculated using the ratio of shell and cocoon weights and is expressed in percentage.

Biochemical test:

The leaf samples are collected separately on middle day of second, fourth and fifth instar larval feeding stages respectively. The top 1-3 leaves below the glossy leaf considered as tender leaves are used for first and second instar larval feeding, the middle 4-8 leaves or medium leaves for third, fourth and two days for fifth instar larvae and the remaining bottom leaves (except yellow leaves) considered as coarse leaves are used for late fifth instar larval feeding. For each level (tender, medium and coarse) 25 leaves per replicate per genotype are collected for recording the biochemical parameters. Initial weight of the leaf immediately after the leaf harvest and the weight of the sample recorded after 12 h are used to calculate the LWC and LWR capacity of the sample. The same leaves are dried in the open trays for two days in the laboratory and are then dried in a hot air oven at 70° C, till a constant weight (DW) is reached. The LWC and LWR of tender, medium and coarse leaves are estimated by using the following formulae.

$$\text{LWC (\%)} = \frac{\text{FW of leaves} - \text{DW of leaves}}{\text{Fresh weight (FW) of leaves}} \times 100$$

$$\text{Leaf water loss (\%)} = \frac{\text{FW of leaves} - \text{weight of leaves at 12 h after harvest}}{\text{FW of leaves}} \times \text{LWC (\%)}$$

$$\text{Leaf water retention (LWR, \%)} = 100 - \text{Leaf water loss (\%)}$$

Leaf samples, which are used for collecting the data on LWC and LWR, are made into fine powder. The powdered samples are used for analysis of total chlorophyll by following the method of Arnon (1949), total soluble sugars (Dubios *et al.*, 1956), soluble proteins (Lowry *et al.*, 1951) and total nitrogen analysis followed by the Kjeltec Digestion System manual.

Statistical analysis:

The leaf biochemical and bioassay data are analysed to calculate variance and simple correlation coefficients using standard methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Variations of leaf yield (Patil *et al.*, 2000a), chemical components (Patil *et al.*, 2000b), moulting and rearing parameters are observed among the genotypes.

S36, Viswa and S1635 genotypes recorded the highest values of LWC and LWR (Table I). Higher larval weight (S36, S1 & S1635) and moulting ratio are recorded in S36, Viswa & S1 genotypes (Table II) whose leaves were observed to be soft. Higher moulting ratio indicates that the newly hatched larvae prefer the soft leaf (without hairs) with higher water content and water retention for sucking the juice from it. Though, genotype S1635 had highest LWC and LWR, the coarseness (hairs) of the leaf lamina may be the cause of the moderate moulting ratio. With advancing larval period, larvae may require moderate softness of the leaf lamina and higher content of soluble sugars and proteins for their metabolic activity. These leaf characters are observed in the S1 genotype. The larvae fed on S1 genotypes showed highest larval weight in the first moult and second highest second moulting ratio. Genotype S36, S1 and S1635 recorded the highest values of soluble sugars and this is reflected in highest weight of larvae fed on these leaves. Genotype S799 shows the lowest LWC and LWR associated with lower larval weight and moulting ratio. Among the six genotypes tested S36 yielded the best result followed by S1 and S1635 in early stage of larval feeding.

Rearing parameters:

The silkworm larvae fed on the leaf of S36, S1 and S1635 genotypes attained early maturity (spinning) and higher larval weight compare to those fed on M5 genotype, whereas Viswa genotype led to higher larval weight but later larval maturity and lower cocoon weight than M5 genotype. Even though Viswa genotype recorded higher value of LWC (Table I) and leaf yield (Table II), the lower values of soluble proteins and total soluble sugars are reflected in lower cocoon weight and shell weight (Table II). S1 and S1635 genotypes having higher values of total soluble sugars, total nitrogen and chlorophyll (Table I), are associated with significantly higher larval weight, ERR by number and weight, single cocoon weight and shell weight than those of Viswa, S799 and M5 genotypes. Though S1 genotype is of better leaf quality and has a greater acceptance by silkworm, the leaf yield is significantly lower than that of S36, Viswa and S1635 genotypes (Table II). S1635 genotype had better leaf quality and higher yield, but hairiness in the young leaves make them less acceptable to

chawki silkworm larvae for feeding. This kind of information, currently lacking in mulberry breeding programme is important for better utilisation of genotype in future breeding programs.

Table I. Average values of six tests for leaf biochemical parameters in improved genotypes of mulberry (*Morus alba*).

Tableau I. Valeurs moyennes de six tests pour les paramètres biochimiques de la feuille chez les génotypes de mûrier améliorés (Morus alba).

Genotype	Leaf water content (%)			Leaf water retention at 12 hour after harvest (%)			Total chlorophyll (mg/g)		
Génotype	Teneur en eau de la feuille (%)			Rétention d'eau de la feuille 12 heures après la récolte (%)			Chlorophylle totale (mg / g)		
	T	M	C	T	M	C	T	M	C
S36	76.28	74.94	73.74	72.99	72.32	68.11	2.95	3.51	3.88
Viswa	76.48	75.12	73.80	71.01	70.40	65.98	3.37	4.50	4.61
S1	75.50	74.16	72.60	69.4	67.05	63.55	4.21	5.44	5.71
S1635	77.53	76.22	74.94	74.77	73.77	68.97	4.33	5.59	5.44
S799	75.35	73.78	71.76	64.30	64.05	61.34	4.15	4.61	4.61
M5	75.72	74.43	72.94	68.28	66.77	64.23	3.64	4.10	4.02
Mean / Moyenne	76.14	74.77	73.30	70.12	69.06	65.36	3.77	4.62	4.71
LSD (0.05)	0.21	0.25	0.25	0.19	0.32	0.30	0.11	0.18	0.23
LSD (0.01)	0.29	0.34	0.34	0.27	0.44	0.43	0.16	0.25	0.32

T – Tender leaves / Feuilles tendres.

M – Medium leaves / Feuilles moyennes.

C – Coarse leaves / Feuilles épaisses.

Least significant difference (LSD) at 0.05 and 0.01 level respectively / Moindre différence significative (LSD) aux seuils de respectivement 0,05 et 0,01.

Table I. (Continued).

Tableau I. (Suite).

	Total soluble sugars			Soluble proteins (%)			Total nitrogen (%)		
	<i>Sucres solubles totaux (%)</i>			<i>Protéines solubles (%)</i>			<i>Azote total (%)</i>		
	T	M	C	T	M	C	T	M	C
S36	13.44	12.05	9.88	24.89	22.99	21.22	4.24	4.12	3.63
Viswa	12.01	11.09	8.88	23.01	21.42	19.57	4.10	3.79	3.45
S1	13.11	12.16	10.20	25.12	23.51	21.07	4.52	4.18	3.72
S1635	13.38	12.18	10.11	24.72	22.69	20.32	4.53	3.94	3.45
S799	12.24	11.19	9.84	25.47	22.98	21.15	4.52	3.99	3.65
M5	12.34	11.44	10.01	25.47	23.73	21.61	4.27	3.92	3.64
Mean / Moyenne	12.75	11.68	9.82	24.78	22.89	20.82	4.36	4.18	3.59
LSD (0.05)	0.36	0.77	0.45	1.16	0.93	0.92	0.15	-	0.14
LSD (0.01)	0.49	-	0.63	0.61	1.29	1.27	0.20	-	0.18

Correlation between the leaf quality and rearing parameters:

The LWC, LWR, total chlorophyll and total soluble sugar parameters in mulberry leaves showed negative association with larval duration (Table III). On the other hand larval weight increases with increasing values of these parameters. Higher content of these parameters may have an indirect effect to accelerate the growth and development of the late age silkworm and also the cocoon production. Total chlorophyll content, total soluble sugars, the soluble proteins and the total nitrogen content in mulberry leaves showed positive association with ERR by weight, single cocoon weight, shell weight (in protein) and shell ratio (in nitrogen). The positive correlation coefficients of the cocoon shell weight and cocoon yield with the protein content in mulberry leaves is reported by Sarker *et al.*, (1997). The mulberry varieties with higher content of nitrogen in leaf show higher production efficiency of cocoon shell weight (Machii and Katagiri, 1991). In this study, the S1635 and S1 genotypes shows higher value of leaf quality parameters (Patil *et al.*, 2000b) and also performed better in rearing parameters (Patil, 1998).

Table II. Average values of six tests for moulting and rearing parameters in silkworm race NB4D2 (*B. mori*).Tableau II. Valeurs moyennes de six tests pour les paramètres de mue et d'élevage chez la race de ver à soie NB4D2 (*B. mori*).

Genotype	Larval weight (mg)		Moulting ratio (%)		Larval duration n (d/h)	Larval weight (g)	Effective rate of rearing (ERR) (for 10,000 larvae brushed)		Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Shell ratio (%)	Leaf yield per replicate (kg)
	I moult	II moult	I moult	II moult			by number	by weight (kg)				
Génotype	Poids larvaire (mg)		Taux de mue larvaire (%)		Durée larvaire n (j / h)	Poids larvaire (g)	Taux effectif d'élevage ERR (pour 10 000 larves levées)		Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Rendement en feuilles par répétition (kg)
	1 ^{ère} mue	2 ^{ème} mue	1 ^{ère} mue	2 ^{ème} mue			en nbre	en poids (kg)				
S36	5.46	35.5	69.96	74.25	23:15	41.01	8891.3	13.45	1.665	0.320	19.35	74.28
Viswa (DD)	5.33	30.30	47.29	57.0	24:14	41.27	8905.3	13.29	1.632	0.315	19.43	87.28
S1	6.27	34.05	42.84	60.0	23:20	42.38	9033.3	14.42	1.722	0.335	19.43	76.92
S1635	6.00	31.85	37.54	55.50	24:03	43.50	9082.3	13.95	1.708	0.335	19.55	111.7
S799	5.33	26.45	30.00	37.50	25:02	37.61	8846.3	13.34	1.651	0.320	19.53	77.69
M5	5.25	28.90	27.04	38.75	25:00	40.19	8914.3	13.36	1.682	0.325	19.41	70.47
Mean / Moyenne	5.61	31.17	42.44	53.83	24:09	40.99	8945.4	13.585	1.677	0.325	19.45	83.05
LSD (0.05)	0.46	1.33	3.09	3.87	0:12	0.40	064.09	0.28	0.04	0.007	-	8.27
LSD (0.001)	0.64	1.850	4.27	5.36	0:16	0.55	088.63	0.39	0.06	0.010	-	11.43

Least significant difference (LSD) at 0.05 and 0.01 level respectively / Différence significative la plus faible (LSD) aux seuils de respectivement 0,05 et 0,01.

Table III. Correlation between the leaf quality and rearing parameters in six improved genotypes of mulberry.

Tableau III. Corrélation entre la qualité de la feuille et les paramètres d'élevage chez six génotypes de mûrier améliorés.

Parameters	Larval Duration	Larval weight	ERR by number	ERR by weight	Single cocoon weight	Single shell weight	Shell ratio
<i>Paramètres</i>	<i>Durée larvaire</i>	<i>Poids larvaire</i>	<i>ERR en nombre</i>	<i>ERR en poids</i>	<i>Poids d'un cocon</i>	<i>Poids d'une coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
Leaf water content <i>Teneur en eau de la feuille</i>	-0.3711	0.7572	0.5412	0.1980	0.1599	0.2244	0.0528
Leaf water retention <i>Rétention de l'eau de la feuille</i>	-0.5715	0.7368	0.4188	0.1189	0.0893	0.1182	-0.0393
Total chlorophyll <i>Chlorophylle totale</i>	-0.1823	0.5086	0.7165	0.6307	0.4927	0.6192	0.2390
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	-0.3739	0.3605	0.4470	0.5678	0.5865	0.6436	0.1421
Soluble proteins <i>Protéines solubles</i>	0.0272	-0.2252	-0.0806	0.2825	0.3374	0.2756	-0.0920
Total nitrogen content <i>Teneur totale en azote</i>	-0.4753	-0.3468	-0.0817	0.1582	0.1773	-0.2001	-0.2143

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

CONCLUSION

General observation shows that young age silkworms require tender soft leaf mulberry with higher water content and water retention capacity, total soluble sugars and proteins. Whereas, late age silkworms require progressively mature leaves with less (comparative to young age) water content, higher chlorophyll, soluble sugars and proteins. Variations among the genotypes show that improvement in the quality parameters can be achieved through the selection of the genotype appropriate for each stage of larval development. Overall, genotype S1635 had higher leaf yield, better leaf quality and rearing parameters. Hence this genotype can be utilised for commercial rearing purpose to promote the economy and interest of the sericulture industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors sincerely thank the Central Silk Board for fellowship for carrying out this experiment and also thank the Mulberry Breeding and Genetic Section staff of the Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for providing the facilities during the data collection and constant encouragement.

REFERENCES

- ARNON D. N. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* L. Plant Physiol. 24: 1-15.
- DUBIOS M. K., GILLER K. A., HAMILTON K., RELERS, P. A. & SMITH F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Annal. Chem. 28: 350-356.
- IWANARI Y. & OHNO Y. 1969. Rearing experiments of silkworms on the artificial diets composed mainly of the mulberry leaf powder harvested on the late autumnal and thereafter seasons. J. Seric. Sci. Japan. 38: 307-315.
- KRISHNASWAMI S. 1986a. Mulberry cultivation in South India. Central Silk Board, Bangalore. Rep. Pp. 19-23.
- KRISHNASWAMI S. 1986b New technology of silkworm rearing. Central Silk Board, Bangalore. Rep. Pp. 1-19.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDALL R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MACHII H. & KATAGIRI K. 1991. Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworms. JARQ 25: 202-208.
- PATIL S. V. 1998. A correlative analysis of the components of leaf yield and quality in improved genotypes of mulberry. Ph. D. (Seri) Thesis, 180p. Bangalore University, Bangalore.
- PATIL S. V., MALLIKARJUNAPPA R. S. & ESWARA RAO M. S. 2000a. Heritability and correlation for leaf yield parameters in mulberry (*Morus alba* L.). Academy of Plant Sciences. Journal in India. (In press)
- PATIL S. V., MALLIKARJUNAPPA R. S., BONGALE U. D. & DANDIN S. B. 2000b. Leaf nutritive quality status in improved genotypes of mulberry (*Morus alba* L.). Abstr. National Conference on Strategies for Sericulture Research & Development, November 16-18, Mysore, India p 44.
- SARKER A. A., HAQUE M. R., RAB M. A. & ABSAR N. 1997. Studies on crude protein and amino acid contents of mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to cocoon production of the silkworm, *Bombyx mori* L., Sericologia. 37: 137-142.
- SEKHARAPPA B. M., MUNIRAJU E., & GURURAJ C. S. 1995. Use of an isolation chamber for rearing young age (chawki) silkworm in the tropics. Sericologia 35: 525-534.

EVALUATION DE GENOTYPES DE MURIERS AMELIORES PAR ANALYSE CHIMIQUE DE LA FEUILLE ET EVALUATION BIOLOGIQUE AVEC LA VARIETE DE VER A SOIE NB4D2

S. V. PATIL^{1*}, R. S. MALLIKARJUNAPPA¹, S. B. DANDIN² & M. S. ESWARA RAO¹

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

2.National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Bangalore – 560 082, Inde.

*Six génotypes de mûrier améliorés S36, Viswa, S1, S1635, S799 et M5 sont cultivés au campus principal du KSSRDI, à Bangalore. Les paramètres de mue et d'élevage observés au cours de six évaluations montrent des différences significatives entre les génotypes à un seuil de probabilité de 1 %. Pendant le premier et le deuxième âge, les larves **B. mori** de la race de ver à soie NB4D2 qui se nourrissent sur les feuilles des génotypes S36, S1 et S1635 présentent à la fois un poids larvaire et un taux de mue significativement plus élevés que ceux des larves nourries sur le génotype M5. Sur les six génotypes de mûrier, S1635 donne les meilleurs résultats pour quatre paramètres d'élevage sur sept. Les coefficients de corrélation entre les composants nutritifs des feuilles de mûrier et le taux de mue montrent qu'il faut une teneur en eau de la feuille (LWC), une rétention de l'eau dans la feuille (LWR), une chlorophylle totale, des sucres solubles totaux, des protéines solubles et une teneur totale en azote en quantité considérablement plus élevée chez les larves du premier âge que chez les larves du deuxième âge. Des niveaux en LWC, en sucres solubles totaux, en protéines, en chlorophylle totale et en LWR plus élevés entraînent aussi une diminution de la durée larvaire et une augmentation du poids larvaire, du taux effectif d'élevage (ERR) en poids, du poids du cocon, du poids de la coque et de la richesse soyeuse. Ces informations peuvent être utilisées efficacement dans les programmes de lignage pour développer des génotypes de mûrier désirables.*

INTRODUCTION

Le chercheur qui travaille sur le mûrier ne se contente pas de mettre au point des génotypes à rendement élevé, car son travail est en fin de compte évalué d'après l'amélioration qualitative et quantitative de l'élevage des vers à soie. Bien que l'on pense que le niveau nutritionnel des feuilles diffère d'un génotype à l'autre, il n'a pas encore été prouvé de manière définitive que dans tous les cas la différence se reflète exactement sur les paramètres du cocon. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre l'importance de la relation entre la qualité nutritionnelle de la feuille de mûrier et les paramètres d'élevage du ver à soie. Nous avons donc estimé les coefficients de corrélation simples entre les paramètres d'élevage et les paramètres de qualité de la feuille pour connaître leurs relations.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée sur le campus principal du KSSRDI, à Bangalore, en 1994-98. Les six génotypes de mûrier améliorés évalués sont S36, Viswa (DD), S1, S1635, S799 et M5 (comme

* Adresse de correspondance : French Institute of Pondicherry, P. B. 33, Pondicherry 605 001, Inde.

témoin). Ils sont évalués selon une conception en blocs aléatoires (RCBD) avec quatre répétitions. Le nombre de plants par répétition est de 260, avec une taille de parcelle de 12,2 m × 7,9 m. Les jeunes plants sont cultivés avec un espacement de 60 × 60 cm en suivant l'ensemble des pratiques recommandées pour la culture des mûriers plantés dans des trous, irrigués, et dont les feuilles sont ramassées une à une (Krishnaswami, 1986a) et peuvent être maintenus sans taille pendant un an.

L'évaluation biologique est réalisée trois fois par an pendant deux ans (1995-97) pendant la saison des pluies, l'hiver et l'été.

Evaluation de la mue :

Les larves de la race de ver à soie bivoltine NB4D2 venant d'éclore (*Bombyx mori* L.) sont élevées dans les conditions d'élevage courantes en utilisant des locaux isolés (Sekharappa et coll., 1995). Quatre lots de 100 larves chacun pour chaque génotype sont élevés sur des plateaux séparés pour enregistrer les paramètres de mue pendant les premier et deuxième âges en adoptant la méthode de nourrissage continue de Iwanari et Ohno (1969). L'apparition de la première larve qui mue est considérée comme le commencement de la période de préparation pour la mue et les observations sont faites toutes les 4 h tout au long de la période de préparation. Le taux de mue (%) et le poids larvaire à la sortie de la mue (mg) sont enregistrés toutes les 4 h. On détermine la période pendant laquelle on obtient plus de 50 pour cent de taux de mue pour n'importe quel génotype afin de comparer les taux de mue pour tous les génotypes respectivement pendant le premier et le deuxième âge.

Evaluation de l'élevage :

La même race est aussi utilisée pour l'évaluation complète de l'élevage et cette évaluation est réalisée dans les conditions d'élevage courantes (Krishnaswami, 1986b), dans des litières cellulaires (400 larves par répétition après le troisième âge) avec quatre répétitions par génotype. On nourrit les larves quatre fois par jour à 6 heures, 11 heures, 16 heures et 21 heures de l'éclosion au filage, sauf pendant la période de mue. Les observations sur des paramètres d'élevage sélectionnés sont enregistrées.

- 1) La durée larvaire est enregistrée de l'éclosion au filage et exprimée en jours / heure (j / h).
- 2) Dix larves matures (sélectionnées au hasard) sont pesées le sixième jour du cinquième âge pour calculer le poids larvaire moyen (g) par répétition.
- 3) Le taux effectif d'élevage (ERR) en poids et l'ERR en nombre sont calculés à partir du ratio entre le poids (kg) et le nombre totaux de cocons recueillis et le nombre total de larves au début du quatrième âge (400 larves / répétition et les valeurs sont exprimées pour 10 000 larves dans le tableau).
- 4) Vingt cinq (12 mâles et 13 femelles) cocons de bonne qualité, sélectionnés au hasard à partir de chaque répétition sont utilisés pour calculer le poids moyen du cocon (g) et le poids moyen de la coque (g).
- 5) La richesse soyeuse est calculée à partir du ratio entre le poids de la coque et le poids du cocon et est exprimée en pourcentage.

Evaluation biochimique :

Les échantillons de feuilles sont recueillis séparément respectivement au milieu des deuxième, quatrième et cinquième stades larvaires. Les trois premières feuilles du haut en dessous de la feuille brillante, considérées comme des feuilles tendres, sont utilisées pour le nourrissage larvaire du premier et du deuxième âge, les 4 à 8 feuilles du milieu, c'est à dire les feuilles moyennes, sont utilisées pour le troisième et quatrième âges et deux jours pendant le 5^{ème} âge et les feuilles restantes du bas (à

l'exception des feuilles jaunes) considérées comme des feuilles grossières, sont utilisées pour le nourrissage de la fin du 5ème âge. On recueille 25 feuilles de chaque qualité (tendre, moyenne et épaisse) pour chaque répétition et chaque génotype pour enregistrer les paramètres biochimiques. Le poids initial de la feuille immédiatement après la récolte et le poids de l'échantillon de feuille après 12 h sont utilisés pour calculer la capacité en LWC et en LWR de l'échantillon. Les mêmes feuilles sont séchées dans des plateaux non recouverts pendant deux jours dans le laboratoire, puis séchées dans un four à air chaud à 70° C, jusqu'à ce qu'un poids constant (DW) soit atteint. Les LWC et LWR des feuilles tendres, moyennes et grossières sont estimées en utilisant les formules suivantes.

$$(\%) \text{ LWC} = \frac{\text{Poids frais des feuilles} - \text{Poids sec des feuilles}}{\text{Poids frais (FW) des feuilles}} \times 100$$

Perte d'eau de la feuille (%) =

$$\frac{\text{FW des feuilles} - \text{poids des feuilles 12 h après la récolte}}{\text{Poids frais des feuilles}} \times \text{LWC} (\%)$$

Rétention de l'eau de la feuille (LWR, %) = 100 – perte d'eau de la feuille (%)

Les échantillons de feuille, qui sont utilisés pour recueillir les données sur la LWC et la LWR, sont réduits en poudre fine. Les échantillons réduits en poudre sont utilisés pour analyser la chlorophylle totale en suivant la méthode d'Arnon (1949), les sucres solubles totaux (Dubios et coll., 1956), les protéines solubles (Lowry et coll., 1951) et l'azote totale est analysé en suivant le manuel du Système de Digestion Kjelttec.

Analyse statistique :

Les données sur l'évaluation biologique et biochimique de la feuille sont analysées pour calculer la variance et les coefficients de corrélation simple en utilisant des méthodes courantes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les variations en rendement de la feuille (Patil et coll., 2000a), en composants chimiques (Patil et coll., 2000b), des paramètres de mue et d'élevage sont observées entre les génotypes.

Les génotypes S36, Viswa et S1635 enregistrent les valeurs les plus élevées en LWC et en LWR (Tableau II). On enregistre le poids larvaire (S36, S1 et S1635) et le taux de mue les plus élevés chez les génotypes S36, Viswa et S1 (Tableau II) dont les feuilles sont plus tendres. Un taux de mue plus élevé indique que les larves venant d'éclore préfèrent les feuilles tendres (sans duvet) avec une teneur en eau et une rétention d'eau plus élevées dont elles sucent le jus. Bien que le génotype S1635 ait les LWC et LWR les plus élevées, la grossièreté (duvets) du limbe de sa feuille pourrait expliquer le taux de mue modéré. Au cours de l'avancement dans la période larvaire, les larves pourraient avoir besoin d'un limbe de feuille modérément tendre et d'un taux plus élevé en sucres solubles et en protéines pour leur activité métabolique. Ces caractères de la feuille sont observés chez le génotype S1. Les larves nourries sur le génotype S1 présentent le poids larvaire le plus élevé pendant la première mue et le deuxième taux de mue le plus élevé. Les génotypes S36, S1 et S1635 enregistrent les valeurs les plus élevées pour les sucres solubles et en conséquence les larves nourries sur ces feuilles ont un poids plus élevé. Le génotype S799 présente les LWC et LWR les plus faibles, associés à un poids larvaire et un taux de mue plus faibles. Sur les six génotypes testés, S36 donne les meilleurs résultats suivi par S1 et S1635 aux premiers stades de nourrissage larvaire.

Paramètres d'élevage :

Les larves de vers à soie nourries sur la feuille des génotypes S36, S1 et S1635 atteignent une maturité précoce (filage) et ont un poids larvaire plus élevé comparées à celles qui sont nourries sur le génotype M5, tandis que le génotype Viswa entraîne un poids larvaire plus élevé mais une maturité larvaire plus tardive et un poids de cocon plus faible que le génotype M5. Bien que le génotype Viswa enregistre des valeurs en LWC (Tableau I) et de rendement en feuilles supérieures (Tableau II), les valeurs plus faibles pour les protéines solubles et les sucres solubles totaux donnent un poids de cocon et de coque plus faibles (Tableau II). Comme les génotypes S1 et S1635 ont des valeurs plus élevées en sucres solubles totaux, en azote et en chlorophylle totales (Tableau I) ils sont associés à un poids larvaire, un ERR en nombre et en poids, un poids de cocon, un poids de coque significativement plus élevés que ceux obtenus avec les génotypes Viswa, S799 et M5. Bien que le génotype S1 ait une meilleure qualité de feuille et soit mieux accepté par le ver à soie, son rendement en feuilles est significativement plus bas que celui des génotypes S36, Viswa et S1635 (Tableau II). Le génotype S1635 a une meilleure qualité de feuille et un rendement plus élevé, mais le duvet des jeunes feuilles le rend moins acceptable pour le nourrissage des jeunes larves de vers à soie. Ce type d'informations, qui fait défaut à l'heure actuelle aux programmes de lignage du mûrier est important pour une meilleure utilisation du génotype dans les prochains programmes de lignage.

Corrélation entre la qualité de la feuille et les paramètres d'élevage :

Les paramètres de LWC, de LWR, de chlorophylle totale et de sucres solubles totaux des feuilles de mûrier montrent une relation négative avec la durée larvaire (Tableau III). D'autre part, le poids larvaire augmente quand les valeurs de ces paramètres augmentent. Les valeurs plus élevées pour ces paramètres pourraient avoir un effet indirect sur l'accélération de la croissance et du développement du ver à soie au dernier âge et aussi sur la production de cocons. La teneur totale en chlorophylle, en sucres solubles totaux, en protéines solubles et la teneur totale en azote dans les feuilles de mûrier montrent une relation positive avec l'ERR en poids, le poids d'un cocon, le poids de la coque (en protéines) et la richesse soyeuse (en azote). Sarker et coll., (1997) ont fait part de coefficients de corrélation positifs entre la teneur en protéines des feuilles de mûrier et le poids de la coque et le rendement en cocons. Les variétés de mûrier dont la feuille a une teneur en azote plus élevée donnent de meilleurs résultats pour le poids de la coque soyeuse (Machii et Katagiri, 1991). Dans cette étude, les génotypes S1635 et S1 donnent des valeurs plus élevées pour les paramètres de qualité de la feuille (Patil et coll., 2000b) et donnent aussi de meilleures performances pour les paramètres d'élevage (Patil, 1998).

CONCLUSION

L'observation générale montre que les jeunes vers à soie ont besoin de feuilles de mûrier tendres et molles avec plus de teneur en eau, de capacité de rétention d'eau, de sucres solubles totaux et de protéines. Tandis que les vers à soie du dernier âge ont besoin de feuilles adultes avec moins (par comparaison au jeune âge) de teneur en eau, plus de chlorophylle, de sucres solubles et de protéines. Les variations entre les génotypes montrent qu'on peut améliorer les paramètres de qualité en sélectionnant un génotype approprié à chaque stade de développement larvaire. En règle générale, le génotype S1635 donne le meilleur rendement en feuilles et la qualité de sa feuille et ses paramètres d'élevage sont meilleurs. On peut donc utiliser ce génotype pour l'élevage commercial parce qu'il est intéressant sur le plan économique pour l'industrie séricicole.

EVALUATION OF MULTIVOLTINE × BIVOLTINE F1 HYBRIDS OF THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX* *MORI* L. IN TWO DIFFERENT SEASONS

RAVINDRA SINGH, RACHNA GOEL, D. RAGHAVENDRA RAO, M. REKHA,
V. PREMALATHA, M. M. AHSAN & R. K. DATTA

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

A study was conducted during July - August and November - December, 1998 to evaluate the heterosis of F1 hybrids between multivoltine and bivoltine strains of the mulberry silkworm, Bombyx mori L. The degree of heterosis varied considerably for several quantitative characters of F1 hybrids in two seasons. During July-August, BL43 × NB4D2 exhibited significant positive heterosis over mid parent value for fecundity, yield/10,000 larvae by weight and cocoon weight whereas BL24 × NB4D2 exhibited significant hybrid vigour for yield/10,000 larvae both by number and weight and cocoon shell weight during November-December. Study on cocoon shape measurement revealed that cocoons were comparatively uniform during November-December as compared to July-August. Importance of this study in the production of uniform shaped cocoons with uniform filament size, F1 hybrids with high heterotic effects and quantitative characters have been discussed.

Keywords: Hybrid vigour, cocoon shape measurement, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm, *Bombyx mori*, due to its immense economic value, has wide distribution with well defined geographical races (Gamo and Ohtsuka, 1980). In case of plants, generally highly inbred lines are used for commercial exploitation whereas in silkworm, F1 hybrids are utilized for commercial silk production (Chang *et al.*, 1981 ; Gamo and Hirabayashi, 1983) as F1 hybrids are superior to parental strains in terms of several economical characters (Hirobe, 1956). Indian sericulture was almost multivoltine oriented till the 1970's and during the last three decades, India made a quantum jump in mulberry silk production which was attributed to introduction of multivoltine × bivoltine F1 hybrids which contribute to more than 95 % of total silk production (Datta, 1984). Recently, Roy *et al.*, (1997) have studied the performance of multivoltine × bivoltine and bivoltine × multivoltine F1 hybrids for commercial use in Eastern India.

Exploitation of hybrid vigour in silkworm has been extensively studied (Singh and Hirobe, 1964; Petkov and Yelov, 1979 ; Nagaraju *et al.*, 1989 ; Subba Rao and Sahai, 1989 ; Ravindra Singh *et al.*, 1990, 1992, 1994, 1998a ; Singh and Rao, 1996 ; Kremsky, 1983 ; Razdan *et al.*, 1994 ; Das *et al.*, 1994 ; Tzenov *et al.*, 1994 ; Tayade, 1987). Nagaraju *et al.*, (1996) have reviewed heterosis and cross breeding in silkworm.

Attempts have been made on variability of quantitative characters in silkworm (Chatterjee *et al.*, 1993 ; Rao *et al.*, 1997) as well as on cocoon shape variability in parental silkworm breeds and hybrids (Hirabayashi, 1982 ; Gamo *et al.*, 1985 ; Nakada, 1989). Cocoon shape is an important parameter from the standpoint of silk production, evolution as well as evaluation of commercial hybrids (Nakada, 1994). Rahman and Jahan (1997) have studied heterosis estimate for cocoon breadth in silkworm,

Bombyx mori. In India, little information is available on cocoon shape variability in F₁ hybrids as compared to other sericulturally advanced countries like China and Japan (Ravindra Singh *et al.*, 1998b). Silkworm breeders are giving more emphasis on the cocoon shape and size variation as uniform cocoons possess good reelability, less thread breakage, more raw silk recovery, uniform filament size as well as good neatness of the silk filament. As pointed out by Mano (1994), uniformity of cocoon shape is very important in order to obtain uniform filament size in auto and semi auto reeling machines. The present study was under-taken with the main objectives to know the manifestation of hybrid vigour in quantitative characters and to know the variability in cocoon shape in multivoltine × bivoltine F₁ hybrids.

MATERIALS AND METHODS

Seven multivoltine silkworm breeds i.e. ; PM, RD1, P2D1, MY1, BL23, BL24 and BL43 were utilised. Crosses were made between multivoltine breeds and bivoltine breed (NB4D2). Rearing of F₁ hybrids along with parents was conducted during July-August and November-December, 1998. Three replications were reared in each hybrid/parent and 300 larvae were retained after third moult. PM × NB4D2 was reared as control. Data were recorded for fecundity, hatching %, total larval duration, survival rate, cocoon yield, cocoon shell weight and cocoon shell ratio.

Heterosis over mid parent value (MPV) and better parent value (BPV) for each character was calculated by the following formulae :-

$$1. \text{Heterosis over MPV} = \frac{F_1 - \text{MPV}}{\text{MPV}} \times 100$$

$$2. \text{Heterosis over BPV} = \frac{F_1 - \text{BPV}}{\text{BPV}} \times 100$$

To study the variability in cocoon shape in F₁ hybrids, 100 cocoons were randomly picked up and three cocoon shape variables i.e. ; cocoon length, cocoon width and length/width ratio were determined by using the following formula :-

$$\frac{\text{length}}{\text{width}} \times 100$$

Cocoon length and cocoon width were measured by using vernier callipers. Cocoon shape variability was determined by using uniformity test on the basis of standard deviation (SD) suggested by Mano (1994). The ratio between cocoon length and cocoon width was calculated for each cocoon and its standard deviation and coefficient of variation (CV %) were considered for cocoon uniformity. F₁ hybrids showing less standard deviation and coefficient of variation were considered uniform in cocoon shape.

RESULTS

Heterosis over mid parent value and better parent value for quantitative characters in different crosses between multivoltine × bivoltine F₁ hybrids during July-August and November-December are presented in the Tables I and II respectively.

The hybrid BL43 × NB4D2 has shown its superiority by exhibiting maximum hybrid vigour for fecundity (+ 19.25 %), yield/10000 larvae by number (+ 5.76 %) and yield/10000 larvae by weight (+ 32.66 %) whereas BL24 × NB4B2 showed maximum hybrid vigour for cocoon weight (+ 36.98 %)

and cocoon shell weight (+ 45.73 %) in July-August. During November-December, maximum heterosis for fecundity (+ 14.61 %) and yield/10000 larvae by number (+ 11.93 %) was shown by P2D1 × NB4D2.

Table I. Heterosis values in different crosses of the silkworm, *Bombyx mori* during July-August, 1998.

Tableau I. Valeurs de l'hétérosis chez différents croisements du ver à soie, Bombyx mori au cours des mois de juillet et août 1998.

Combinaison	Fec.	Hat. %	TLD	Yield/10,000 larvae		Cocoon wt.	Cocoon Shell wt.	SR%	Total Heterosis
				By No.	By wt.				
Combinaison	Fert.	% d'éclosion		Rendement / 10 000 larves		Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Hétérosis totale
				En nbre	En poids			(%)	
RD1 × NB4B2									
MPV	-9.51	+2.50**	-2.44**	+3.76	+20.33**	+10.14**	+14.29	+2.39	+41.46
BPV	-18.62*	+1.96	-9.09*	+2.57	+14.62*	+0.39	- 6.41	-10.96**	-17.75
MY × NB4B2									
MPV	+3.34	+2.25*	+1.16	-6.15	+22.87**	+30.62**	+39.66	+5.46*	+99.39
BPV	-6.36	+2.23*	-1.14	-7.24	+16.43*	+10.52**	+15.44	-6.98**	+28.96
P2D1 × NB4D2									
MPV	+2.50	+1.53	-3.36**	-3.37	+15.77**	+21.12**	-10.24	+1.25	+25.18
BPV	-3.48	+1.37	-7.95*	-7.18	+7.02	+11.51**	-21.38	-6.21**	-4.82
BL23 × NB4D2									
MPV	+6.83	+1.59	+6.88**	-5.42	+18.43**	+32.29**	+41.74	+6.14**	+106.86
BVP	-3.00	+1.02	0.00	-6.10	+7.43	+17.74**	+16.15	-5.48*	+33.84
BL24 × NB4B2									
MPV	+7.45	+0.92	-2.33**	-1.98	+21.66**	+36.98**	+45.73*	+4.44*	+112.87
BVP	-2.57	+0.65	-4.55*	-5.38	+21.11**	+27.06**	+25.65	-5.58*	+56.60
BL43 × NB4D2									
MPV	+19.25**	+1.47	0.00	+5.76	+32.66**	+29.86**	+35.77	+2.96	+127.01
BPV	+10.57	+1.23	-4.55**	-2.28	+19.57**	+20.59**	+19.00	-5.38*	+58.85
PM × NB4B2									
MPV	+2.80	-3.51**	-6.38**	-3.70	+23.05**	+27.80**	+31.79	+2.17	+80.40
BPV	-11.43	-3.67**	-12.00**	-6.70	+ 7.35	+10.62**	+4.63	- 9.71**	-15.33

** Significantly different ($P < 0.01$) and * ($P < 0.05$). ** Significativement différent ($P < 0,01$) et * ($P < 0,05$).

MPV: Middle Parent Value / Valeur Médiane des Parents.

BPV: Best Parent Value / Valeur du Meilleur Parent.

TLD : Total Larval Duration / Durée Larvaire Totale.

During July-August, maximum total hybrid vigour for mid parent value and better parent value (+ 127.01 and + 58.85) was found in BL43 × NB4D2 followed by BL24 × NB4D2 which was in the range of + 112.87 and + 56.60 respectively. BL24 × NB4D2 excelled in total heterosis for mid parent value (+ 124.26) and better parent value (+ 73.30) during November-December.

Table II. Heterosis values in different crosses of the silkworm, *Bombyx mori* during November-December, 1998.

Tableau II. Valeurs de l'hétéroseris chez différents croisements du ver à soie, Bombyx mori, au cours des mois de novembre et décembre 1998.

Combinaison	Fec.	Hat %	TLD	Yield/10000 larvae		Cocoon wt.	Cocoon shell wt.	SR %	Total Heterosis
				by No.	by wt.				
	Fert.	% d'éclosion		Rendement / 10 000 larves		Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Hétéroseris totale
				En nombre	En poids			(%)	
RD1 × NB4D2									
MPV	+1.66	+0.56	-1.82*	+11.76**	+25.02**	+11.47**	+6.99	-2.56	+53.02
BPV	-4.59	+0.45	-4.71**	+8.66*	+20.64**	+3.55	-15.66**	-10.56**	-15.30
MY × NB4D2									
MPV	+0.82	+2.43**	-0.57	+11.23**	+35.87**	+20.50**	+19.92**	-1.07	+90.53
BPV	-2.36	+2.34**	-2.99**	+8.76*	+32.65**	+15.78**	-3.46	-16.61**	+49.05
P2D1 × NB4D2									
MPV	+14.61**	-0.67	+4.94*	+11.93**	+40.40**	+20.20**	+17.31**	-1.96	+106.88
BPV	+12.77*	-1.81**	0.00	+5.31	+37.40**	+15.24**	+1.73	-11.72**	+48.92
BL23 × NB4D2									
MPV	-2.75	+1.41**	+11.52**	+5.68	+34.63**	+22.75**	+27.13**	+5.59*	+105.55
BPV	-5.52	0.00	+8.24**	+4.55	+28.93**	+15.76	+5.51	-8.87**	+42.60
BL24 × NB4D2									
MPV	+2.40	-0.14	+11.52**	+11.37**	+44.15**	+27.20**	+27.82**	-0.06	+124.26
BPV	+1.36	-0.86	+8.24**	+4.43	+41.25**	+20.45**	+8.42*	-9.99**	+73.30
BL43 × NB4D2									
MPV	+12.72*	+0.36	+7.88**	+11.85**	+41.51**	+23.80**	+29.91**	+5.92**	+96.15
BPV	+10.31	-0.75	+4.71**	+8.95*	+35.26**	+14.46**	+6.46	-7.71*	+70.11
PM × NB4D2									
MPV	+2.65	-0.05	+5.30**	+1.90	+45.30**	+40.03**	+26.63**	-6.74**	+115.04
BPV	-5.16	-0.42	-1.37	+1.49	+20.74**	+19.87**	-5.51	-21.14**	+8.30

** Significantly different ($P < 0.01$) and * - ($P < 0.05$) / ** Sensiblement différent ($P < 0.01$) and * ($P < 0.05$)
MPV, BPV, TLD: see Table I / voir Tableau I.

Table III. Cocoon shape measurement in multi × bi F1 hybrids during July-August and November-December 1998.

Tableau III. Mesure de la forme du cocon chez les hybrides F1 poly × bi au cours des périodes juillet-août et novembre-décembre 1998.

Hybrid / Season	Cocoon length (cm)	Cocoon width (cm)	Length/width ratio	Coefficient of variation (CV %)
<i>Hybride / saison</i>	<i>Longueur du cocon (cm)</i>	<i>Largeur du cocon (cm)</i>	<i>Rapport longueur / largeur</i>	<i>Coefficient de variation (CV %)</i>
July-August'98 <i>juillet - août 1998</i>				
RD1 × NB4D2	3.49 ± 0.11	1.83 ± 0.11	191.40 ± 12.32	6.44
MY1 × NB4D2	3.71 ± 0.09	1.77 ± 0.07	209.03 ± 8.81	4.22
P2D1 × NB4D2	3.44 ± 0.12	1.82 ± 0.07	188.70 ± 9.87	5.23
BL23 × NB4D2	3.57 ± 0.11	1.93 ± 0.09	185.32 ± 9.12	4.92
BL24 × NB4D2	3.44 ± 0.12	1.77 ± 0.09	195.03 ± 10.65	5.35
BL43 × NB4D2	3.67 ± 0.11	1.84 ± 0.07	199.82 ± 9.17	4.59
PM × NB4D2	3.56 ± 0.14	1.82 ± 0.07	196.56 ± 8.57	4.36
November-December'98 <i>novembre - décembre 1998</i>				
RD1 × NB4D2	3.48 ± 0.11	1.79 ± 0.06	194.67 ± 7.76	3.98
MY1 × NB4D2	3.28 ± 0.10	1.59 ± 0.06	205.80 ± 10.25	4.98
P2D1 × NB4D2	3.52 ± 0.09	1.78 ± 0.04	197.37 ± 6.12	3.10
BL23 × NB4D2	3.52 ± 0.09	1.85 ± 0.04	190.55 ± 6.07	3.18
BL24 × NB4D2	3.36 ± 0.08	1.73 ± 0.04	193.43 ± 6.03	3.11
BL43 × NB4D2	3.57 ± 0.10	1.78 ± 0.04	199.57 ± 6.33	4.59
PM × NB4D2	3.62 ± 0.11	1.77 ± 0.04	203.50 ± 6.92	4.36

Mean ± SD of 100 cocoons / *Moyenne et écart type pour 100 cocons.*

Cocoon shape measurements in multi × bi F1 hybrids during the two seasons i.e. July-August and November-December, 1998 are presented in Table III. Studies on cocoon shape measurement regarding mean values of cocoon length, cocoon width, length/width ratio, coefficient of variation (CV %) were done as shown in the Table.

During July-August, the mean length of cocoons in F1 hybrids ranged from 3.44 to 3.71 cm whereas it varied from 3.28 to 3.62 cm during October-November. During July-August, among all the hybrid combinations MY1 × NB4D2 expressed longest value for cocoon length (3.71 cm) The control PM × NB4D2 showed longest value for cocoon length (3.62 cm) during November-December. The mean value of cocoon width ranged from 1.77 to 1.93 cm and 1.59 to 1.85 cm during July-August and November-December respectively. BL23 × NB4D2 showed maximum value of cocoon width of 1.93 cm and 1.85 cm during July-August and November-December respectively.

The length-width ratio ranged from 185.32 to 209.03 and 190.55 to 205.80 during July-August and November-December respectively. During July-August, maximum value for l/w ratio was observed in MY1 × NB4D2 (209.03) and least value was recorded in BL23 × NB4D2 (185.32). During November-December, maximum value was registered by MY1 × NB4D2 (205.80) and least value was obtained by BL23 × NB4D2 (190.55).

Standard deviation of cocoon length-width ratio calculated for F1 hybrids ranged from 8.57 in the control PM × NB4D2 to 12.32 in RD1 × NB4D2 during July-August. Similarly, standard deviation was found minimum (6.03) in BL24 × NB4D2 and maximum (10.25) in MY1 × NB4D2 during November-December, 1998. During July-August, minimum value of CV % (4.22) was expressed in MY1 × NB4D2 and maximum (6.44) in RD1 × NB4D2. Minimum CV % was expressed in P2D1 × NB4D2 (3.10) and maximum value in MY1 × NB4D2 (4.98) during November-December.

DISCUSSION

Study on hybrid vigour revealed that different multivoltine × bivoltine hybrids expressed positive heterosis for various economic characters in two seasons. It was interesting to note that one hybrid BL43 × NB4D2 exhibited maximum positive significant heterosis over mid parent value for yield/10,000 larvae by number during July-August whereas the same was found maximum in P2D1 × NB4D2 followed by BL43 × NB4D2 and BL24 × NB4D2 respectively in November-December. Hybrid vigour in other economic characters like yield/10,000 larvae by weight was maximum in BL43 × NB4D2, cocoon weight and cocoon shell weight in BL24 × NB4D2 and SR % in BL23 × NB4D2 during July-August. Hybrids like P2D1 × NB4D2 expressed high hybrid vigour for yield/10,000 larvae by number, PM × NB4D2 for yield/10,000 larvae by weight and cocoon weight, BL43 × NB4D2 for cocoon shell weight and SR % during November-December respectively. Tayade (1987) observed high hybrid vigour for cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon yield in F1 hybrid between Hosa Mysore × NB4D2. In another study, Singh and Rao (1996) have found high heterosis in multivoltine hybrids during favourable as well as unfavourable seasons.

Significant hybrid vigour for cocoon yield, survival rate, cocoon weight, filament length and filament size has been observed in bivoltine hybrids (Subba Rao and Sahai, 1989). Rahman and Jahan (1997) have studied hybrid vigour for cocoon breadth in two rearing seasons and they found higher heterosis in favourable season. Ravindra Singh *et al.*, (1990) have found high hybrid vigour for cocoon shell weight, cocoon weight and filament size in crosses between recessive trimoulter and tetramoulter silkworm strains. Significant hybrid vigour for survival rate, cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio has been reported in hybrids between a parthenote and bisexual silkworm strains (Ravindra Singh *et al.*, 1994). Very high heterosis for cocoon weight and cocoon shell weight was found in F1 hybrid between low yielding multivoltine and bivoltine silkworm breeds (Rao *et al.*, 1998). Few attempts have been made to study hybrid vigour in backcrosses (Singh and Hirobe, 1964 ; Ravindra Singh *et al.*, 1992) in three way crosses (Das *et al.*, 1994) single and double crosses (Kremsky, 1983). Influence of cocoon size and cocoon weight on hybrid vigour was studied by Petkov and Yelov (1979).

Uniform cocoon shape is of immense use in order to identify silkworm parents/hybrids with uniform filament size. Studies have been made on cocoon shape variability in silkworm breeds and hybrids (Hirabayashi, 1982 ; Gamo *et al.*, 1985 ; Nakada, 1989 ; 1998). In the present study, MY1 × NB4D2 and PM × NB4D2 have shown CV % of 4.22 and 4.36 respectively during July-August and they were found relatively more uniform though their SD values were more than 8. During November-December, three hybrids i.e., P2D1 × NB4D2, BL24 × NB4D2 and BL23 × NB4D2 with CV % of 3.10, 3.11 and 3.18 respectively were found relatively uniform. Similar results have been obtained in F1 hybrids between Multivoltine × Bivoltine and bivoltine hybrids (Ravindra Singh *et al.*, 1998b).

The results of the present study make some contribution to at least three areas. Firstly, they show variability in multi $\times$ bi F1 hybrids in different seasons. Secondly, different hybrid combinations showed significant positive heterosis for various economic characters in two seasons and finally, the results provide information on determination of F1 hybrids with relatively uniform cocoon shape with uniform filament size.

REFERENCES

- CHANG. K. Y., HAN. K. S., MIN. B. Y. (1981) Genetic studies on silkworm characters by diallel cross. II. Analysis of heterosis and combining abilities. Seric. J. Korea 22 : 1-7.
- 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 : 69-86.
- DAS. S.K., PATNAIK S., GHOSH B., SINGH T., NAIR B.P., SEN S. K., SUBBA RAO, G. (1994). Heterosis analysis in some three way crosses of *Bombyx mori* L. Sericologia 34 : 51-61.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races (*Bombyx mori* L.) in India. Sericologia 24 : 393-415.
- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in silkworm *Bombyx mori* L. Japan. J. Breed 33 : 178-190.
- GAMO T., OHTSUKA Y. (1980) Phylogenetic studies on the racial differences of the silkworm *Bombyx mori* on the basis of polymorphic genes in haemolymph proteins. Bull. Sericult. Exp. Sta. 28 : 15-50.
- GAMO T., SAITO S., OHTSUKA Y., HIROBE T., TAZIMA Y. (1985) Estimation of combining ability and genetic analysis by diallel crosses between regional races of silkworm. (2) Shape and size of cocoon. Techn. Bull. Seric. Exp. Sta. 126 : 121-135.
- HIRABAYASHI T. (1982) Influence of difference of cocoon shape in pure strains to that of hybrids. Sansi-Kenkyu (Acta Sericologia) 121 : 27-36.
- HIROBE T. (1956) An analysis of heterosis made with the silkworm. Proc. Internat. Genet. Symp, pp. 356-361.
- KREMSKY J. (1983) Effect of heterosis in polish single and double cross silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) *Genetica - Polonica* (Poland) Polish J. Theor. Appl. Genet. 24 : 73-93.
- MANO Y. (1994) Comprehensive report on silkworm breeding. Report submitted to Central Silk Board, Bangalore ; 1-180.
- NAGARAJU J., PREMALATHA V., RAVINDRA SINGH, NOAMANI M. K. R., JOLLY, M. S. (1989) Isolation of a polyvoltine strain with sex limited larval marking in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) Sericologia 29 : 495-502.
- NAGARAJU J., RAJE URS, DATTA R. K. (1996) Cross breeding and heterosis in the silkworm, *Bombyx mori*, A review, Sericologia, 36 : 1-20.
- NAKADA T. (1994) On the cocoon shape measurement and its statistical analysis in the silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 33(1) : 100 -102.
- NAKADA T. (1989) On the measurement of cocoon shape by use of image processing method with an application to the sex discrimination of silkworm *Bombyx mori* L. Proc. 6th Internat. Cong. SABRAO (pp. 957-960).
- NAKADA T. (1998) A statistical analysis on the genetic differentiation of cocoon shape in the silkworm *Bombyx mori*. Memoirs Fac. Agric. Hokkaido Univ. Japan, 21 : 101-109.
- PETKOV N., YOLOV A. (1979) Influence of cocoon size and weight on heterosis effect in silkworm (*Bombyx mori* L.) Genet. Sel. 12 : 286-291.
- RAHMAN S. M., JAHAN M. S. (1997) Heterosis and combining ability estimates for cocoon breadth in silkworm *Bombyx mori* L. Bull. Sericult. Res. 8 : 7-11.
- 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.

- RAO P. R. M., RAVINDRA SINGH, NAGARAJ C. S., VIJAYARAGHAVAN K. (1997) Studies on foundation hybrids in silkworm, *Bombyx mori* L. Uttar Pradesh J. Zool. 17 : 75-81.
- RAVINDRA SINGH, NAGARAJU J., RAO, P. R. M., PREMALATHA V., VIJAYARAGHAVAN, K., GUPTA S. K. (1990) Heterosis analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. Sericologia, 30 : 293-300.
- RAVINDRA SINGH, VIJAYARAGHAVAN K., PREMALATHA V., RAO P. R. M., SENGUPTA K., KANNANTHA V. (1992) Hybrid vigour in F₁, F₂ and backcrosses in silkworm *Bombyx mori* L. Mysore J. Agric. Sci. 26 : 76-81.
- RAVINDRA SINGH, JAYASWAL K. P., SARATCHANDRA B. (1994) Parthenogenetic development of ovarian eggs in some breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. Entomon, 19 : 57-62.
- RAVINDRA SINGH, SUDHAKARA RAO P., KALPANA G. V., BASAVARAJA H. K., AHSAN, M. M., DATTA R. K. (1998a) Studies on hybrid vigour in different crosses of the silkworm *Bombyx mori* L. Sericologia 38 (1) : 155-158.
- RAVINDRA SINGH, KALPANA G. V., SUDHAKARA RAO P., AHSAN, M. M. (1998b) Studies on cocoon shape in different crosses of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 37 : 57-60.
- RAZDAN, J. L., SIDDIQUI A. A., BALI R. K., MUKHERJEE P. (1994) Study on the identification of region-specific heterotic crosses in *Bombyx mori* L. Sericologia 34 : 249-260.
- ROY, G. L., GHOSH B., DAS S. K., NAIR B. P., RAO P. R. T., SEN S. K., SENGUPTA K., SINHA S. S. (1997) Comparative performance of multivoltine $\times$ bivoltine and bivoltine $\times$ multivoltine hybrids of *Bombyx mori* L. for commercial use in eastern India. Sericologia 37 : 113-121.
- SINGH C. P., HIROBE T. (1964) Studies on the hybrid vigour of backcrosses in the silkworm with special references to the crosses (Tropical $\times$ Japanese) under different rearing temperature. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ. 12 : 43-53.
- SINGH T., SUBBA RAO G. (1996) Heterosis effect on economic traits in new hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L. Canye Kexue 22 : 42-46.
- SUBBA RAO G., SAHAI V. (1989) Combining ability and heterosis studies in Bivoltine strains of silkworm *Bombyx mori* L. Uttar Pradesh J. Zool. 9 : 150-164.
- TAYADE D. S. (1987) Heterosis effect on economic traits of new hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. Under Marathwada conditions. XV. Internat. Sericult. Cong. Sericologia, 27 : 301-307.
- TZENOV P., PETKOV N., NACHEVA Y. (1994) Studies on heterosis expression and degree of dominance displaced for some quantitative traits characterising the food utilization in F₁ crosses between Japanese and Chinese bivoltine races of *Bombyx mori* L. Sericologia 34 : 421-429.

EVALUATION D'HYBRIDES F1 POLYVOLTINS × BIVOLTINS DU VER A SOIE DU MURIER, *BOMBYX MORI* L. AU COURS DE DEUX SAISONS DIFFERENTES

RAVINDRA SINGH, RACHNA GOEL, D. RAGHAVENDRA RAO, M. REKHA,
V. PREMALATHA, M. M. AHSAN & R. K. DATTA

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

*Une étude a été réalisée en juillet–août et en novembre–décembre 1998 pour évaluer l'hétérosis des hybrides F1 entre des souches polyvoltines et bivoltines du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. Le degré d'hétérosis varie considérablement pour plusieurs caractères quantitatifs chez les hybrides F1 au cours des deux saisons. En juillet – août BL43 × NB4D2 présente une hétérosis positive significative par rapport à la valeur médiane des parents, pour la fécondité, le rendement / 10 000 larves en poids et le poids du cocon tandis que BL24 × NB4D2 présente une vigueur hybride significative pour le rendement pour 10 000 larves à la fois en nombre et en poids et pour le poids de la coque en novembre–décembre. Les mesures de la forme du cocon révèlent que les cocons sont comparativement plus uniformes en novembre–décembre par rapport à juillet–août. Nous discutons de l'importance de cette étude dans le but de produire des cocons uniformes au titre de filament uniforme et des hybrides F1 avec des effets hétérotiques et des caractères quantitatifs élevés.*

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, à cause de sa valeur économique majeure est distribué dans de nombreux endroits et présente des races géographiques bien définies (Gamo et Ohtsuka, 1980). Chez les plantes, on utilise des lignées généralement très consanguines pour l'exploitation commerciale tandis que chez le ver à soie les hybrides F1 sont utilisés pour la production commerciale de soie (Chang et coll., 1981 ; Gamo et Hirabayashi, 1983) puisque les hybrides F1 sont supérieurs aux souches parentales pour plusieurs caractères économiques (Hirobe, 1956). La sériciculture indienne a presque toujours été polyvoltine jusque dans les années 1970 et pendant les trois dernières décennies, la production de soie mûrier a fait un bond en avant en Inde, qui est dû à l'introduction d'hybrides F1 polyvoltins × bivoltins qui représentent plus de 95 % de la production totale de soie (Datta, 1984). Récemment Roy et coll., (1997) ont étudié la performance d'hybrides F1 polyvoltins × bivoltins et bivoltins × polyvoltins pour une utilisation commerciale dans l'est de l'Inde.

L'exploitation de la vigueur hybride chez le ver à soie a été largement étudiée (Singh et Hirobe, 1964 ; Petkov et Yelov, 1979 ; Nagaraju et coll., 1989 ; Subba Rao et Sahai, 1989 ; Ravindra Singh et coll., 1990, 1992, 1994, 1998a ; Singh et Rao, 1996 ; Kremisky, 1983 ; Razdan et coll., 1994 ; Das et coll., 1994 ; Tzenov et coll., 1994 ; Tayade, 1987). Nagaraju et coll., (1996) ont publié une revue sur l'hétérosis et le croisement chez le ver à soie.

Des essais ont été faits sur la variabilité des caractères quantitatifs chez le ver à soie (Chatterjee et coll., 1993 ; Rao et coll., 1997) tout comme sur la variabilité de la forme du cocon chez les lignées de vers à soie parentales et chez les hybrides (Hirabayashi, 1982 ; Gamo et coll., 1985 ; Nakada, 1989). La forme du cocon est un paramètre important du point de vue de la production et de l'évolution de la soie et pour l'évaluation des hybrides commerciaux (Nakada, 1994). Rahman et Jahan (1997)

ont estimé l'hétérosis pour la largeur du cocon chez le ver à soie, *Bombyx mori*. En Inde, il existe peu d'information sur la variabilité de la forme du cocon chez les hybrides F1 par comparaison aux autres pays avancés au plan séricicole comme la Chine et le Japon (Ravindra Singh et coll., 1998b). Les sélectionneurs de vers à soie donnent de plus en plus d'importance à la forme et à la variation de la taille du cocon car les cocons uniformes possèdent une bonne dévidabilité, moins de rupture de fil, un rendement en soie plus élevé, un titre de filament régulier ainsi qu'une bonne netteté du fil de soie. Comme l'a signalé Mano (1994), l'uniformité du cocon est très importante pour obtenir un titre de filament uniforme dans les machines de dévidage automatiques et semi-automatiques. L'étude présente a donc été entreprise dans le but de connaître la manifestation de la vigueur hybride pour les caractères quantitatifs et pour connaître la variabilité de la forme du cocon chez les hybrides F1 polyvoltins × bivoltins.

MATERIELS ET METHODES

Six lignées de vers à soie polyvoltins PM, RD1, P2D1, MY1, BL23, BL24 et BL43 sont utilisées. On procède à des croisements entre les lignées polyvoltines et la lignée bivoltine (NB4D2). L'élevage des hybrides F1 et de leurs parents a été réalisé en juillet – août et en novembre – décembre 1998. Trois répétitions sont élevées pour chaque hybride / parent et 300 larves sont retenues après la troisième mue. PM × NB4D2 est utilisé comme témoin. Les données sont recueillies pour la fécondité, le % d'éclosion, la durée larvaire totale, le taux de survie, le rendement en cocons, le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse.

L'hétérosis par rapport à la valeur médiane du parent (MPV) et par rapport à la valeur du meilleur parent (BPV) pour chaque caractère est calculée d'après la formule suivante :

$$1 \text{ Hétérosis par rapport à MPV} = \frac{F1 - MPV}{MPV} \times 100$$

$$2. \text{ Hétérosis par rapport à BPV} = \frac{F1 - BPV}{BPV} \times 100$$

Pour étudier la variabilité de la forme du cocon chez les hybrides F1, 100 cocons sont pris au hasard et trois variables de la forme du cocon : la longueur du cocon, la largeur du cocon et le rapport longueur / largeur sont déterminées en utilisant la formule suivante :

$$\frac{\text{longueur}}{\text{largeur}} \times 100$$

La longueur du cocon et la largeur du cocon sont mesurées en utilisant des pieds à coulisse micrométriques. La variabilité de la forme du cocon est déterminée en utilisant le test d'uniformité sur la base de l'écart type (SD) suggéré par Mano (1994). Le ratio entre la longueur et la largeur du cocon est calculé pour chaque cocon et l'écart type et le coefficient de variation (% CV) sont pris en compte pour déterminer l'uniformité des cocons. On considère que les hybrides F1 qui présentent l'écart type et le coefficient de variation les plus faibles sont les plus uniformes.

RESULTATS

L'hétérosis par rapport à la valeur médiane du parent et à la valeur du meilleur parent pour les caractères quantitatifs dans différents croisements entre les hybrides F1 polyvoltin × bivoltin réalisés en juillet – août et en novembre – décembre est présentée respectivement dans les Tableaux I et II.

L'hybride BL43 × NB4D2 montre sa supériorité de par sa vigueur hybride maximum pour la fécondité (+ 19,25 %), pour le rendement / 10 000 larves en nombre (+ 5,76 %) et pour le rendement / 10 000 larves en poids (+ 32,66 %) tandis que BL24 × NB4D2 présente la vigueur hybride maximum pour le poids du cocon (+ 36,98 %) et le poids de la coque (+ 45,73 %) en juillet – août. En novembre – décembre, P2D1 × NB4D2 présente l'hétérosis maximum pour la fécondité (+ 14,61 %) et pour le rendement / 10 000 larves en nombre (+ 11,93 %).

En juillet – août, on trouve la vigueur hybride totale maximum par rapport à la valeur médiane des parents et par rapport à la valeur du meilleur parent (= + 127,01 et + 58,85) chez BL43 × NB4D2 suivi par BL24 × NB4D2 (respectivement + 112,87 et + 56,60). BL24 × NB4D2 donne une très bonne performance pour l'hétérosis totale par rapport à la valeur médiane des parents (+ 124,26) et par rapport à la valeur du meilleur parent (+ 73,30) en novembre – décembre.

Les mesures de la forme du cocon chez les hybrides F1 poly × bi au cours des deux saisons, c'est à dire en juillet – août et en novembre – décembre 1998, sont présentées dans le Tableau III. La forme du cocon est mesurée en enregistrant les valeurs moyennes pour la longueur du cocon, la largeur du cocon, le ratio longueur / largeur et le coefficient de variation (% CV) comme le montre le Tableau.

En juillet – août, la longueur moyenne des cocons chez les hybrides F1 est comprise entre 3,44 et 3,71 cm tandis qu'elle varie de 3,28 à 3,62 cm en octobre – novembre. En juillet – août, parmi toutes les combinaisons hybrides, MY1 × NB4D2 présente la meilleure longueur de cocon (3,71 cm). Le témoin PM × NB4D2 présente la valeur la plus élevée pour la longueur du cocon (3,62 cm) en novembre – décembre. La valeur moyenne pour la largeur du cocon est comprise entre 1,77 et 1,93 cm et 1,59 à 1,85 cm respectivement en juillet – août et en novembre – décembre. BL23 × NB4D2 présente la valeur maximum pour la largeur du cocon : 1,93 cm en juillet – août et 1,85 cm en novembre – décembre. Le ratio longueur – largeur est compris entre 185,32 et 209,03 et 190,55 à 205,80 respectivement en juillet – août et en novembre – décembre. En juillet – août, on observe la valeur maximum pour le ratio l / l chez MY1 × NB4D2 (209,03) et la valeur la plus faible est enregistrée chez BL23 × NB4D2 (185,32). En novembre – décembre, la valeur maximum est enregistrée par MY1 × NB4D2 (205,80) et la valeur la plus faible (190,55) est obtenue par BL23 × NB4D2.

L'écart type pour le ratio longueur / largeur du cocon calculé pour les hybrides F1 est compris entre 8,57 chez le témoin PM × NB4D2 et 12,32 chez RD1 × NB4D2 en juillet – août. De même l'écart type s'avère minimum (6,03) chez BL24 × NB4D2 et maximum (10,25) chez MY1 × NB4D2 en novembre – décembre 1998. En juillet – août, la valeur minimum de % CV (4,22) est exprimée par MY1 × NB4D2 et la valeur maximum (6,44) par RD1 × NB4D2. Le % CV minimum est obtenu avec P2D1 × NB4D2 (3,10) et la valeur maximum par MY1 × NB4D2 (4,98) en novembre – décembre.

DISCUSSION

L'étude de la vigueur hybride révèle que des hybrides polyvoltin × bivoltin différents présentent une hétérosis positive pour plusieurs caractères économiques au cours des deux saisons. Il est intéressant de noter que l'hybride BL43 × NB4D2 présente une hétérosis positive maximum significative par rapport à la valeur médiane du parent pour le rendement / 10 000 larves en nombre en juillet – août tandis que le même caractère est maximum chez P2D1 × NB4D2 suivi respectivement par BL43 × NB4D2 et BL24 × NB4D2 en novembre – décembre. La vigueur hybride pour d'autres caractères économiques comme le rendement / 10 000 larves en poids est maximum chez BL43 × NB4D2, chez BL24 × NB4D2 pour le poids du cocon et le poids de la coque et chez BL23 × NB4D2 pour la richesse soyeuse en juillet – août. Les hybrides comme P2D1 × NB4D2 expriment une vigueur hybride élevée pour le rendement / 10 000 larves en nombre, PM × NB4D2 pour le rendement / 10 000 larves en poids et pour le poids du cocon, et BL43 × NB4D2 pour le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse en novembre – décembre. Tayade (1987) a observé une vigueur hybride élevée pour le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse et pour le rendement en cocons chez l'hybride F1

entre Hosa Mysore et NB4D2. Dans une autre étude, Singh et Rao (1996) ont trouvé une hétérosis élevée chez les hybrides polyvoltins pendant les saisons favorables et défavorables.

On a observé une vigueur hybride significative pour le rendement en cocons, le taux de survie, le poids du cocon, la longueur du filament et le titre du filament chez les hybrides bivoltins (Subba Rao et Sahai, 1989). Rahman et Jahan (1997) ont étudié la vigueur hybride pour la largeur du cocon pendant deux saisons d'élevage et ont observé une hétérosis plus élevée pendant la saison favorable. Ravindra Singh et coll., (1990) ont trouvé une vigueur hybride élevée pour le poids de la coque, le poids du cocon et le titre du filament chez les croisements entre les souches de ver à soie récessives trimuante et tetramuante. On a signalé une vigueur hybride significative pour le taux de survie, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez les hybrides entre des souches de ver à soie parthénogénétiques et bisexuelles (Ravindra Singh et coll., 1994). On trouve une hétérosis très élevée pour le poids du cocon et le poids de la coque chez l'hybride F1 provenant de lignées de vers à soie polyvoltines et bivoltines à bas rendement (Rao et coll., 1998). Peu d'essais ont été faits pour étudier la vigueur hybride dans les croisements de retour (Singh et Hirobe, 1964 ; Ravindra Singh et coll., 1992), dans les croisements à trois voies (Das et coll., 1994) et chez les hybrides simples et doubles (Kremsky, 1983). L'influence de la taille du cocon et du poids du cocon sur la vigueur hybride a été étudiée par Petkov et Yelov (1979).

Des cocons uniformes sont utiles pour identifier les parents / hybrides du ver à soie au titre de filament uniforme. Des études ont été faites sur la variabilité de la forme du cocon chez les lignées de ver à soie et chez les hybrides (Hirabayashi, 1982 ; Gamo et coll., 1985 ; Nakada 1989 ; 1998). Dans l'étude présente, MY1 × NB4D2 et PM × NB4D2 donnent un % CV de 4,22 et 4,36 respectivement en juillet – août et ils s'avèrent relativement plus uniformes bien que les valeurs pour l'écart type soient supérieures à 8. En novembre – décembre, trois hybrides P2D1 × NB4D2, BL24 × NB4D2 et BL23 × NB4D2 au % CV de respectivement 3,10 ; 3,11 et 3,18 se sont avérés relativement uniformes. Des résultats similaires ont été obtenus chez les hybrides F1 provenant d'hybrides polyvoltins × bivoltins et de bivoltins (Ravindra Singh et coll., 1998b).

Les résultats de cette étude sont intéressants dans au moins trois domaines. D'abord, ils montrent une variabilité chez les hybrides F1 poly × bi pendant différentes saisons. En deuxième lieu, ils montrent que des combinaisons hybrides différentes présentent une hétérosis positive significative pour plusieurs caractères économiques au cours des deux saisons et finalement, les résultats fournissent des informations par rapport à l'obtention d'hybrides F1 aux cocons relativement uniformes et au titre de filament uniforme.

CADMIUM TOXICITY IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L. AND ITS IMPACT ON THE ECONOMIC BENEFIT OF SERICULTURE INDUSTRY

S P M. PRINCE W.* & V. SUBBURAM

Department of Environmental Sciences, Bharathiar University, Coimbatore –
641 046, Tamil Nadu – India.

*A laboratory investigation was carried out to assess the impact of cadmium (Cd) on sericulture industry. Mulberry (*Morus alba* L.) plants were grown in earthen pots previously contaminated with different levels (5-320 µg / g) of Cd. Mulberry leaves collected from these plants were given to the larval instars of silkworm *Bombyx mori* L. Results showed that mulberry plants do accumulate Cd in the leaves and the pollutant is bio-transferred to the silkworm larvae via feeding. The growth of larva and the quantity and quality of silk produced also showed a declining trend with an increase in the level of soil applied Cd. From the economics of cocoon production it was seen that the treatments showed negative results as reflected from the returns through cocoon yield and net income.*

Keywords: Cadmium, mulberry plant, *Morus alba* L., silkworm, *Bombyx mori* L., economic impact.

INTRODUCTION

Metals are a major group of pollutants that are known to have caused environmental problem in agricultural and natural areas (Kabata-pendias and Adriano, 1995). Metal ions in the soil are taken up by the plants and are transported to higher levels in the ecosystem through food chain. Such an accumulation of heavy metals in soil-plant herbivore hierarchy has already been documented (Donovan *et al.*, 1967; Hunter *et al.*, 1987). The excess of supply of these potential pollutants apart from affecting the feeding and utilization of host plant is also responsible for the reduction in the growth and development of the herbivore, which feed on them.

The mulberry silkworm is an economically important lepidopteran insect reared extensively for its proteinaceous fibers of economic value. Silkworm feeds exclusively on the mulberry leaves, which is cultivated widely in different agro-climatic conditions all over the world. Although there is a limited chance for the direct entry of heavy metals into the mulberry plant, there are sources like fertilisation, irrigation, sewage sludge compost amendment, aerial fall-out and other industrial activities which can enroute considerable amount of potentially toxic heavy metals to the mulberry plant. There is every possibility for metal accumulation and toxicity in the larval instars of silkworm *Bombyx mori* L.

Reports are available on various lepidopteran species showing developmental retardation and growth reduction due to metal stress (Sell and Bodznick, 1971). However, only a limited number of reports (Miyoshi *et al.*, 1978; Choi, 1989) are available regarding the effect of heavy metals on silkworm *Bombyx mori* L. Moreover, there is no systematic study, which examines the mobility, accumulation and impact of heavy metals from the soil to the silkworms through mulberry plant.

* Corresponding author. Email: prince14271@yahoo.com

Therefore, in the present investigation a systematic study was carried out in the laboratory to assess the biomobility of cadmium (Cd) from the soil to the silkworms through mulberry plants and its impact on the growth and development of silkworm (*Bombyx mori*) with the aim of clarifying whether Cd could cause any loss in silk production and if so its magnitude in terms of loss of US \$ / hectare / crop.

MATERIALS AND METHODS

MR-2 variety of mulberry stem cuttings were grown in large sized earthen pots filled with 10 kg of red (Alfisol) soil. The soil was amended with graded concentrations (5-320 $\mu\text{g} / \text{g}$) of Cd in the form of $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. After sufficient wetting and drying cycles (so as to ensure better contact between the soil and the metal), mulberry stem cuttings of uniform size were planted in each pot and allowed to grow for a total period of 95 days providing with all necessary agronomic packages as described by Krishnaswami (1978) for mulberry cultivation. Simultaneously, a bivoltine hybrid variety (L $\times$ NB4D2) of silkworm *Bombyx mori* was grown in the laboratory under hygienic and growth conditions. Immediately after the second moult (IIIrd instar) uniform size larvae of *Bombyx mori* were separated from the stock rearing and kept in a petriplate with three in each plate. An equal number of treatments which corresponds to the total number of treatments in pot culture were maintained with 3 larvae for each replication. The treatments were replicated two times. Due to the insufficient leaf production in the pot culture, experiments at the level were not conducted for (320 $\mu\text{g} / \text{g}$) of Cd treatment.

The larval groups under treatment were fed four times a day with the leaves of mulberry plants of respective treatments. The control group was fed with the leaves of control plants. Utmost care was taken during the growth period of silkworms to avoid disease and any external stress. The larvae were maintained up to spinning and before the onset of spinning, the fresh weight of the larvae was recorded. A representative larva from each group was separated and analysed for Cd content.

During spinning stage, the larvae were transferred to pre-labelled plastic trays, where the silkworms formed its cocoon. The cocoons were collected and the silk fibre was reeled out using an "epruvette" designed for single cocoon reeling. The economic characters of cocoon such as weight of the cocoon, shell weight, shell ratio, and length of the silk filament were assessed. The sericin and fibroin contents of the cocoon were assessed using the method of Orlandi (1954).

An economic benefit analysis was also carried out to find out the impact of Cd on sericulture industry based on the overall increase (or) decrease in cocoon production in treatment groups compared to the control. This value was again computed for the loss of US \$ / hectare / crop. All the data were statistically analysed using Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

RESULTS AND DISCUSSION

Data pertaining to the influence of Cd on the growth of silkworm *Bombyx mori* L. and silk production are presented in Table I.

Compared to the control, all the treatment groups showed a statistically significant declining trend in the mean weight of larva with increasing concentrations (5-160 $\mu\text{g} / \text{g}$) of Cd tested. Maximum reduction in the mean weight followed by the death of the larvae was observed at 160 $\mu\text{g} / \text{g}$ of Cd treatment. Incomplete cocoon formation, however, was observed even from 80 $\mu\text{g} / \text{g}$ of Cd treatment. All the economic characters of cocoon (single cocoon weight, shell weight, shell ratio, single pupal weight and length of the silk filament), compared to that of the control, showed a statistically significant decrease with increasing concentration of Cd tested. Increasing concentrations of Cd resulted in an increase in the level of sericin, whereas the fibroin content was reduced.

Table I. Effect of cadmium on the economic characters of the cocoon of silkworm, *Bombyx mori* L.Tableau I. Effet du cadmium sur les caractères économiques du cocon du ver à soie, *Bombyx mori* L.

Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Mean wt. of larva (g)	Single cocoon wt. (g)	Single shell wt. (g)	Shell ratio (%)	Single pupal weight (g)	Length of silk filament (m)	Sericin (%)	Fibroin (%)
	<i>Poids moyen d'une larve (g)</i>	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Poids d'une pupe (g)</i>	<i>Longueur du filament de soie (m)</i>	<i>Séricine (%)</i>	<i>Fibroïne (%)</i>
Control / <i>Témoin</i>	0.947 $\pm$ 0.03a	0.585 $\pm$ 0.01a	0.105 $\pm$ 0.012a	17.91 $\pm$ 0.73a	0.477 $\pm$ 0.007a	260 $\pm$ 6.56a	21.00 $\pm$ 1.00c	78.66 $\pm$ 1.53b
5	0.755 $\pm$ 0.15b	0.526 $\pm$ 0.01ab	0.091 $\pm$ 0.008a	17.26 $\pm$ 1.16a	0.436 $\pm$ 0.003b	223 $\pm$ 16.6b	16.33 $\pm$ 1.53d	83.00 $\pm$ 2.65a
10	0.716 $\pm$ 0.15b	0.509 $\pm$ 0.04b	0.075 $\pm$ 0.006b	14.79 $\pm$ 1.12b	0.428 $\pm$ 0.001b	198 $\pm$ 15.6b	22.33 $\pm$ 1.53c	76.33 $\pm$ 2.08bc
20	0.717 $\pm$ 0.16b	0.418 $\pm$ 0.02c	0.055 $\pm$ 0.010b	13.01 $\pm$ 1.91b	0.363 $\pm$ 0.014c	131 $\pm$ 18.5c	23.66 $\pm$ 2.08bc	76.33 $\pm$ 2.08bc
40	0.670 $\pm$ 0.11b	0.307 $\pm$ 0.07d	0.027 $\pm$ 0.005c	8.77 $\pm$ 1.30c	0.280 $\pm$ 0.003d	114 $\pm$ 20.8c	26.00 $\pm$ 2.04b	73.00 $\pm$ 2.65 cd
80	0.643 $\pm$ 0.03b	0.278 $\pm$ 0.01 d#	0.019 $\pm$ 0.005c	6.66 $\pm$ 1.30c	0.256 $\pm$ 0.010c	83 $\pm$ 9.00d	30.00 $\pm$ 2.64a	69.66 $\pm$ 2.08d
160	0.609 $\pm$ 0.06b	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
320	LNE	-	-	-	-	-	-	-

Incomplete cocoon / *Cocon incomplet*.DL – Death of the larva LNE / *Mort de la larve LNE*.Leaf not enough for the conduct of feeding experiment / *Pas assez de feuilles pour la conduite de l'expérience*.DSC : Decay of stem cuttings / *Pourrissement des boutures*.In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT / *Dans une colonne, les moyennes suivies par une lettre identique ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %, d'après le test de Duncan*.

Table II. Effect of cadmium on the economic benefit of sericulture industry.

Tableau II. Effet du cadmium sur les profits de l'industrie séricicole.

Treatments	Mean cocoon weight	% increase / decrease	Yield gain / loss in US \$ / ha / crop
Traitements	Poids moyen d'un cocon	% d'augmentation / de baisse	Gain / Perte de profit en US \$ / ha / récolte
Control / Témoin	0.585	-	-
5	0.526	- 10.08	- 326.087
10	0.509	- 12.99	- 420.226
20	0.418	- 28.55	- 923.592
40	0.307	- 47.52	- 1537.261
80*	0.278	- 52.47	- 1697.4045
160	DL	DL	DL
320	DL	DL	DL

* Incomplete cocoon formation / * Formation incomplete du cocon.

DL – Death of larva / Mort des larves.

Perusal of the results showed that, even a low level of Cd (5 µg / g) addition to the soil (corresponding levels of Cd in the leaf and larvae were 4.66 and 2.46 µg / g respectively (Figure 1) affected the growth and development of the silkworm *Bombyx mori*. These results are more or less on par with the findings of Miyoshi *et al.*, (1978) who suggested that Cd above 2.5 ppm in the diet (artificial) is toxic and would affect the growth and development of silkworm *Bombyx mori*.

The growth and development of the larva, apart from the quantity of leaf consumed, also depends on the ability of the larvae to digest and resynthesize the body proteins which mainly depends upon the nutritional quality of mulberry leaves. The quality of food ingested by an insect larva influences its survival, growth rate and final instar body weight (Slansky and Scriber, 1985). The nutritional quality of leaves in turn depends on a number of factors. Apart from agronomic factors, the input of organic and inorganic pollutants into the plough layers also play a major role over the regulation of the nutritional quality of plant leaves. Especially, inorganic pollutants like heavy metals, when taken up by the plants alters the essential macro and micro nutrient status as well as the biochemical constitutions of the leaves (Prince, 1999).

In the present investigation, it was clear that mulberry plants accumulated Cd in the leaves and the larvae, which fed on these contaminated leaves also, showed Cd accumulation (Fig. 1). Such an accumulation of Cd from the host plant to the larvae has already been reported (Schmidt *et al.*, 1992). The accumulated Cd inside the larval body, since it has no ascribed biological function and is a potent enzyme inhibitor (Perizek and Zahor, 1956; Singh and Mathur, 1968) might have negatively acted upon various enzymatic processes like protein synthesis and suppressed the growth of the silkworm. According to Jana (1981) Cd accelerates the action of enzyme protease and decreases the protein

content. Besides, Cd is also known to produce serious fat body injury (Martoja *et al.*, 1983; Ortel, 1991). Since fat body is an important site of metabolic activity and storage organ (Chen and Wu, 1994) any disturbance posed on the fat body would result in an altered metabolic function affecting the growth and even some times death of the larva. Death of the larvae as observed at the higher concentrations (above 80 $\mu\text{g/g}$) may thus be the effect of Cd on the bio-energetic materials.

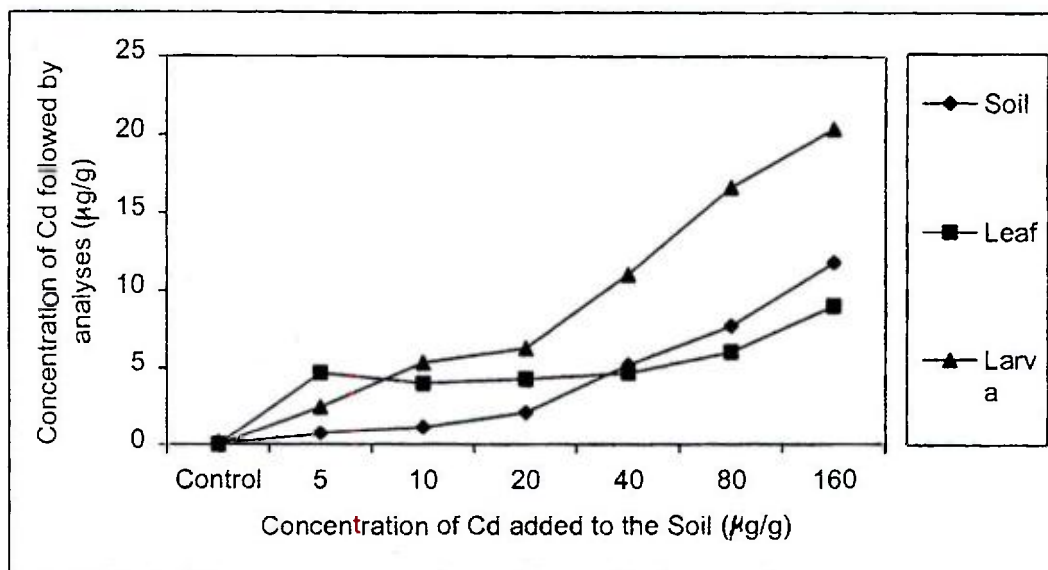


Figure 1. Cadmium content ($\mu\text{g/g}$) of soil, leaf and the larva.

Figure 1. Teneur en cadmium ($\mu\text{g/g}$) du sol, de la feuille et de la larve.

Significant changes were also observed in the cocoon weight and other economic characters of the cocoon. The observed declining trend in the economic characters of cocoon (length of silk filament, shell ratio and fibroin content) may either be due to the direct or indirect toxic effect of Cd on the growth and development of silk gland of the silkworm *Bombyx mori*.

The silk gland is an organ of definite cell mass (but it varies among different races). The growth of the silk gland involves swelling and increasing of the size of each of its cells while the increase in the number of cells through multiplication does not occur (Aruga, 1994).

The economic benefit analysis (Table II) carried out to assess the impact of Cd on sericulture industry revealed that, compared to control, approximately 10 per cent reduction was observed in the weight of the cocoon even at a low (5 $\mu\text{g/g}$) level of Cd addition to the soil. This when calculated for income was around US \$ 326.087 / hectare / crop.

Decrease in the cocoon weight coupled with the loss of income increased with increasing concentrations of soil applied Cd with a maximum reduction observed at the highest concentration (80 $\mu\text{g/g}$) of Cd tested, where the economic loss was around US \$ 1697.40 / hectare / crop.

ACKNOWLEDGEMENTS

SPM Prince W. acknowledges with appreciation to the Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi-India, for providing financial support in the form of senior research fellowship (SRF). We thank Prof. Dr Gopal, professor and Head, Department of Environmental Sciences for providing necessary research facilities. Thanks are also due to Prof. Dr S. Chandramohan and Late Dr N. Sivapragasam, Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University for providing technical informations regarding sericulture.

REFERENCES

- ARUGA H. (1994) Morphology, physiology, ecology and genetics of the silkworm In: Principles of sericulture, Oxford and IBH publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
- CHEN Y. Y., WU Y. C. (1994) Study on the effect of fluoride on growth, development and economic parameters of the silkworm, *Bombyx mori* L., *Sericologia*, 34(4), 627-635.
- CHOI J. S. (1989) Studies on the effect of cadmium on the physiology of silkworm, *Bombyx mori* L., *Korean J. Seric. Sci*, 29(2), 38-43.
- DONOVAN P. P., FELLE D. T., CARAVAN P. P. (1967) Lead contamination of mining areas in W. Ireland. Survey of animal pastures, food and waters. *J. Sci. Ed. Agri.*, 20, 43-45.
- HUNTER B. A., JOHNSON M. S., THOMPSON D. J. (1987) Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grass land ecosystem. *J. Applied Ecology*, 24, 587-599.
- JANA S. (1981) Ph. D. thesis. University of Burdwan.
- KABATA-PENDIAS A., ADRIANO D. C. (1995) Trace metals In: Soil amendments and Environmental quality. J. E. Rechcigl (Ed.), Lewis publishers, Inc. pp. 139-167.
- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in South India, Central Sericulture Research and Training Institute, Bulletin No. 1. Mysore, India pp. 19.
- MARTOJA R., BOUQUEGNEAU J. M., VERTHE C. (1983) Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in insect *Locusta migratoria*. *J. Invert. Pathol*, 42, 17-19.
- MIYOSHI T., SHIMIZU O., MIYAZAWA F., MACHIDA J., ITO M. (1978) Effect of heavy metals on the mulberry plant and silkworm. III. Co-operative effect of heavy metals on silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Jpn*, 47(1), 77-84.
- ORLANDI L. (1954) Percentuale di Sericima im Boffoli di Diverse Raffe E Imcroci Di *Bombyx mori* L. 5, 195.
- ORTEL J., VOGEL W. R. (1991) Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. *Entomol. Exp. Appl.* 83-88.
- PERIZEK J., ZAHOR (1956) *Nature* (London), 177, 1036.
- PRINCE SPM W. (1999) Ph. D. thesis. Bharathiar University, Coimbatore, Tamil Nadu, India.
- SCHMIDT G. H., IBRAHIM NMM., ABDALLAH M. D. (1992) Long term effects of heavy metals in food on developmental stages of *Aiolopus thalassinus* (Saltatoria: Acrididae) *Arch. Contam. Toxicol*, 23, 375-382.
- SELL D. K., BODZNICK D. A. (1971) Effects of dietary zinc sulphate on the growth and feeding of the tobacco bud worm *Heliothis virescens*. *Ann. Entomol. Soc. Am*, 64, 850-855.
- SINGH K., MATHUR R. S. (1968) *J. Repro. Fert*, 17, 509.
- SLANSKY F., SCRIBER T. M. (1985) Food consumption and utilisation. In: Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds), Pergamon press, pp. 87-163.

TOXICITE DU CADMIUM CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. ET SON IMPACT SUR LES PROFITS DE L'INDUSTRIE SERICICOLE

S. P. M. PRINCE W.* & V. SUBBURAM

Department of Environmental Sciences, Bharathiar University, Coimbatore – 641 046,
Tamil Nadu – Inde.

*Nous avons réalisé une étude en laboratoire pour évaluer l'impact du cadmium (Cd) sur l'industrie séricicole. Les plants de mûrier (*Morus alba* L.) sont cultivés dans des pots en terre ayant préalablement été contaminés avec différents niveaux (5-320 µg / g) de Cd. Les feuilles de mûrier recueillies à partir de ces plants sont fournies aux ver à soie à différents âges larvaires *Bombyx mori* L. Les résultats montrent que les plants de mûrier accumulent du Cd dans les feuilles et que le polluant est transféré biologiquement aux larves de ver à soie par le nourrissage. La croissance des larves et la quantité et la qualité de soie produite montrent une tendance à la baisse avec l'augmentation du niveau de Cd appliqué dans le sol. Sur le plan économique, les traitements entraînent des résultats négatifs comme le montrent le rendement en cocons et le revenu net.*

INTRODUCTION

On sait que les métaux font partie des polluants les plus importants, et entraînent des problèmes environnementaux dans les zones agricoles et naturelles (Kabata-pendias et Adriano, 1995). Les ions métalliques du sol sont absorbés par les plantes et transportés par le biais de la chaîne alimentaire à des niveaux supérieurs de l'écosystème. Il existe beaucoup de données sur l'accumulation des métaux lourds chez les plantes et dans la hiérarchie herbivore (Donovan et coll., 1967 ; Hunter et coll., 1987). L'excès de ces polluants potentiels a non seulement des effets sur l'alimentation et l'utilisation des plantes hôtes mais est aussi responsable de la baisse de croissance et de développement des herbivores qui s'en nourrissent.

Le ver à soie du mûrier est un insecte lépidoptère économiquement important, qui est élevé de manière extensive pour ses fibres protidiques qui ont une valeur économique. Le ver à soie se nourrit exclusivement de feuilles de mûrier, lequel est abondamment cultivé dans des conditions agro-climatiques différentes dans le monde entier. Bien que le risque d'entrée directe des métaux lourds dans le plant de mûrier soit limité, il existe des sources comme la fertilisation, l'irrigation, l'amendement avec du compost provenant de boues d'épuration, les retombées aériennes, et d'autres activités industrielles qui peuvent amener une quantité considérable de métaux lourds potentiellement toxiques pour le plant de mûrier. La possibilité d'accumulation de métal et de toxicité pendant les âges larvaires du ver à soie *Bombyx mori* L. est donc réelle.

Il existe des études sur des espèces de lépidoptères variées qui présentent un retard de développement et une diminution de la croissance à cause du stress dû au métal (Sell et Bodznick, 1971). Cependant, il existe seulement un nombre limité d'études (Miyoshi et coll., 1978 ; Choi, 1989) sur l'effet des métaux lourds chez le ver à soie *Bombyx mori* L. De plus, il n'existe pas d'étude

* Auteur auquel adresser la correspondance. Email: prince14271@yahoo.com

systématique, qui examine la mobilité, l'accumulation et l'impact des métaux lourds provenant du sol sur les vers à soie par le biais du mûrier.

Nous avons donc entrepris une étude systématique en laboratoire pour évaluer la biomobilité du cadmium (Cd) du sol chez les vers à soie par les plants de mûrier et pour connaître son impact sur la croissance et le développement du ver à soie (*Bombyx mori*) dans le but de savoir si le Cd peut entraîner des pertes de production en soie et dans ce cas pour connaître l'importance en termes de perte en US \$ / hectare / récolte.

MATERIELS ET METHODES

Des boutures de tige de la variété de mûrier MR-2 sont cultivées dans de grands pots en terre avec 10 kg de sol rouge (Alfisol). Le sol est amendé avec des concentrations progressives (5-320 µg / g) de Cd sous la forme de CdCl₂. 2H₂O. Après des cycles d'humidification et de séchage suffisants (de manière à assurer un meilleur contact entre le sol et le métal) les boutures de tige de mûrier de taille uniforme sont plantées dans chaque pot et cultivées pendant une période totale de 95 jours en suivant les pratiques agronomiques de Krishnaswami (1978) pour la culture de mûrier. Parallèlement, une variété d'hybride bivoltin (L × NB₄D₂) du ver à soie *Bombyx mori* est élevée en laboratoire dans des conditions hygiéniques de croissance. Immédiatement après la deuxième mue (IIIème âge) des larves de *Bombyx mori* de taille uniforme sont séparées du stock d'élevage et conservées dans une boîte de petri à raison de trois par boîte. Un nombre de traitements qui correspond au nombre total de traitements en pots est maintenu avec 3 larves pour chaque répétition. Les traitements sont répétés deux fois. A cause de la production insuffisante de feuilles en pots, les expériences pour le niveau de 320 µg / g de Cd n'ont pas été réalisées.

Les groupes larvaires traités sont nourris quatre fois par jour avec les feuilles de plants de mûrier provenant des traitements respectifs. Le groupe témoin est nourri avec des feuilles des plants témoins. On prend un soin particulier pendant la période de croissance des vers à soie pour éviter la maladie et tout stress externe. Les larves sont conservées jusqu'au filage et avant le début du filage, on enregistre le poids frais des larves. Une larve représentative de chaque groupe est prise et on analyse sa teneur en Cd.

Pendant la période de filage, les larves sont transférées dans des plateaux en plastique pré-étiquetés, où les vers à soie forment leurs cocons. Les cocons sont recueillis et la fibre de soie est dévidée en utilisant un appareil conçu pour le dévidage d'un cocon. Les caractères économiques du cocon tels que le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la longueur du filament de soie sont mesurés. La teneur en sérécine et en fibroïne du cocon est mesurée en utilisant la méthode d'Orlandi (1954).

On réalise une analyse du profit économique pour connaître l'impact du Cd sur l'industrie séricicole d'après l'augmentation (ou) la baisse globales de production de cocons chez les groupes traités par rapport au témoin. On calcule aussi la perte en US \$ / hectare / récolte. Toutes les données sont analysées de manière statistique en utilisant le Test de Duncan (DMRT).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant l'influence du Cd sur la croissance du ver à soie *Bombyx mori* L. et la production de soie sont présentées dans le Tableau I.

Tous les groupes traités présentent une tendance à la baisse statistiquement significative pour le poids moyen de la larve avec les concentrations de Cd en augmentation (5-160 µg / g). On observe une baisse maximum du poids moyen suivie par la mort des larves à 160 µg / g Cd. On relève une formation incomplète du cocon même à partir de 80 µg / g de traitement au Cd. Tous les caractères économiques du cocon (poids d'un cocon, poids de la coque, richesse soyeuse, poids d'une nymphe et longueur du filament de soie) présentent une baisse statistiquement significative par rapport au

témoin avec l'augmentation de la concentration en Cd. L'augmentation des concentrations en Cd entraîne une augmentation du niveau de sérécine, tandis que la teneur en fibroïne diminue.

L'examen des résultats montre que même un faible niveau d'ajout de Cd dans le sol ($5 \mu\text{g/g}$) (les niveaux correspondants de Cd dans la feuille et la larve étant de 4,66 et $2,46 \mu\text{g/g}$ respectivement (Figure 1)) ont un effet sur la croissance et le développement du ver à soie (*Bombyx mori*). Les résultats sont plus ou moins équivalents à ceux obtenus par Miyoshi et coll., (1978) qui ont suggéré qu'un niveau de Cd au-dessus de 2,5 ppm dans l'aliment (artificiel) est toxique et aurait un effet sur la croissance et le développement du ver à soie *Bombyx mori*.

La croissance et le développement des larves dépendent de la quantité des feuilles consommées, mais aussi de la capacité des larves à digérer et à resynthétiser les protéines corporelles qui dépendent principalement de la qualité nutritionnelle des feuilles. La qualité de la nourriture ingérée par une larve d'insecte influence sa survie, son taux de croissance et le poids du corps au dernier âge (Slansky et Scriber, 1985). La qualité nutritionnelle des feuilles à son tour dépend d'un certain nombre de facteurs. Les facteurs agronomiques jouent un rôle majeur dans la régulation de la qualité nutritionnelle des feuilles des plantes et les polluants organiques et inorganiques dans les couches labourées également. Ce sont surtout les polluants inorganiques comme les métaux lourds, qui lorsqu'ils sont absorbés par les plantes, altèrent l'état des macro et micro nutriments et la constitution biochimique des feuilles (Prince, 1999).

Dans cette étude, il est clair que les plants de mûrier accumulent du Cd dans les feuilles et les larves, qui se nourrissent sur ces feuilles contaminées présentent aussi une accumulation de Cd (Fig. 1). Une telle accumulation de Cd de la plante hôte à la larve a déjà été signalée (Schmidt et coll., 1992). Le Cd accumulé à l'intérieur du corps de la larve, puisqu'il n'a aucune fonction biologique attirée est un inhibiteur d'enzyme puissant (Perizek et Zahor, 1956 ; Singh et Mathur, 1968) et pourrait avoir des effets négatifs sur des processus enzymatiques variés comme la synthèse des protéines et stopper la croissance du ver à soie. Selon Jana (1981) le Cd accélère l'action de la protéase et fait baisser la teneur en protéines. On sait aussi que le Cd peut provoquer des dommages sérieux pour le corps gras (Martoja et coll., 1983 ; Ortel, 1991). Comme le corps gras est un site important de l'activité métabolique et l'organe de stockage (Chen et Wu, 1994) n'importe quel dérèglement du corps gras entraîne une altération des fonctions métaboliques qui a un effet sur la croissance des larves et pourrait parfois entraîner leur mort. La mort des larves que l'on observe aux concentrations les plus élevées (au-dessus de $80 \mu\text{g/g}$) pourrait ainsi résulter de l'effet du Cd sur les matières bioénergétiques.

On observe des changements significatifs du poids du cocon et des autres caractères économiques du cocon. La tendance à la baisse des caractères du cocon, (longueur du filament de soie, richesse soyeuse et teneur en fibroïne) que l'on observe pourrait être due à l'effet toxique direct ou indirect du Cd sur la croissance et le développement de la glande sérécigène du ver à soie *Bombyx mori*.

La glande sérécigène est un organe avec une masse cellulaire définie (mais elle varie entre les différentes races). La croissance de la glande sérécigène entraîne l'accroissement de la taille de chacune des cellules mais il n'y a pas d'augmentation du nombre des cellules par la multiplication (Aruga, 1994).

L'analyse économique (Tableau II) réalisée pour évaluer l'impact du Cd sur l'industrie sérécicole révèle que, par comparaison au témoin, on observe une baisse approximative du poids du cocon de 10 % même à un faible niveau de Cd dans le sol ($5 \mu\text{g/g}$). En termes de revenus, cela correspond à une perte de 326,087 US \$ / hectare / récolte.

La baisse du poids du cocon et la perte de revenus qui y est associée augmentent avec l'augmentation des concentrations de Cd appliquées dans le sol, avec une baisse maximum observée à la concentration la plus élevée de Cd ($80 \mu\text{g/g}$) où la perte économique s'élève à 1697,40 US \$ / hectare / récolte.

CHANGES IN MICROBIAL POPULATION DURING FERMENTATION OF SILKWORM PUPAE

K. P. YASHODA, N. M. SACHINDRA, D. NARASIMHA RAO & N. S. MAHENDRAKAR*

Meat, Fish and Poultry Technology, Central Food Technological Research Institute,
Mysore – 570 013, India.

*The fermentation ensiling of silkworm pupae (SWP) after mixing with different levels of molasses (0, 7.5 or 12.5 % w/w) and propionic acid (0, 0.25 or 0.5% v/w) was studied under microaerophilic condition at ambient temperature ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) in order to preserve nutrients in SWP and prepare a silage product for use in animal feeds. Further, inhibitive effects of sorbic (0.3% w/w) or benzoic (0.3% w/w) acids either singly or in combination with propionic acid (0.5 % v/w) on growth of yeast and moulds during fermentation was also studied. The results revealed that molasses at less than 10% (w/w) was inadequate and 12.5% had no additional advantage for effecting fermentation. A reduction in standard plate count and the number of spores, coliforms, *Escherichia coli*, staphylococci and enterococci and an increase in yeast and moulds and lactic acid bacteria during fermentation was noticed. Spores, coliforms and *E. coli* were absent after 1 day of fermentation. Inclusion of 0.5% (v/w) propionic acid and 0.3% (w/w) sorbic acid was found to be most effective in suppressing the growth of yeast and moulds. Benzoic acid (0.3% w/w) was not effective as an antimycotic agent. The study indicated that a microbiologically safe silage product can be prepared by homogenizing SWP with 10% (w/w) molasses, 0.5% (v/w) propionic and 0.3% (w/w) sorbic acid and fermenting under microaerophilic condition at ambient temperature ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) for 3 days.*

Keywords: Silkworm pupae, fermentation, microbial profile, silage.

INTRODUCTION

Sericulture is a fast growing agri-business and silk production is a well-established industry in India. Annually, India produces about 40,000 metric tonnes (on dry weight basis) of silkworm pupae (SWP) from silk reeling units (Anon, 1999). The majority of the reeling units are in small-scale private sectors and a small quantity of dead pupae is sun dried for use in feed for domestic poultry. Sun-drying is not eco-friendly and rendering is not economically feasible. As a result a considerable amount of dead pupae is disposed off as a waste causing environmental pollution besides loss of nutrients. Fermentation ensiling of SWP could be an economical process to prepare a product for use as an ingredient in animal feed as an alternative to conventionally used fish meal, which is expensive and is limited in supply by the availability of the raw material.

The SWP has very low levels of carbohydrates. Accordingly addition of fermentable sugars are required to effect fermentation. Malt meal (Nilsson & Rydin, 1963), corn syrup (Levin, 1994) or molasses (Durairaj *et al.*, 1976; Urlings *et al.*, 1993, Zuberi *et al.*, 1993 and Levin, 1994) have been used as a source of fermentable sugars to ensure a successful preservation of fish and poultry wastes. Successful fermentation ensiling of fish viscera and poultry intestines with optimized quantities of

* To whom correspondence should be addressed. Fax: 91-0821-516308 / 517233. Email: nsmahendra@yahoo.com.

molasses to obtain pathogen-free silage product was achieved in this laboratory (Anon, 1995; Ahmed *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1998). The studies on fermentation of SWP has not been reported so far in literature. In order to develop an appropriate fermentation ensiling technique, the work was designed to determine the optimum level of molasses as a source of carbohydrate. Propionic, sorbic and / or benzoic acids were tested for their efficacy as antimycotic agents during fermentation. A patent has been filed for a process of ensiling of Improved Cross Breed (PM × NB4D2) of SWP (Mahendrakar *et al.*, 1998).

The microbiological changes during fermentation of Traditional Cross Breed of SWP (PM × C. nichii) are reported here.

MATERIALS AND METHODS

Fresh SWP of traditional cross breed variety (PM × C. nichii) was procured soon after reeling in a batch of 8-10 kg each ($74.9 \pm 0.65\%$ moisture), brought to the laboratory within 1 h and homogenized in a bowl chopper to a pasty consistency. The homogenized product was divided into 1 kg lots and treated as below

Experiment I: Different levels of molasses (Grade 2* as per ISI, 1958) and propionic acid (Laboratory Reagent grade**)

Treatment	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C ₁	C ₂
Molasses as % (w/w) SWP	7.5	7.5	10.0	10.0	12.5	12.5
Propionic acid as % (v/v) SWP	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5

Experiment II : Different antimycotic agents (LR grade)

Treatment	A	B	C	D	E
Molasses as % (w/w) SWP	10	10	10	10	10
Propionic acid as % (v/v) SWP	0.5	-	-	0.5	0.5
Sorbic acid as % (w/w) SWP	-	0.3	-	0.3	-
Benzoic acid as % (w/w) SWP	-	-	0.3	-	0.3

* Density (brix degrees) at 27.5° C = 80 minimum; Sulfated ash = 17.5% maximum; Total reducing sugars = 44% minimum

** Minimum assay (GLC) = 99.0%; Density (at 20° C) = 0.991 - 0.994; Refractive index = 1.386 - 1.388; Boiling point = 138 - 142° C

Sorbic and / or benzoic acids were used at 0.3% (w/w) level as this is an upper limit for use as an antimycotic agent (Chichester & Tanner, 1972).

The mixture in 1 kg lot was transferred to plastic bottles, fermentation mixture layered with thin circular polyethylene film and the bottle was closed with a lid. The samples under such microaerophilic conditions were held at ambient temperature ($26 \pm 2^\circ \text{C}$). Changes in pH and microbial population of SWP during fermentation were monitored periodically as per the procedures outlined earlier (Ahmed *et al.*, 1996).

Statistical analysis:

The experiments which had a factorial design with treatment of SWP as one factor and fermentation time as the other were repeated 8 times (Experiment I) and 6 times (Experiment II). The results were statistically analyzed by two way Analysis of Variance Technique using Computer Software SPSS for Windows, Version 6.0 (SPSS Inc., 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

In the reeling plant the live cocoons from which SWP used in the current experiment were taken, are directly placed in boiling water for 30 - 60 minutes to facilitate reeling. Despite such a drastic treatment, the SWP had the microbial counts as presented in Table I possibly due to post reeling contamination. Standard plate counts (SPC), yeast and moulds (Y & M), coliforms and lactic acid bacteria (LAB) were present in all the batches of SWP procured whereas spores were present in 5 batches and *E. coli* only in 3 batches.

Table I. Microbial population of silkworm pupae (log cfu / g).

Tableau I. Population microbienne dans les chrysalides de vers à soie (log cfu / g).

Standard plate count / <i>Compte standard de plaque</i>	5.0 ± 0.32
Spore / <i>Spores</i>	0 - 1.84
Yeasts and mould / <i>Levures et moisissures</i>	1.9 ± 0.13
Lactic acid bacteria / <i>Bactéries d'acide lactique</i>	2.1 ± 0.347
Coliforms/ <i>Coliformes</i>	1.6 ± 0.34
<i>E. coli</i>	0 - 1.6
Staphylococci / <i>Staphylocoques</i>	1.6 ± 0.30
Enterococci / <i>Entérocoques</i>	1.7 ± 0.45

Each value is mean $\pm$ SD of 8 batches / *Chaque valeur représente la moyenne et l'écart type pour 8 lots.*

Experiment I: Different levels of molasses and propionic acid:

pH: the pH of untreated SWP was 6.2 ± 0.35 which decreased to 5.9 ± 0.28 , 5.8 ± 0.23 and 5.8 ± 0.25 when mixed with 7.5, 10.0 and 12.5% (w/w) molasses respectively. The fermentation time influenced significantly ($P \leq 0.001$) the fall in pH during fermentation despite significant ($P \leq 0.001$) batch to batch (replicates) variations. The interaction between treatment and fermentation time was also highly significant ($P \leq 0.001$). The fall in pH was, however, faster in the first 48 h in all the treatments (Fig. 1). It may be noted that the microbiologically safe pH of 4.2 (Raa & Gildberg, 1982) was reached in 42 h in all the treatment conditions. However, the pH of samples containing 7.5% (w/w) molasses were slightly higher compared to those containing 10.0 or 12.5% (w/w) molasses.

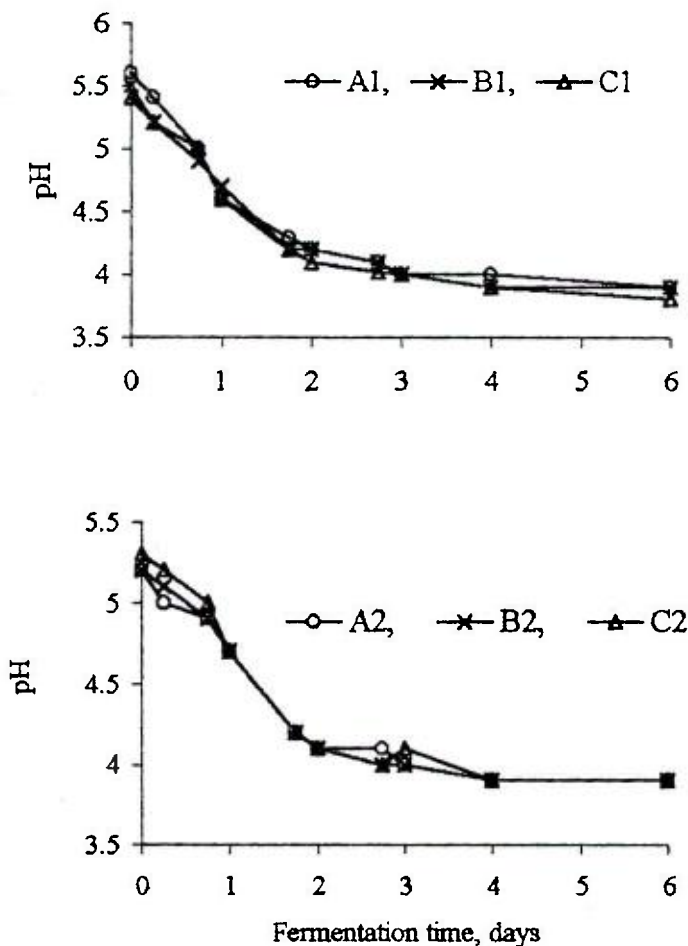


Figure 1. pH fall during fermentation of silkworm pupae. Effect of different levels of molasses and propionic acid.

Each value is the mean of 8 experiments.
Treatments A1, B1, C1, A2, B2 & C2: See text.

Figure 1. Baisse du pH pendant la fermentation des chrysalides de vers à soie. Effet de différents niveaux de mélasse et d'acide propionique.

Chaque valeur est la moyenne de 8 expériences. Traitements A1, B1, C1, A2, B2 & C2: voir texte.

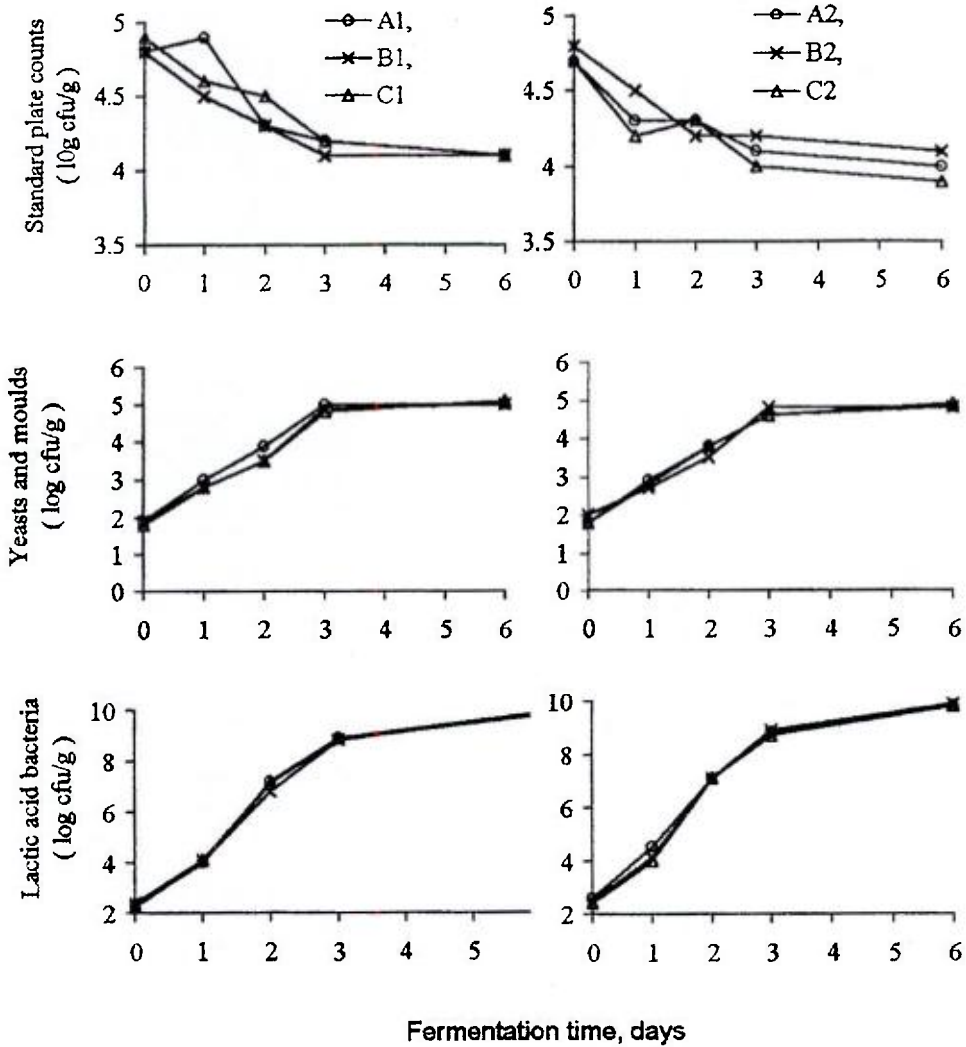


Figure 2. Microbiological profile during fermentation of silkworm pupae (traditional cross breed): effect of different levels of molasses and propionic acid.

Each value is a mean of 8 experiments. Treatments A1, B1, C1, A2, B2 & C2: see text.

Figure 2. Profil microbiologique pendant la fermentation des chrysalides de vers à soie (croisement traditionnel) : effet de différents niveaux de mélasse et d'acide propionique.

Chaque valeur est la moyenne de 8 expériences. Traitements A1, B1, C1, A2, B2 & C2 : voir texte.

The fall in pH during fermentation of fish and fish waste with fermenting sugars has been well documented and reviewed by Raa & Gildberg (1982) and Levin (1994). Russel *et al.*, (1992) and Urlings *et al.*, (1993) also reported similar results during fermentation of broiler processing waste. The fall in pH during fermentation of fish viscera (Ahmed & Mahendrakar, 1995) and poultry intestine (Shaw *et al.*, 1998) with molasses was also observed earlier in this laboratory. Optimum level of molasses was found to be 10% (w/w) for effecting good fermentation in these offals.

Microbiological profiles:

The fermentation time had a very significant ($P \leq 0.001$) influence on changes in SPC, Y & M and LAB counts; treatment had marginal ($P \leq 0.05$) effect on SPC, Y & M and LAB counts. The interaction between treatment and fermentation time was also not significant ($P \geq 0.05$) in all the cases.

Soon after mixing (0 day) the SPC, Y & M and LAB numbers (log cfu / g) in the mixtures were in the range of 4.7–4.9, 1.8–2.0 and 2.2–2.6 respectively under all the treatment conditions. On the 3rd day of fermentation, the corresponding values were 4.0–4.2, 4.6–5.0 and 8.7–8.9, thus indicating a decrease in SPC (~1 log cfu / g) and an increase in Y & M (~3 log cfu / g) and in LAB (~7 log cfu / g) numbers (Fig. 2). The counts then remained almost the same on the 6th day of fermentation. Further it may be noted that Y & M counts were slightly lower in samples containing 0.5% compared to 0.25% (v/w) propionic acid. The low counts of spores (0–1.5 log cfu / g), coliforms (0.8–1.6 log cfu / g) and *E. coli* (0–1.5 log cfu / g) were observed in samples soon after mixing (0–day). They were absent in all the samples after 1 day up to 6 days of fermentation period studied. As regards effect of different levels of molasses on microbial profile, the SPC and Y & M counts were slightly lower in 10.0 and 12.5% (w/w) molasses compared to 7.5% (w/w) molasse levels. Fermentation mixtures (of any treatment group) initially had 0–2.3 and 0–2.5 log cfu / g of staphylococci and enterococci respectively. Both these micro-organisms could not be detected in samples after 2 days of fermentation. Mixture of SWP with 7.5% (w/w) molasses produced foul smell after 3–4 days of fermentation. These observations clearly indicate that 7.5% (w/w) molasses was inadequate to effect good lactic fermentation. Treatment with 12.5% (w/w) molasses had no additional advantage with respect to both fall in pH (Fig. 1) as well as microbial profile compared to 10% (w/w) molasses level.

Similar observations with 5% (w/w) molasses were made earlier during fermentation ensiling of fish viscera (Ahmed & Mahendrakar, 1995) and poultry intestine and that the microbiologically safe pH of 4.2 was not attained in poultry intestine (Shaw *et al.*, 1998). A reduction in pathogen and spoilage organisms and an increase in LAB numbers also occurred during the fermentation of fish (Raa & Gildberg 1982; Zuberi *et al.*, 1993), fish waste (Lindgren & Pleje, 1983; Ahmed *et al.*, 1996), poultry offal (Shaw *et al.*, 1998) and waste from pigs (Weiner, 1982). This has been attributed to both low pH and possibly to antibiotic substances produced by LAB (Olley *et al.*, 1968; Raa & Gildberg, 1982). Further, occurrence of yeast or fungi is reported in fish silage prepared by lactic bacterial fermentation (Durairaj *et al.*, 1976). Substantial increase in Y & M counts (from 2 to 5 log cfu / g) during fermentation of SWP up to 6 days in the present investigation (Fig. 2) is not desirable, suggesting the need for the use of more effective antimycotic agents such as sorbic or benzoic acids. Since the objective is to produce a silage product from SWP with as low Y & M counts as possible, the propionic acid at 0.5% (v/w) level was included as an antimycotic agent in Experiment II.

Experiment II : Different antimycotic agents :

pH: The fermentation time influenced ($P \leq 0.001$) changes in pH during fermentation as also the interaction between the treatment and fermentation time despite significant ($P \leq 0.001$) differences between the replicates. The untreated SWP paste had pH of 6.5 ± 0.08 . Fall in pH was noticed in all

the treatments, faster initially up to 48–72 h as expected. However, no marked ($P \geq 0.05$) influence of different antimycotic agents (Treatments A, B & C) and their combinations (Treatments D & E) was noticed (Fig. 3). Microbiologically safe pH of 4.2 was reached in 48–72 h of fermentation.

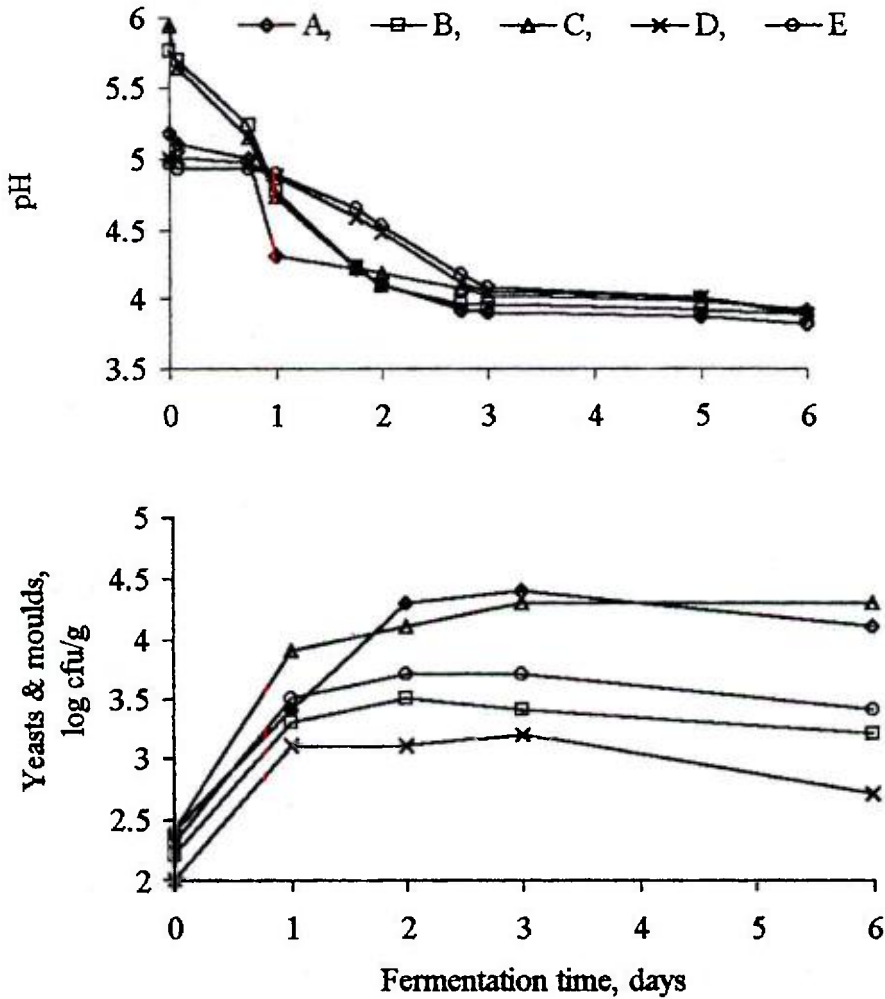


Figure 3. Changes in pH and yeast and mould counts in silkworm pupae during fermentation: effect of different antimycotic agents.

Each value is a mean of 6 experiments. Treatments A, B, C, D & E: See text.

Figure 3. Changements de pH et des comptes en levure et moisissure chez les chrysalides de vers à soie pendant la fermentation : effet de différents agents antimycotiques.

Chaque valeur est la moyenne de 6 expériences. Traitements A, B, C, D et E: Voir texte.

Yeasts and moulds :

The treatment as well as fermentation time had significant ($P \leq 0.001$) effect on changes in Y & M counts, and the interaction between the two was also significant ($P \leq 0.001$). Marked ($P \leq 0.001$) differences in replicates were also noticed. The untreated SWP (initial) had low counts (log cfu / g) of Y & M, i.e. 2.1 ± 0.37 . An increase in Y & M numbers was noticed initially up to 1 day for treatment D and 2 days for all other treatments and the counts then remained almost the same up to 6 days of fermentation in all the treatments except D (Fig. 3). The combination of 0.5% (v/w) propionic acid and 0.3% (w/w) sorbic acid (treatment D) was the most effective in suppressing the growth of Y & M. Under this treatment, the low Y & M numbers (log cfu / g) of 3.1 ± 0.13 were observed in 1 day fermented samples which decreased further to 2.7 ± 0.21 on 6th day of fermentation. On the other hand benzoic acid alone at 0.3% (w/w) level (Treatment C), was not effective in controlling the growth of Y & M.

Lindgren & Pleje (1983) reported that 0.1% sorbic acid inhibited the growth of Y & M during the initial fermentation silaging of fish / fish waste. Effectiveness of propionic acid in suppressing the growth of Y & M was observed during acid silaging of fish and poultry offals (Mahendrakar *et al.*, 1991). Inclusion of calcium propionate (0.3%) or sorbic acid (0.1%) during fermentation of fish viscera (Ahmed *et al.*, 1996) and 0.1 – 0.3% each of sorbic, propionic and benzoic acids (benzoic acid being the least effective) during the fermentation of poultry intestine (Shaw *et al.*, 1998) also inhibited the growth of Y & M. Recently Turantas *et al.*, (1999) also observe inhibitory effect of sodium benzoate and potassium sorbate on Y & M during fermentation of black olives.

CONCLUSION

Microbiologically safe silage can be prepared by fermenting SWP with optimum level of 10% (w/w) molasses as a carbohydrate substrate, 0.5% (v/w) propionic and 0.3% (w/w) sorbic acids as antimycotic agents under microaerophilic condition at ambient temperature ($26 \pm 2^\circ \text{C}$).

ACKNOWLEDGEMENTS

The investigation work was supported by a grant from the Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Govt. Of India.

REFERENCES

- AHMED J. & MAHENDRAKAR N. S. (1995) Effect of different levels of molasses and salt on acid production and volume of fermenting mass during ensiling of tropical freshwater fish viscera. *J. Food Sci. Technol.* 32, 115-118.
- AHMED J., RAMESH B. S. & MAHENDRAKAR N. S. (1996) Changes in microbial population during fermentation of tropical freshwater fish viscera. *J. Applied Bacteriol.* 80, 153-156.
- ANON (1995) Final Report of Report Project entitled "Development of technology for utilisation of food processing wastes and low cost by-products as a source of protein in preparation of aquaculture feeds", Project Number GAP-0009, April 1991 – May 1995, Grant-in-aid by Dept of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Govt. Of India.
- ANON (1999) Final Report of Research Project entitled "Development of technology for the effective utilisation of silkworm pupae with special reference to aquaculture feeds", Project Nr. GAP-0084, April 1996 – September 1999, Grant-in-aid by Dept. of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Govt. Of India.
- CHICHESTER D. F. & TANNER F. W. (1972) Antimicrobial food additives. In: *CRC Handbook of food additives*. (Ed) Furia, T. E., CRC Press Inc., Ohio, pp 115-184.
- DURAIRAJ S., SANTHANARAJ T., SULTAN K. M. & DURAI RAJAH K.A.P.A. (1976) Utilisation of trash fish. Fish silage – some aspects of processing and storage. In: *Proc. Symp.*

- On Fish Processing Industries, Central Food Technological Research Institute, Mysore, India, pp 81.
- ISI (1958) Indian standard specification for cane molasses, IS: 1162, p 6.
- LEVIN R. E. (1994) Lactic acid and propionic acid fermentation of fish hydrolysates. In: Fisheries Processing: Biotechnological Applications, ed. Martin, A. E. pp 273-310., Chapman and Hall, London.
- LINDGREN S. & PLEJE M. (1983) Silage fermentation of fish and fish waste products with lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 34, 1057-1067.
- MAHENDRAKAR N. S., KHADE V. S., YASHODA K. P. & DANI N. P. (1991) Chemical and microbiological changes during autolysis of fish and poultry viscera. *Trop. Sci.* 31, 45-54.
- MAHENDRAKAR N. S., NARASIMHA RAO D., YASHODA K. P., & JAGANNATHA RAO R. (1998) A process for the preparation of fermented silkworm pupae silage useful as an ingredient in animal feeds. Indian Patent Number 2379 / DEL / 98, 13 August 1998.
- NILSSON R. & RYDIN C. (1963) Fermentation as a means of preserving organic materials. *Acta Chemica Scandinavia* 17, 174.
- OLLEY J., FORD J. E. & WILLIAM A. P. (1968) Nutritional value of fish visceral meals. *J. Sci. Food Agric.* 19, 282-285.
- RAA J. & GILDBERG A. (1982) Fish silage. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 16(4), 383-419.
- RUSSEL S. M., FLETCHER D. L. & MERKA M. E. (1992) Lactic acid fermentation of broiler processing waste: physical properties and chemical analysis. *Poult. Sci.* 71, 765-770.
- SHAW D. M., NARASIMHA RAO D. & MAHENDRAKAR N. S. (1998) Effect of different levels of molasses, salt and antimycotic agents on microbial profiles during fermentation of poultry intestine. *Bioresource Technol.* 63, 237-241.
- TURANTAS F., GOKSUNGUR Y., DINCER A. H., UNLURK A., GUVENC U & ZORLU N. (1999) Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1197-1202.
- URLINGS H. A. P., BIJKER P. G. J. & VAN LONGTESTIJN J. G. (1993) Fermentation of raw poultry by-products for animal nutrition. *J. Anim. Sci.* 71, 2420-2426.
- WEINER B. A. (1982) Silage fermentation of swine waste combined with corn. *European J. Applied Microbiol Biotechnol.* 16, 39-44.
- ZUBERI R., FATIMA R., SHAMSHAD S. J. & QADRI R. B. (1993) Preparation of fish silage by microbial fermentation. *Trop. Sci.* 33, 171-182.

VARIATIONS DE LA POPULATION MICROBIENNE AU COURS DE LA FERMENTATION DE CHRYSALIDES DE VER A SOIE

K. P. YASHODA, N. M. SACHINDRA, D. NARASIMHA RAO & N. S. MAHENDRAKAR*

Meat, Fish and Poultry Technology, Central Food Technological Research Institute,
Mysore- 570 013, Inde.

*Nous avons étudié la fermentation de nymphes de vers à soie ensilées (SWP) après les avoir mélangées avec différentes quantités de mélasse (0 ; 7,5 ou 12,5 % p/p) et de l'acide propionique (0 ; 0,25 ou 0,5 % v/p) dans des conditions micro-aérophiliques à une température ambiante ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) de manière à préserver les nutriments dans les SWP et à préparer un produit d'ensilage destiné à la nourriture d'animaux. De plus, on a aussi étudié les effets inhibiteurs des acides sorbique (0,3 % p/v) ou benzoïque (0,3 % p/p) soit seuls soit couplés avec de l'acide propionique (0,5 % v/p) sur la croissance des levures et des moisissures pendant la fermentation. Les résultats révèlent qu'en dessous de 10 % (p/p) la mélasse ne convient pas et qu'un taux de 12,5 % ne présente pas d'avantage supplémentaire sur la fermentation. Nous avons remarqué une baisse du compte de plaques standards et du nombre de spores, de coliformes, d'*Escherichia coli*, des staphylocoques et des entérocoques et une augmentation de la levure, des moisissures et des bactéries de l'acide lactique pendant la fermentation. Les spores, les coliformes et *E. coli* sont absents après 1 jour de fermentation. On observe que l'inclusion de 0,5 % (v/p) d'acide propionique et de 0,3 % (p/p) d'acide sorbique s'avère des plus efficaces pour supprimer la croissance de la levure et des moisissures. L'acide benzoïque (0,3 % p/p) n'est pas efficace comme agent antimycotique. L'étude indique qu'un ensilage microbiologiquement sûr peut être préparé en homogénéisant les SWP avec 10 % (p/p) de mélasses, 0,5 % d'acide propionique (v/p) et 0,3 % d'acide sorbique (p/p) et en les fermentant dans des conditions microaérophiliques à une température ambiante ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) pendant 3 jours.*

INTRODUCTION

La sériciculture est une industrie agricole à croissance rapide et la production de soie est une industrie bien établie en Inde. L'Inde produit annuellement 40 000 tonnes (sur base sèche) de nymphes de vers à soie (SWP) à partir d'unités de filature (Anon, 1999). La majorité des unités de dévidage se trouve dans le secteur privé des petites entreprises et une petite quantité de nymphes mortes est séchée au soleil pour être utilisée comme nourriture pour la volaille. Le séchage au soleil n'est pas écologique et n'est pas rentable économiquement. Par conséquent, une quantité considérable de larves mortes est rejetée comme déchets, ce qui cause une pollution environnementale et constitue une perte de nutriments. L'ensilage à partir de SWP fermentées pourrait être un procédé économique pour préparer un produit pouvant être utilisé comme ingrédient pour la nourriture animale comme alternative aux nourritures à base de poisson conventionnellement utilisées, qui sont chères et sont limitées en quantité en fonction de la disponibilité en matière première.

Les SWP ont des niveaux très faibles en hydrates de carbone. Par conséquent, il faut ajouter des sucres fermentables pour réaliser la fermentation. Le malt (Nilsson & Rydin, 1963), le sirop de maïs

* Auteur auquel adresser la correspondance. Fax : 91-0821-517233. Email : nsmahendra@yahoo.com

(Levin, 1994) ou les mélasses (Durairaj et coll., 1976 ; Urlings et coll., 1993 ; Zuberi et coll., 1993 et Levin, 1994) sont utilisées comme une source de sucres de fermentation pour conserver avec succès les déchets de poisson et de volaille. Nous avons obtenu dans ce laboratoire une fermentation réussie pour l'ensilage à base de viscères de poisson et d'intestins de volaille avec des quantités optimisées en mélasses pour obtenir un ensilage exempt de pathogènes (Anon, 1995 ; Ahmed et coll., 1996 ; Shaw et coll., 1998). Il n'existe pas d'études sur la fermentation des SWP dans la littérature. Pour mettre au point une technique de fermentation appropriée pour l'ensilage, le travail a été conçu de manière à déterminer le niveau optimum en mélasses comme source d'hydrates de carbone. Les acides propionique, sorbique et / ou benzoïque sont testés pour leur efficacité comme agents antimycotiques pendant la fermentation. Un brevet a été déposé pour le processus d'ensilage des SWP d'hybrides améliorés (PM × NB4D2) (Mahendrakar et coll., 1998).

Nous rapportons ici les changements microbiologiques pendant la fermentation des SWP chez l'hybride poly × bi traditionnel (PM × C. nichii).

MATERIELS ET METHODES

On se procure des SWP fraîches de la variété hybride traditionnelle (PM × C. nichii), après le dévidage, sous forme de lots de 8 à 10 kg chacun (humidité $74,9 \pm 0,65$ %), que l'on amène au laboratoire dans l'heure qui suit et que l'on homogénéise dans un mortier jusqu'à ce qu'elles forment une consistance pâteuse. Le produit homogénéisé est divisé en lots de 1 kg et traité comme suit.

Expérience I : Différents niveaux de mélasses (Catégorie 2* d'après l'ISI, 1958) et d'acide propionique (Réactif de laboratoire catégorie**)

Traitement	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Mélasses en % par rapport aux SWP (p/p)	7,5	7,5	10	10	12,5	12,5
Acide propionique en % par rapport aux SWP (v/p)	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5

Expérience II : Différents agents antimycotiques (catégorie LR)

Traitement	A	B	C	D	E
Mélasses en % de SWP (p/p)	10	10	10	10	10
Acide propionique en % de SWP (v/p)	0,5	-	-	0,5	0,5
Acide sorbique en % de SWP (p/p)	-	0,3	-	0,3	-
Acide benzoïque en % de SWP (p/p)	-	-	0,3	-	0,3

* Densité (degrés brix) à 27,5° C = minimum 80 ; Cendres sulfatées = maximum 17,5 % ; Sucres réducteurs totaux = minimum 44 %.

** Dosage minimum (GLC) 99 % ; Densité (à 20° C) = 0,991 à 0,994 ; Indice de réfraction = 1,386 à 1,388 ; Point d'ébullition = 138 à 142° C.

Les acides sorbique et / ou benzoïque sont utilisés à un niveau de 0,3 % (p/p) car ceci constitue la limite supérieure pour l'utilisation comme agent antimycotique (Chichester & Tanner, 1972).

Le mélange en lots de 1 kg est transféré dans des bouteilles en plastique, le mélange en fermentation est étalé avec un film de polyéthylène et la bouteille est refermée avec un couvercle. Les échantillons dans de telles conditions microaérophiliques sont maintenus à température ambiante ($26 \pm 2^\circ \text{C}$). Les changements de pH et en population microbienne des SWP pendant la fermentation sont contrôlés périodiquement d'après les procédures décrites plus haut (Ahmed et coll., 1996).

Analyse statistique :

Les expériences qui ont une conception factorielle, avec le traitement des SWP comme l'un des facteurs et la durée de fermentation comme l'autre facteur sont répétées 8 fois (Expérience I) et 6 fois (Expérience II). Les résultats sont analysés statistiquement avec la Technique d'Analyse de Variance à deux facteurs contrôlés en utilisant un Logiciel Informatique SPSS pour Windows, version 6.0 (SPSS Inc., 1993).

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans l'usine de dévidage dont proviennent les SWP utilisées dans cette expérience, les cocons frais sont directement placés dans de l'eau bouillante pendant 30 à 60 minutes pour faciliter le dévidage. Malgré un tel traitement radical, les SWP ont des comptes en bactéries comme le montre le Tableau I, qui sont sûrement dus à une contamination après le dévidage. Les comptes standards en plaques (SPC), les levures et moisissures (Y & M), les coliformes et les bactéries d'acide lactique (LAB) sont présents dans tous les lots des SWP tandis que les spores sont présentes dans 5 lots et *E. coli* seulement dans 3 lots.

Expérience 1 : Différents niveaux de mélasses et d'acide propionique :

pH : le pH des SWP non traitées s'élève à $6,2 \pm 0,35$ qui baisse à $5,9 \pm 0,28$; $5,8 \pm 0,23$ et $5,8 \pm 0,25$ quand on les mélange respectivement avec 7,5 ; 10 et 12,5 % (p/p) de mélasses. La durée de fermentation influence la baisse du pH pendant la fermentation de manière significative ($P \leq 0,001$) malgré des variations significatives ($P \leq 0,001$) d'un lot à l'autre (répétitions). L'interaction entre le traitement et la durée de fermentation est aussi très significative ($P \leq 0,001$). La baisse du pH est cependant plus rapide dans les 48 premières heures pour tous les traitements (Fig. 1). On peut noter qu'on atteint le pH sûr microbiologiquement de 4,2 (Raa & Gildberg, 1982) en 42 heures dans toutes les conditions de traitement. Cependant, les pH des échantillons contenant 7,5 % (p/p) de mélasses sont légèrement plus élevés comparés à ceux contenant 10 ou 12,5 % (p/p) de mélasses.

Il existe une documentation importante sur la baisse de pH pendant la fermentation du poisson et de déchets de poisson avec des sucres de fermentation indiquée dans les revues réalisées par Raa & Gildberg (1982) et Levin (1994). Russel et coll., (1992) et Urlings et coll., (1993) ont aussi rapporté des résultats similaires pendant la fermentation de déchets provenant du traitement du poulet. Nous avons aussi observé auparavant dans ce laboratoire une baisse de pH pendant la fermentation de viscères de poisson (Ahmed & Mahendrakar, 1995) et d'intestins de poulet (Shaw et coll., 1998) avec des mélasses. Nous avons trouvé que le niveau optimal en mélasses pour réaliser une bonne fermentation des abats est de 10 % (p / p).

Profils microbiologiques :

La durée de la fermentation a une influence très significative ($P \leq 0,001$) sur les changements des comptes en SPC, en Y & M et en LAB ; le traitement a un effet marginal ($P \leq 0,05$) sur les comptes en SPC, Y & M et LAB. L'interaction entre le traitement et la durée de fermentation n'est pas significative ($P \geq 0,05$) dans tous les cas.

Peu après le mélange (jour 0) les nombres en SPC, Y & M et en LAB (log cfu / g) dans les mélanges sont compris entre respectivement 4,7 - 4,9 ; 1,8 - 2 et 2,2 - 2,6 dans toutes les conditions de traitement. Le 3^{ème} jour de fermentation, les valeurs correspondantes sont de 4,0 - 4,2 ; 4,6 - 5 et 8,7 - 8,9, ce qui indique donc une baisse en SPC (~ 1 log cfu / g) et une augmentation des nombres en Y & M (~ 3 log cfu / g) et en LAB (~ 7 log cfu / g) (Fig. 2). Les comptes restent ensuite presque identiques le 6^{ème} jour de la fermentation. De plus, on peut noter que les comptes en Y & M sont légèrement plus faibles dans les échantillons contenant 0,5 % d'acide propionique que dans ceux en contenant 0,25 % (v/p). On observe des comptes faibles en spores (0 - 1,5 log cfu / g), en coliformes (0,8 - 1,6 log cfu / g) et en *E. coli* (0 - 1,5 log cfu / g) dans les échantillons peu après le mélange (jour 0). Ils sont absents dans tous les échantillons du 1^{er} au 6^{ème} jour pendant la période de fermentation étudiée. En ce qui concerne l'effet des différents niveaux de mélasses sur le profil microbien, on observe que les comptes en SPC et en Y & M sont légèrement plus faibles pour les niveaux de mélasses de 10 et 12,5 % (p/p) par comparaison au niveau de 7,5 % (p/p). Les mélanges de fermentation (avec n'importe quel traitement) avaient au départ respectivement 0 - 2,3 et 0 - 2,5 log cfu / g de staphylocoques et d'entérocoques. Ces deux types de micro-organismes ne peuvent pas être détectés dans les échantillons après 2 jours de fermentation. Le mélange de SWP avec 7,5 % de mélasses (p/p) produit une odeur désagréable après 3 à 4 jours de fermentation. Ces observations indiquent clairement qu'un niveau en mélasses de 7,5 % (p/p) ne convient pas pour produire une bonne fermentation lactique. Le traitement avec un niveau de mélasses de 12,5 % (p/p) ne présente pas d'avantage supplémentaire à la fois pour la baisse du pH (Fig. 1) et pour le profil microbien comparé au niveau de mélasse de 10 % (p/p).

Des observations similaires avec des mélasses à 5 % (p/p) ont été faites précédemment pendant la fermentation d'ensilage à base de viscères de poissons (Ahmed & Mahendrakar, 1995) et d'intestins de volaille et le niveau de pH microbiologiquement sûr de 4,2 n'a pas été atteint pour les intestins de volaille (Shaw et coll., 1998). Il s'est produit une baisse en pathogènes et en organismes et une augmentation du nombre de LAB pendant la fermentation de poisson (Raa & Gildberg, 1982 ; Zuberi et coll., 1993), de déchets de poisson (Lindgren & Pleje, 1983 ; Ahmed et coll., 1996), d'abats de volaille (Shaw et coll., 1998) et de déchets de cochons (Weiner, 1982). Cela a été attribué à la fois au pH faible et sûrement aux substances antibiotiques produites par les LAB (Olley et coll., 1968 ; Raa & Gildberg, 1982). De plus, on a signalé la présence de levure ou de champignons dans les déchets de poisson préparés par fermentation bactérienne lactique (Durairaj et coll., 1976). Une augmentation importante des comptes en Y & M (de 2 à 5 log cfu / g) pendant la fermentation des SWP pendant 6 jours n'est pas désirable (Fig. 2), ce qui suggère qu'il faut utiliser des agents mycotiques plus efficaces tels que les acides sorbique ou benzoïque. Puisque l'objectif est de produire un produit de déchet à partir de SWP avec aussi peu de comptes en Y & M que possible on inclue un niveau d'acide propionique à 0,5 % (v/p) comme agent antimycotique dans l'Expérience II.

Expérience II : Différents agents antimycotiques :

pH : La durée de fermentation influence ($P \leq 0,001$) les changements de pH pendant la fermentation et l'interaction entre le traitement et la durée de fermentation bien qu'il existe des différences significatives ($P \leq 0,001$) entre les répétitions. La pâte de SWP non traitée avait un pH de $6,5 \pm 0,08$. On remarque une baisse du pH dans tous les traitements, plus rapide au début dans les 48 et 72 premières heures comme on pouvait s'y attendre. Cependant, on ne remarque pas d'influence marquée ($P \geq 0,05$) entre les différents agents antimycotiques (Traitements A, B & C) et leurs combinaisons (Traitements D & E) (Fig. 3). On atteint un pH sûr de 4,2 après 48 h à 72 h de fermentation.

Levures et moisissures :

Le traitement et la durée de fermentation a un effet significatif ($P \leq 0,001$) sur les changements des comptes en Y & M et l'interaction entre les deux est aussi significative ($P \leq 0,001$). On remarque des différences marquées ($P \leq 0,001$) chez les répétitions. Les SWP non traitées (début) avaient des comptes faibles (log cfu / g) en Y & M, soit $2,1 \pm 0,37$. On remarque une augmentation du nombre des Y & M au début pendant 1 jour pour le traitement D et pendant 2 jours pour les autres traitements, puis les comptes restent presque les memes jusqu'à 6 jours de fermentation dans tous les traitements sauf pour D (Fig. 3). La combinaison de 0,5 % d'acide propionique et de 0,3 % (p/p) d'acide sorbique (traitement D) est la plus efficace pour supprimer la croissance des Y & M. Avec ce traitement, on observe de faibles nombres en Y & M (log cfu / g) de $3,1 \pm 0,13$ chez les échantillons fermentés depuis 1 jour, qui baissent encore plus $2,7 \pm 0,21$, le 6^{ème} jour de la fermentation. D'autre part, l'acide benzoïque seul à 0,3 % (p/p) (Traitement C) n'est pas efficace pour contrôler la croissance des Y & M.

Lindgren & Plefer (1983) ont signalé que l'acide sorbique à 0,1 % inhibe la croissance des Y & M pendant la fermentation initiale des ensilages / déchets de poissons. On a observé l'efficacité de l'acide propionique pour supprimer la croissance des Y & M dans l'ensilage d'abats de poisson et de volaille à base d'acide (Mahendrakar et coll., 1991). L'addition de propionate de calcium (0,3 %) ou d'acide sorbique (0,1 %) pendant la fermentation de viscères de poisson (Ahmed et coll., 1996) et de 0,1 à 0,3 % d'acides sorbique, propionique et benzoïque (l'acide benzoïque étant la moins efficace) pendant la fermentation d'intestins de volaille (Shaw et coll., 1998) inhibe aussi la croissance des Y & M. Récemment Turantas et coll., (1999) ont aussi observé l'effet inhibiteur du benzoate de sodium et du sorbate de potassium sur les Y & M pendant la fermentation des olives noires.

CONCLUSION

Un ensilage microbiologiquement sûr peut être préparé en fermentant les SWP avec un niveau optimum de 10 % de mélasses (p/p) comme substrat d'hydrate de carbone, d'acide propionique 0,5 % (v/p) et d'acide sorbique 0,3 % (p/p) comme agents antimycotiques dans des conditions microaérophiliques à température ambiante ($26 \pm 2^\circ \text{C}$).

THIDIAZURON-INDUCED ORGANOGENESIS FROM MATURE LEAF CULTURES IN MULBERRY (*MORUS INDICA* L.) CV S54

R. CHAKRAVARTHY, U. PAVAN, M. RAMESH, K. SRINIVASA REDDY &
A. SADANANDAM*

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

In vitro regeneration of mulberry (*Morus indica* L.) cv S54 has been achieved via direct organogenesis from mature leaf cultures. Explants when inoculated on medium supplemented with 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) did not show any morphogenic response. Thidiazuron (TDZ), a substituted phenyl urea with cytokinin activity, was significantly more effective in inducing nodule like structures from leaf cultures, which did not develop further. Regeneration was obtained from all the combinations of TDZ with indole acetic acid (IAA). However, the optimal TDZ and IAA concentration for organogenesis from leaf cultures was 4.54 μ M and 1.71 μ M, respectively. Regenerated shoots were rooted on Murashige and Skoog's (MS) medium containing 4.9 μ M indole butyric acid (IBA) followed by transfer to the greenhouse.

Keywords : *Morus indica* L., cv S54, mature leaf, shoot regeneration, thidiazuron.

INTRODUCTION

Genetic engineering techniques in mulberry, a woody feed crop for the silkworm, promises to have a significant impact on its improvement. The major breakthrough in this technology is the development of explant based regeneration system. Presently, three stable regeneration systems in mulberry plants have been established i.e., adventitious bud induction system (Oka and Ohyama, 1981 ; Saito and Katagiri, 1989), multiple-bud body (MBB) culture system (Hayashi and Oka, 1995) and leaf based regeneration system (Kong *et al.*, 1990, 1995 ; Saito, 1993 ; Wang and Chen, 1995 ; Lou *et al.*, 1996 ; Sugimura *et al.*, 1998, 1999 ; Vijayan *et al.*, 2000). Although, there have been many reports on *in vitro* leaf regeneration in mulberry, the test materials used were mostly excised from young leaves within buds (Kong *et al.*, 1990, 1995 ; Machii, 1992 ; Saito, 1993) or cotyledons (Wang and Chen, 1995 ; Lou *et al.*, 1996 ; Sugimura *et al.*, 1998, 1999) which brought about delicate manipulation and gave low differentiation rate (Lou *et al.*, 1996). Hence, the present study deals with efficient plant regeneration from mature leaf cultures of one month old mulberry (*Morus indica* L.) cv S54, shoots produced *in vitro* using nodal segments.

Cytokinins in general favour shoot organogenesis in cultured tissues (Thorpe, 1983). Thidiazuron (TDZ) - a substituted phenyl urea with high cytokinin activity (Mok *et al.*, 1982) has been shown to induce adventitious shoot regeneration from leaves of several woody species (Chevreau *et al.*, 1989; Eapen *et al.*, 1998). This high cytokinin activity and positive response of woody species to TDZ have established it as among the most active cytokinins for *in vitro* manipulation of many woody species (Huetteman and Preece, 1993). Thinh and Katagiri (1994) reported TDZ to be effective for inducing

* Corresponding author

adventitious bud formation on leaf explants of mulberry. However, the effectiveness of TDZ for shoot regeneration from the leaves of mulberry has not been established so far. The experiments reported here were designed to improve the organogenesis from excised mulberry leaves and to establish a protocol for regeneration from mature leaves by testing the effects of various concentrations of TDZ.

MATERIALS AND METHODS

Young fully expanded leaves of 3-4 cm in length and 2-2.5 cm in width were excised from all the parts of the shoot grown for a month on MS (Murashige and Skoog, 1962) proliferation medium containing 4.4 μ M benzyladenine (BA). Single leaf was transversely cut across the midrib into 1-3 segments before being placed abaxial side down on the medium. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA, 2, 6 and 10 μ M), TDZ (0.22, 0.45, 2.27, 4.54 μ M) and TDZ (4.54 μ M) + indole acetic acid (IAA, 0.57, 1.71 and 2.85 μ M). The medium pH was adjusted to 5.7 and was solidified with 0.8 % Difco Bacto agar. Growth regulators were added to the medium before autoclaving at 121°C for 15 min. All cultures were incubated at 25 $\pm$ 2°C under white fluorescent light under a 16 h. photoperiod. A minimum of 20 explants were maintained in two blocks and each experiment was repeated once. Observations were recorded under a stereomicroscope. Regenerated shoots were excised and further placed on MS basal medium. Elongated shoots were rooted on MS medium plus 4.9 μ M IBA. Results were analysed statistically using Student's *t* test.

Rooting and hardening :

Shoots of 2.0 - 3.5 cm having 2-5 leaves obtained after 5 weeks were weaned and washed repeatedly in tap water to remove the agar and medium constituents and then transferred into plastic pots filled with sand and top soil (1:1) mixture. The potted plantlets were watered and hardened in a mist house at 30 $\pm$ 2°C and 80-90 % RH.

RESULTS AND DISCUSSION

The study described here was undertaken to examine the response of mature leaf cultures under *in vitro* conditions with the possibility of developing an efficient protocol for multiplication of *M. indica*. Among TIBA, TDZ and TDZ + IAA, only the TDZ + IAA combination stimulated regeneration response in the leaf cultures of mulberry cv S54. The leaf explants inoculated on medium containing TIBA (2, 6 and 10 μ M) initially became expanded (Sugimura *et al.*, 1999) and later turned black and did not show any further response.

In general, TDZ either alone or in combination with IAA produced nodule like structures. The first visible effect of TDZ treatment was leaf expansion. Nodule emergence was observed within 20 days of inoculation, which did not differentiate further. These nodule like structures were initially seen as dark green spots. In some explants, only cut ends of midrib, while in others lateral veins produced dark green nodule like spots which do not differentiate further into shoot buds. TDZ concentration in the medium influenced the frequency of nodule like structures. When leaves were on various concentrations of TDZ (0.22, 0.45, 2.27, 4.54 μ M), the maximum number of nodule like structures were obtained in the medium containing 4.54 μ M TDZ. In the absence of TDZ, the explants failed to produce this kind of response.

The concentration of IAA was observed to have marked influence on the differentiation of nodule like structures into shoot buds and subsequently into shoots. Depending upon the presence or absence of IAA in the medium containing TDZ, further development of nodular structures was noticed. To produce abundant shoots from leaf explants of cv S54, preliminary studies were carried out on basal medium that contained different concentrations of IAA (0.57, 1.71 and 2.85 μ M) in combination with a single concentration of TDZ (4.54 μ M). Regeneration was obtained from all the combinations of

IAA with TDZ. However, comparatively 1.71 μM IAA and 4.54 μM TDZ was found to be more responsive and significant ($p < 0.05$) than the remaining combinations (Table I).

The nodule like structures were able to produce up to 5.2 ± 0.1 and 7.9 ± 0.9 shoot buds on 0.57 and 2.85 μM IAA respectively along with 4.54 μM TDZ, nevertheless a low frequency of these structures developed into complete shoots. The development of shoot buds into shoots was not significant with 1 to 3 shoots/explant. However, these nodule like structures differentiated into large number of shoot buds (18.5 ± 0.2) and most of them developed into shoots (9.1 ± 0.7) within 35 days of culture on medium with 4.54 μM TDZ and 1.71 μM IAA. Further development of shoots was achieved on MS basal medium and the elongated shoots were rooted on MS medium with 4.9 μM IBA, as this formulation produced the best root initiation in earlier experiments (Kathiravan *et al.*, 1995).

Table I. Effect of different growth regulators on shoot regeneration from leaf explants of mulberry.

Tableau I. Effet de différents régulateurs de croissance sur la régénération des pousses à partir d'explants de feuilles de mûrier.

Growth regulators (μM)	Cultures responding (%)	Type of response	No. of shoot buds/explant ($\pm$ S.E.)	No. of shoots/explant ($\pm$ S.E.)
Régulateurs de croissance (μM)	Cultures répondant (%)	Type de réponse	Nbre de bourgeons / explant ($\pm$ écart type)	Nbre de pousses / explant ($\pm$ écart type)
TIBA				
2	68	LE	—	—
6	71	LE	—	—
10	94	LE	—	—
TDZ				
0.22	80	LE	—	—
0.45	39	NF	—	—
2.27	51	NF	—	—
4.54	62	NF	—	—
TDZ + IAA				
4.54 + 0.57	47	R	5.2 ± 0.1	1.0 ± 0.5
4.54 + 1.71	74	R	18.5 ± 0.2	$9.1 \pm 0.7^*$
4.54 + 2.85	51	R	7.9 ± 0.9	3.2 ± 0.1

LE - Leaf expansion / Expansion de la feuille ; NF - Nodule formation / Formation de nodules ; R - Regeneration / Régénération ; * Significant $P < 0.05$ / Significatif au seuil de $P < 0,05$.

Ninety percent of the regenerated shoots from leaf explants were successfully rooted and were weaned away from the flasks and transferred to pots for hardening (under mist house conditions at 80-90 % RH) with 70 % survival. After transplantation, these plants showed normal growth as evidenced from the emergence of new leaves and shoot elongation.

The results of these treatments revealed that in cv S54, TDZ stimulates nodule like development when used alone and its effect caused organogenesis when used with IAA. Moreover, TDZ alone is a very potent morphoregulator capable of inducing cotyledon-derived shoot organogenesis, as found in apple, pear, walnut, apricot, sweet cherry (Korban and Skirvin, 1985 ; Kouider *et al.*, 1984 ; Lane and Cossio, 1986 ; Hiratsuka and Katagiri, 1988 ; Preece *et al.*, 1988) and leaf regeneration from pigeonpea (Eapen *et al.*, 1998). However, in the present study synergistic action of TDZ and IAA resulted in successful leaf regeneration. Hence, a proper combination and balance of growth regulators (auxin and cytokinin) may evoke regeneration response from leaf cultures of mulberry. In fact, the use of TDZ in combination with IAA might have resulted in the hormonal balance which elicited a positive response towards development of shoot buds into complete shoots.

These data on leaf regeneration show that TDZ and IAA, when used at low concentrations, have a positive effect on *in vitro* leaf regeneration. In mulberry cv S54, IAA behaved like a critical regulator to further promote *in vitro* shoot bud development. Such a study also makes clear the interactions between growth regulators and determine whether or not TDZ and IAA have an additive relationship. The leaf based regeneration protocol is expected to be very useful for the genetic improvement of mulberry through recombinant technology. The leaf is the favoured explant for the transformation studies since the nutrients rapidly penetrate these organs and thus the antibiotic selection and the effective suppression of the non-transformed cells are facilitated. Hence, developing of efficient shoot organogenesis and plant regeneration protocols from mature explants of mulberry is a major breakthrough in this technology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Department of Biotechnology, Ministry of Science and Technology, Government of India, New Delhi for their financial assistance (BT/PRO 300/OSC/10/003/96).

REFERENCES

- CHEVREAU E., SKIRVIN R. M., ABU-QAoud H. A., KORBAN S.S., SULLIVAN J. G. (1989) Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro*. Plant Cell Rep., 7, 688-691.
- EAPEN S., TIVAREKAR S., GEORGE L. (1998) Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 53, 217-220.
- HAYASHI K., OKA S. (1995) Formation of multiple bud bodies and plant regeneration in the mulberry, *Morus alba* L. J. Seric. Sci. Jpn., 64, 117-123.
- HIRATSUKA S., KATAGIRI M. (1988) Shoot and callus formation in explants from immature seeds of Japanese Pear. Sci. Hortic., 34, 193-199.
- HUETTEMAN C.A., PREECE J.E. (1993) Thidiazuron - A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33, 105-119.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHI A. (1995) Evaluation of *in vitro* response of mulberry genotypes. Sericologia, 35, 305-317.
- KONG L.W., TAN Z.D., BIAN Y. S. (1995) Studies on the main factors influencing differentiation of adventitious buds from mulberry leaves. Sci. Seric., China, 21, 67-71.
- KONG L. W., SHENG S.X., BIAN Y.S. (1990) Leaf culture and plant regeneration of different mulberry varieties. Sci. Seric., China, 16, 198-202.
- KORBAN S.S., SKIRVIN R.M. (1985) *In vitro* shoot regeneration from an intact and sectioned embryo axis of apple seeds. Plant Sci., 39, 61-66.

- KOUIDER M., KORBAN S.S., SKIRVIN R.M., CHU M.C. (1984) Influence of embryogenic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *in vitro*. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 109, 381-385.
- LANE W.D., COSSIO F. (1986) Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. Can. J. Plant Sci., 66, 953-959.
- LOU C.F., TAN J.Z., ZHOU J.M., HU M.J. (1996) Differentiation of adventitious buds and plant regeneration by *in vitro* leaf culture in mulberry. Sericologia, 36, 655-660.
- MACHII H. (1992) Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry, *Morus alba* L. J. Seric. Sci. Jpn., 61, 512-519.
- MOK M.C., MOK D.W. S., ARMSTRONG D.J., SHADO K., ISOGAI Y., OKAMOTO T. (1982) Cytokinin activity of N-phenyl N-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (thidiazuron). Phytochem., 21, 1509-1511.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15, 473-497.
- OKA S., OHYAMA K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Can. J. Bot., 59, 68-74.
- PREECE J.C., HUETTEMAN C.A., PUELLOC.H., NEUMAN M.C (1988) Influence of thidiazuron on *in vitro* culture of woody plants. Hortic. Sci., 22, 1071 (Abstract).
- SAITO H. (1993) Relationship between leaf age and adventitious bud formation in immature leaf of mulberry. J. Seric. Sci. Jpn., 62, 435-436.
- SAITO H., KATAGIRI K. (1989) Adventitious bud induction in leaves isolated from winter buds of mulberry. J. Seric. Sci. Jpn., 58, 197-202.
- SUGIMURA Y., ADACHI T., KOTANIE., FURUSAWA T. (1998) Shoot bud formation and plantlet regeneration from the basal tissues of mulberry leaves. J. Seric. Sci., Jpn., 65, 421-425.
- SUGIMURA Y., ADACHI T., KOTANI E., FURUSAWA T. (1999) Efficient induction of shoot organogenesis from leaves of mulberry seedling using 2,3,5-triiodobenzoic acid. Plant Biotech., 16, 123-127.
- THINH N.T., KATAGIRI K (1994) Induction of adventitious buds in mulberry leaves by Thidiazuron. J. Seric. Sci. Jpn., 63, 514-516.
- THORPE T.A (1983) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis : Physiological and biochemical aspects. In : Morphogenesis in Plants, Roubelakis-Angelakis KA and Tran Thanh Van K (eds.), Plenum Press, New York, pp. 19-38.
- VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P., ROY B.N. (2000) Plant regeneration from leaf explants of mulberry : Influence of sugar, genotype and 6-benzyladenine. Indian J. Exp. Biol., 38,504-508.
- WANG Y., CHEN A.Y. (1995) Adventitious bud formation and plant regeneration from mulberry cotyledons. Sci. Seric., China, 21, 122-123.

ORGANOGENÈSE INDUITE PAR LE THIDIAZURON A PARTIR DE FEUILLES DE MURIER MATURES (*MORUS INDICA* L.) CHEZ LE CULTIVAR S54

R. CHAKRAVARTHY, U. PAVAN, M. RAMESH, K. SRINIVASA REDDY & A. SADANANDAM*

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

On a réussi la régénération in vitro du mûrier (Morus indica L.), cultivar S54 par organogénèse directe à partir de cultures de feuilles matures. Quand les explants sont inoculés sur un milieu additionné avec de l'acide 2,3,5- triiodobenzoïque (TIBA) ils ne présentent pas de réponse morphogénétique. Le thidiazuron (TDZ), une phényl urée substituée à une activité cytokinique est beaucoup plus efficace pour induire des structures ressemblant à des nodules à partir de cultures de feuilles, qui ne se développent pas au-delà. La régénération est obtenue à partir de toutes les combinaisons de TDZ avec de l'acide indol acétique (IAA). Cependant, la concentration TDZ et IAA optimale pour l'organogénèse à partir des cultures de feuilles est de respectivement 4,54 μ M et de 1,71 μ M. Les pousses régénérées ont été mises à raciner sur du milieu de Murashige et Skoog (MS) contenant 4,9 μ M d'acide indol butyrique (IBA) et transférées ensuite dans une serre.

INTRODUCTION

Les techniques de génie génétique chez le mûrier, une plante ligneuse nourriture du ver à soie, devraient avoir un impact significatif sur son amélioration. La découverte majeure dans cette technologie est la mise au point d'un système de régénération à partir d'explants. Jusqu'à présent, trois systèmes de régénération stables ont été établis chez les plants de mûrier : le système d'induction des bourgeons adventifs (Oka et Ohyama, 1981 ; Saito et Katagiri, 1989), le système de culture de bourgeons multiples (MBB), (Hayashi et Oka, 1995) et le système de régénération à partir de la feuille (Kong et coll., 1990, 1995 ; Saito, 1993 ; Wang et Chen, 1995 ; Lou et coll., 1996 ; Sugimura et coll., 1998, 1999 ; Vijayan et coll., 2000). Bien qu'il existe de nombreux rapports sur la régénération *in vitro* de la feuille de mûrier, les matériaux utilisés sont en grande partie excisés à partir de jeunes feuilles à l'intérieur des bourgeons (Kong et coll., 1990, 1995 ; Machii, 1992 ; Saito, 1993) ou de cotylédons (Wang et Chen, 1995 ; Lou et coll., 1996 ; Sugimura et coll., 1998, 1999) ce qui demande une manipulation délicate et donne un faible taux de différenciation (Lou et coll., 1996). Ainsi, dans cette étude nous abordons la régénération efficace de plants à partir de pousses produites *in vitro* en utilisant des cultures de feuille provenant de tiges de mûrier de un mois (*Morus indica* L.) du cv. S54 obtenues de segments nodaux.

Les cytokinines favorisent en général l'organogénèse des tissus en culture (Thorpe, 1983). Le thidiazuron (TDZ) — une phényl urée substituée ayant une activité cytokinique élevée (Mok et coll., 1982) produit une régénération des pousses adventives à partir des feuilles de plusieurs espèces ligneuses (Chevreau et coll., 1989 ; Eapen et coll., 1998). Cette activité cytokinique élevée et la réponse

* Auteur auquel adresser la correspondance.

positive des espèces ligneuses au TDZ l'ont établi comme l'une des cytokinines les plus actives pour la manipulation *in vitro* de nombreuses espèces ligneuses (Huetteman et Preece, 1993). Thinh et Katagiri (1994) ont signalé que le TDZ est efficace pour induire une formation de bourgeons adventifs sur les explants de feuilles de mûrier. Cependant, on n'a pas encore établi jusqu'à présent l'efficacité du TDZ pour la régénération des pousses à partir de feuilles de mûrier. Les expériences rapportées ici sont conçues pour améliorer l'organogénèse à partir des feuilles de mûrier excisées et pour établir un protocole de régénération à partir de feuilles de mûrier matures en testant les effets de concentrations variées de TDZ.

MATERIELS ET METHODES

De jeunes feuilles en pleine expansion de 3 à 4 cm de longueur et de 2 à 2,5 cm de largeur sont excisées à différents endroits de pousses cultivées pendant un mois sur un milieu de prolifération MS (Murashige et Skoog, 1962) contenant 4,4 μM de benzyladenine (BA). La feuille est coupée de manière transversale le long de la nervure médiane en 1 à 3 segments avant d'être placée du côté abaxial sur le milieu. Les explants sont cultivés sur un milieu MS additionné d'acide triiodobenzoïque à 2,3,5 (TIBA, 2, 6 et 10 μM), de TDZ (0,22 ; 0,45 ; 2,27 ; de 4,54 μM) et de TDZ (4,54 μM) + de l'acide indol acétique (IAA, 0,57 ; 1,71 et 2,85 μM). Le pH du milieu est ajusté à 5,7 et solidifié avec du Bacto agar Difco à 0,8 %. Les régulateurs de croissance sont ajoutés au milieu avant qu'il soit autoclavé à 121° C pendant 15 minutes. Toutes les cultures sont incubées à 25 $\pm$ 2° C sous une lumière fluorescente blanche avec une photopériode de 16 h. Un minimum de 20 explants est maintenu en deux lots et chaque expérience est répétée une fois. Les observations sont effectuées avec un stéréomicroscope. Les pousses régénérées sont excisées et à nouveau placées sur un milieu de base MS. Les pousses sont mises à raciner sur du milieu MS plus 4,9 μM d'IBA. Les résultats sont analysés de manière statistique en utilisant le test t de Student.

Racinement :

Les pousses de 2,0 à 3,5 cm ayant 2 à 5 feuilles obtenues après 5 semaines sont détachées et lavées de manière répétée sous l'eau du robinet pour enlever les constituants de l'agar et du milieu puis transférées dans des pots en plastique remplis d'un mélange de sable et de sol (1 : 1). Les plantules en pot sont arrosées et durcies dans une serre à 30° $\pm$ 2° C et 80 à 90 % d'HR avec brumisation.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude décrite ici a été entreprise pour examiner la réponse de cultures *in vitro* de feuilles matures dans le but de mettre au point un protocole efficace de multiplication de *M. indica*. Entre le TIBA, le TDZ et le TDZ + IAA, seule la combinaison de TDZ + IAA stimule la régénération chez les cultures de feuilles du mûrier du cv. S54. Les explants de feuilles inoculés sur le milieu contenant du TIBA (2,6 et 10 μM) se développent au début (Sugimura et coll., 1999), puis deviennent noirs et ne donnent pas de réponse supplémentaire.

En général, le TDZ soit seul soit en combinaison avec de l'IAA produit des structures ressemblant à des nodules. Les premiers effets visibles du traitement TDZ sont l'expansion de la feuille. On observe une émergence du nodule au bout de vingt jours d'inoculation, qui ne se différencie pas d'avantage. Ces structures nodulaires apparaissent au début comme des tâches vertes sombres. Chez certains explants, seules les extrémités coupées des nervures centrales ou des nervures latérales produisent des tâches ressemblant à des nodules vert foncé qui ne se différencient pas d'avantage en bourgeons. La concentration en TDZ dans le milieu influence la fréquence des structures nodulaires. Quand les feuilles reçoivent des concentrations variées de TDZ (0,22 ; 0,45 ; 2,27 ; 4,54 μM), le nombre maximum de structures ressemblant à des nodules est obtenu avec le milieu contenant 4,54 μM de TDZ. En l'absence de TDZ, les explants n'arrivent pas à produire ce type de réponse.

On observe que la concentration en IAA a une influence marquée sur la différenciation des structures ressemblant à des nodules en bourgeons et par la suite en tiges. En fonction de la présence ou de l'absence d'IAA dans le milieu contenant du TDZ, on remarque un développement supplémentaire des structures nodulaires. Pour produire des pousses abondantes à partir d'explants de la feuille du cv. S54, des études préliminaires ont été réalisées sur un milieu de base qui contient différentes concentrations d'IAA (0,57 ; 1,71 et 2,85 μM) en combinaison avec une concentration unique de TDZ (4,54 μM). La régénération est obtenue avec toutes les combinaisons. Cependant, l'IAA à 1,71 μM et le TDZ à 4,54 μM donnent comparativement une réponse plus importante et plus significative ($P < 0,05$) que les autres combinaisons (Tableau I).

Les structures ressemblant à des nodules sont capables de produire respectivement jusqu'à $5,2 \pm 0,1$ et $7,9 \pm 0,9$ bourgeons de pousses sur de l'IAA à 0,57 et 2,85 μM accompagné de TDZ à 4,54 μM ; cependant seule une faible partie de ces structures se transforme en tiges complètes. Le développement des bourgeons en pousses n'est pas significatif avec 1 à 3 pousses / explant. Cependant, ces structures ressemblant à des nodules se différencient en un grand nombre de bourgeons de pousses ($18,5 \pm 0,2$) et la plupart d'entre eux se transforment en tiges ($9,1 \pm 0,7$) en l'espace de 35 jours de culture sur un milieu avec 4,54 μM de TDZ et 1,71 μM d'IAA. On obtient un développement supplémentaire des tiges sur un milieu de base MS et les pousses érigées sont mises à raciner sur du milieu MS de base avec 4,9 μM d'IBA, parce que cette formulation a donné le meilleur racinement dans les expériences précédentes (Kathiravan et coll., 1995).

Quatre vingt dix pour-cent des pousses régénérées à partir d'explants de feuilles sont mises à raciner avec succès et détachées des fioles et transférées dans des pots pour le durcissement (dans des conditions de brumisation avec 80 à 90 % d'HR) avec 70 % de survie. Après la transplantation, ces plants montrent une croissance normale comme le prouve l'émergence de nouvelles feuilles et l'allongement des tiges.

Les résultats de ces traitements révèlent que chez le cv. S54, le TDZ stimule un développement ressemblant à un nodule quand on l'utilise seul et son effet cause une organogénèse quand on l'utilise avec de l'IAA. De plus, le TDZ seul est un morphorégulateur très puissant capable d'induire une organogénèse des pousses dérivées des cotylédons, comme chez la pomme, la poire, la noix, l'abricot, la cerise (Korban et Skirvin, 1985 ; Kouider et coll., 1984 ; Lanc et Cossio, 1986 ; Hiratsuka et Katagiri, 1988 ; Preece et coll., 1988) et une régénération de la feuille chez le pois de cajan (Eapen et coll., 1998). Cependant, dans cette étude, l'action synergétique du TDZ et de l'IAA entraîne une régénération réussie à partir de la feuille. Ainsi, la combinaison et l'équilibre réussis de régulateurs de croissance, (auxine et cytokinine) pourraient donner une réponse de régénération à partir de cultures de feuilles du mûrier. En fait, l'utilisation de TDZ en combinaison avec de l'IAA entraînerait un équilibre hormonal qui donne une réponse positive pour le développement de bourgeons en tiges complètes.

Ces données sur la régénération de la feuille montrent que le TDZ et l'IAA, quand on les utilise à de faibles concentrations, ont un effet positif sur la régénération *in vitro* de la feuille. Chez le cv. S54 du mûrier, l'IAA se comporte comme un régulateur critique qui promeut de manière supplémentaire le développement *in vitro* du bourgeon. Une telle étude rend aussi les interactions entre les régulateurs de croissance claires et permet de déterminer si oui ou non le TDZ et l'IAA ont une relation additive. On pense que le protocole de régénération basé sur la feuille sera très utile pour l'amélioration génétique du mûrier grâce à la technologie de recombinaison. La feuille est l'explant favori pour les études de transformation puisque les nutriments pénètrent rapidement ces organes et facilite ainsi la sélection antibiotique et la suppression efficace des cellules non transformées. Ainsi, l'un des intérêts principaux de cette technologie est la mise au point d'une organogénèse efficace des pousses et de protocoles de régénération des plantes à partir d'explants matures du mûrier.

PHOSPHORUS UPTAKE IN THREE IMPROVED VARIETIES OF MULBERRY (*MORUS INDICA* L.) UNDER IRRIGATED FIELD CULTIVATION

R. M. SHIVAPRAKASH¹, U. D. BONGALE^{1*}, S. B. DANDIN², BASAVAIAH³,
S. N. NARAYANAGOWDA¹ & N. SIDDALINGASWAMY

1. Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore—560 062, Karnataka, India.
2. SMGS, Central Silk Board, Hosur, Tamil Nadu, India.
3. Department of Sericulture, Mysore University, Mysore, India.

Phosphorus is an important major plant nutrient and is required for normal growth of the mulberry plant. Systematic studies on the amounts of phosphorus removal and estimations of requirement of phosphorus for the cultivation of mulberry are needed in view of its economic importance and response of mulberry to phosphorus inputs. A field study was conducted with three varieties under two plant densities. Observations on five harvests of mulberry over one year were recorded along with the pooled data. The leaf and stem phosphorous content varied from 0.31 to 0.35% and 0.18 to 0.22% respectively as mean values of five harvests. Total phosphorus removal through mulberry shoot (leaf + stem) ranged from 42.28 to 60.32 kg/ha/yr and through leaf ranged from 30.6 to 43.1 kg/ha/yr. Significant differences in leaf yield, stem yield and phosphorous removal among the varieties and spacings recorded suggest for variety related specification for the application of phosphorous fertilizers for optimizing the yield and quality of mulberry leaf. In the present study removal of soil phosphorous was lesser than the amount of phosphorus supplemented through chemical fertilizer (120 kg/ha/yr).

Keywords: Mulberry, nutrient uptake, phosphorus, spacing, variety.

INTRODUCTION

Phosphorus is an important major plant nutrient which is required for normal growth of the mulberry plant (Bongale, 1995; Tandon, 1987). The present fertilizer recommendation for irrigated mulberry garden in Southern India is 300: 120: 120 kg NPK/ha/yr (Jolly, 1987) in addition to about 60 kg/ha/yr supplemented through farmyard manure (FYM) (20 tonnes with about 0.3% P content). In India most of works on fertilizers in mulberry did not take cognisance of the NPK uptake by the plants while determining the optimum dosages for leaf quality and yield (Purohit and Pavankumar, 1996). Balanced fertilizer use is very important for mulberry because its leaf quality and yield ultimately influence the cocoon yields in addition to economic consideration on the inputs. In mulberry, the information available so far on nutrient budgeting appears to be incomplete. Keeping this in view, a study on the shoot yield and estimations of phosphorus removed by a mulberry garden were established.

* Address for correspondence.

MATERIALS AND METHODS

A field study was conducted in a newly established mulberry garden at the campus of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute of Bangalore during 1996-97 under irrigated cultivation. The soil was red sandy loam with pH = 7.8, organic carbon = 0.56%, available P = 22.75 kg/ha and K = 340 kg / ha. Cultural practices were attended as per the package of practices recommended for mulberry under irrigated conditions (Jolly, 1987) except for phosphorus and potassium which were applied in five equal split doses. The NPK was applied in the form of complex fertilizer 15:15:15 and additional amount of nitrogen was applied in the form of urea. The mulberry garden was irrigated once in a week during non-rainy periods.

The experiment was planned as a randomised complete block design (R.C.B.D) with six treatments and three replications.

The treatments were as follows:

T1 : M5 with 60 × 60 cm plant spacing,

T2 : M5 with 90 × 90 cm plant spacing,

T3 : S36 with 60 × 60 cm plant spacing

T4 : S36 with 90 × 90 cm plant spacing,

T5 : DD with 60 × 60 cm plant spacing.

T6 : DD with 90 × 90 cm plant spacing

The three varieties namely M5, S36 and DD belonged to *Morus indica* L. Observations were recorded every 70 to 75 days of growth shoot harvest method for five harvests covering one annual crop cycle was followed. Leaf and stem samples were collected from each microplot and moisture contents were recorded. The samples were air dried first then oven dried at 70° C and powdered, and eventually were used for the estimation of phosphorus in leaf and stem by following Vanadomolybdate phosphorus yellow colour method (Jackson, 1973). Based on the leaf and stem phosphorus content the amount of phosphorus removed under different treatments was calculated on a dry matter basis. Shoot yield assessment was done by harvesting all the plants of the microplot and computed in yield as kg / ha.

RESULTS

Phosphorus content in mulberry leaf did not differ significantly among the treatments in all the five harvests and the mean values varied from 0.31% (T4) to 0.35% (T1) among the treatments (Table IV). Phosphorus content in mulberry stem also did not differ significantly among the treatments in all the five harvests with the mean values ranging from 0.18% in T6 to 0.22% in T3 (Table V).

Phosphorus removal through mulberry leaf differed significantly among the treatments in all the five harvests. Maximum phosphorus removal through mulberry leaf was recorded in T3 (43.1 kg / ha / yr) and minimum was recorded in T4 (30.6 kg / ha / yr) (Table VI). Phosphorus removal through mulberry stem differed significantly among the treatments for I, II and IV harvests and the mean values varied from 11.68 kg / ha / yr in T4 to 17.22 kg / ha / yr in T3 (Table VII). Total phosphorus removal kg / ha / yr ranged from 42.28 kg in T4 to 60.32 kg in T3 (Table VIII).

Table I. Mulberry leaf yield (kg / ha).**Tableau I. Rendement en feuilles de mûrier (kg / ha).**

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	9500	6257	7410	12850	9201	9043	45218
T2	6785	4426	6621	10410	6907	5648	28242
T3	11040	7888	9963	15203	10502	10919	54596
T4	7605	4817	7629	11546	8441	8007	40038
T5	10948	7775	9664	13280	9462	10225	51129
T6	8946	6318	6406	12334	9007	8602	43011
Mean / Moyenne	9137	6247	7949	12604	8920	8971	44857
CD 5% / DC à 5 %	241	384	661	630	626		

Table II. Mulberry stem yield (kg / ha.)**Tableau II. Rendement en tiges de mûrier (kg / ha).**

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	5874	5678	6134	8427	5890	6400	32003
T2	4381	4475	4772	7593	4676	5179	25897
T3	7252	8099	6080	9797	6824	7610	38052
T4	5194	4141	4806	6724	5629	5298	26494
T5	7122	7214	7079	10492	5983	7578	37890
T6	5887	4406	4774	10164	5758	6197	30989
Mean / Moyenne	5951	5669	5607	8866	5793	6377	31886
CD 5% / DC à 5 %	490	605	766	814	601		

Table III. Total shoot yield (kg / ha).

Tableau III. Rendement total en pousses (kg / ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	15374	11935	13544	21277	15091	15444	77221
T2	11166	8901	11393	18003	11583	12209	61046
T3	18292	15987	16043	25000	17326	18529	92648
T4	12799	8958	12435	18270	14070	13306	66532
T5	18070	14989	16743	23772	15445	17803	89019
T6	14833	10724	11180	22498	14765	11847	59235

Table IV. Phosphorous content in mulberry leaf (% on dry matter).

Tableau IV. Teneur en phosphore de la feuille de mûrier (en % de matière sèche).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne
T1	0.41	0.40	0.32	0.26	0.39	0.35
T2	0.35	0.37	0.32	0.28	0.37	0.33
T3	0.35	0.36	0.31	0.28	0.30	0.32
T4	0.35	0.34	0.31	0.23	0.32	0.31
T5	0.41	0.34	0.34	0.25	0.33	0.33
T6	0.37	0.31	0.32	0.29	0.38	0.33
Mean / Moyenne	0.37	0.35	0.32	0.26	0.35	0.33
CD 5% / DC à 5 %	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	

Table V. Phosphorus content in mulberry stem (% on dry matter).

Tableau V. Teneur en phosphore dans la tige de mûrier (% sur matière sèche).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean
Traitements	Récolte I	Recolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne
T1	0.24	0.23	0.22	0.16	0.23	0.21
T2	0.21	0.20	0.25	0.17	0.22	0.21
T3	0.22	0.22	0.24	0.18	0.25	0.22
T4	0.20	0.22	0.25	0.14	0.24	0.21
T5	0.21	0.17	0.22	0.16	0.22	0.19
T6	0.18	0.19	0.19	0.16	0.21	0.18
Mean / Moyenne	0.21	0.20	0.23	0.16	0.22	0.20
CD 5% / DC à 5 %	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	

Table VI. Phosphorus uptake through mulberry leaf (kg / ha).

Tableau VI. Absorption de phosphore par la feuille de mûrier (kg / ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	9.60	6.65	6.54	8.54	8.67	8.00	40.0
T2	6.13	4.53	5.90	7.67	6.47	6.14	30.7
T3	8.76	7.20	8.30	11.61	7.23	8.62	43.1
T4	6.28	4.28	6.62	7.07	6.36	6.12	30.6
T5	10.33	6.49	8.75	8.16	7.25	8.19	40.9
T6	7.88	5.08	5.63	8.84	8.26	7.13	35.7
Mean / Moyenne	8.16	5.70	6.95	8.65	7.37		
CD 5% / DC à 5 %	2.27	1.35	1.43	1.63	1.20		

Table VII. Phosphorus uptake through mulberry stem (kg /ha).

Tableau VII. Absorption de phosphore par la tige de mûrier (kg / ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean	Total
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>	
T1	3.05	2.89	2.73	3.70	3.24	3.12	15.61
T2	1.98	2.07	2.39	3.86	2.49	2.55	12.79
T3	3.01	3.73	2.67	4.31	3.50	3.44	17.22
T4	2.07	1.95	2.28	2.42	2.96	2.33	11.68
T5	3.01	2.62	3.03	4.37	3.21	3.24	16.24
T6	2.36	1.63	1.98	4.58	3.24	2.75	13.79
Mean / <i>Moyenne</i>	2.58	2.53	2.51	3.87	3.11		
CD 5% / <i>DC à 5 %</i>	0.26	0.25	N.S.	1.19	N.S.		

Table VIII. Total phosphorus uptake in mulberry shoot (kg / ha).

Tableau VIII. Absorption totale de phosphore dans la pousse de mûrier (kg / ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean	Total
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>	
T1	12.65	9.54	9.27	12.24	11.91	11.12	55.61
T2	8.11	6.60	8.29	11.53	8.96	8.69	43.49
T3	11.77	10.93	10.97	15.92	10.73	12.06	60.32
T4	8.35	6.23	8.90	9.49	9.32	8.45	42.28
T5	13.34	9.11	11.78	12.53	10.46	11.43	57.14
T6	10.24	6.71	7.61	13.42	11.50	9.88	49.49

Mulberry leaf yield differed significantly among the treatments in all the five harvests (Table I). Marked difference in the leaf yield was recorded between closer spacing (60×60 cm) and wider spacing (90×90 cm). When compared among the varieties, higher leaf yield was recorded in T3. However, T3 and T5 were on par with each other. A similar trend was observed in stem yield and shoot yield also (Table II and III). Average leaf yield ranged from 9,043 kg / ha (T1) to 10,919 kg / ha (T3) in closer spacing and 5,648 kg / ha (T2) to 8,602 kg/ha (T6) in wider spacing. Among the varieties lowest leaf yield was recorded in M5 variety while D.D. and S36 varieties were on par with each other (5,648, 8,602 and 8,007 kg / ha respectively in wider spacing and 9,043, 10,225 and 10,919 kg/ha respectively in closer spacing).

DISCUSSION

Total phosphorus removal through mulberry shoot ranged from 42.28 kg / ha / yr (T4) to 60.32 kg / ha / yr (T3) in the present study. Phosphorus removal through leaf alone ranged from 30.6 kg / ha / yr (T4) to 43.1 kg / ha / yr (T3). Phosphorus removal ranged from 55.61 kg / ha / yr (T1, M5 variety at 60×60 cm) to 60.32 kg / ha / yr (T3, S36 variety at 60×60 cm) among the closer spacings while among wider spacings it ranged from 42.28 kg / ha / yr (T4, S36 variety at 90×90 cm) to 49.49 kg / ha / yr (T6, DD variety at 90×90 cm). This could be owing to a comparatively higher yield of leaf and stem in closer spacing. The present phosphorus recommendation for irrigated mulberry is 120 kg / ha / yr through chemical fertilizers in addition to about 60 kg phosphorus through 20 tons Farm yard manure (FYM), (0.3% P in FYM) (Jolly, 1987). The present observations are interesting in the context of the need for nutrient budgeting for promoting effective utilisation of nutrient inputs. According to Mengel and Kirkby (1987) if the quantity of available soil phosphate is in the normal range the rate of phosphate application required should correspond to the amount of P removed by the crop. Under Indian conditions residual effect of P fertilizer additions have been observed up to 1-10 successive crops (Tandon, 1987). Even though several reports on the yield performance of improved varieties of mulberry are available (Ravikumar *et al.*, 1991; Ghosh *et al.*, 1997) in depth studies do not seem to have been conducted on the nutrient budgeting and the optimisation of inputs based on yield performances. Present findings thus would help in economisation of fertilizers especially the input levels of phosphatic fertilizers.

It is concluded that removal of soil phosphorus in the cultivation of mulberry as in the present study is considerably lesser than the amount of phosphorus supplement with the application of phosphatic fertilizers at the recommended level of 120 kg phosphorus / ha / yr.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank colleagues for help and the Director of the Institute for the facilities.

REFERENCES

- BONGALE U. D. (1995) Fertilizers in mulberry cultivation. Pushpaseri Publications, Thalagattapura, Bangalore 62. India. pp. 134.
- GHOSH A., AMBIKA & MISHRA R. K. (1997) Effects of varieties, spacing and fertilizer doses on growth, yield and quality of mulberry. *Indian J. Seric.*, 36(2): 138-141.
- JACKSON M. L. (1973) Soil chemical analysis. Prentice Hall: New Delhi. India pp. 326-338.
- JOLLY M. S. (1987) Appropriate sericulture techniques. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 8, India. pp.175.
- MENGEL K. & KIRKBY E. A. (1978) Principles of plant nutrition, 4th Ed. International Potash Institute, Bern, Switzerland, pp. 687.
- PUROHIT K. M. & PAVANKUMAR T. (1996) Influence of various agronomical practices in India on leaf and quality in mulberry, a review. *Sericologia* 36(2): 27-39.

- RAVIKUMAR C., ESHWAR RAO, M. S. & VEERESH M. (1991) The DD variety stands among the promising indigenous clonal selections of mulberry. *Indian Silk*, 30(2); 10-15.
- SAUCHELLI V. (1965) Phosphates in agriculture. Reinhold Publishing Corporation, New York. Pp-227.
- TANDON H. L. S. (1987) Phosphorus research and agricultural production in India. Fertilizer development and consultation organisation, New Delhi, pp. 160.

ABSORPTION DE PHOSPHORE CHEZ TROIS VARIETES DE MURIER AMELIOREES (*MORUS INDICA* L.) EN CULTURES IRRIGUEES

R. M. SHIVAPRAKASH¹, U. D. BONGALE^{1*}, S. B. DANDIN², BASAVAIAH³,
S. N. NARAYANAGOWDA¹ & N. SIDDALINGASWAMY

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

2. SMGS, Central Silk Board, Hosur, Tamil Nadu, Inde.

3. Department of Sericulture, Mysore University, Mysore, Inde.

Le phosphore est un nutriment majeur de la plante et il est nécessaire pour la croissance du plant de mûrier. Il est nécessaire d'entreprendre des études systématiques sur les quantités de phosphore absorbé et d'estimer les besoins en phosphore chez le mûrier compte tenu de son importance économique. Une étude sur le terrain a été réalisée avec trois variétés et deux densités de plantation. Les observations pour cinq récoltes de mûrier sur une année ont été enregistrées et les données ont été regroupées. La teneur en phosphore de la feuille et de la tige varie de 0,31 à 0,35 % et de 0,18 à 0,22 % respectivement en tant que valeurs moyennes pour cinq récoltes. L'absorption totale de phosphore par la pousse de mûrier (feuille + tige) est comprise entre 42,28 et 60,32 kg / ha / année et par la feuille seule entre 30,6 et 43,1 kg / ha / année. Les différences significatives de rendement en feuilles, en tiges et d'absorption de phosphore entre les variétés et les espacements que l'on enregistre suggèrent qu'il faut que les applications d'engrais phosphaté soient faites en fonction de la variété dans le but d'optimiser le rendement et la qualité de la feuille de mûrier. Dans cette étude, l'absorption de phosphore provenant du sol est moins importante que la quantité de phosphore apportée par les engrais chimiques (120 kg / ha / année).

INTRODUCTION

Le phosphore est un nutriment majeur de la plante qui est nécessaire à la croissance normale du plant de mûrier (Bongale, 1995 ; Tandon, 1987). La recommandation actuelle en engrais pour une mûraie irriguée dans le sud de l'Inde est de 300 : 120 : 120 kg NPK / ha / année (Jolly, 1987) ajoutée à environ 60 kg / ha / année fournie par la fumure (FYM) (20 tonnes avec environ 0,3 % de teneur en P). En Inde, la plupart des travaux sur les engrais chez le mûrier ne prennent pas en compte l'absorption de NPK par les plantes mais déterminent les dosages optimaux pour la qualité et le rendement en feuilles (Purohit et Pavankumar, 1996). L'usage équilibré des engrais est très important chez le mûrier parce que la qualité et le rendement en feuilles influencent en dernier lieu les rendements en cocons et parce qu'il faut aussi prendre en compte le coût des engrais par rapport à leurs apports. L'information disponible jusqu'à présent sur la budgétisation des nutriments chez le mûrier apparaît incomplète. Dans cette optique, nous avons entrepris une étude sur le rendement en pousses et estimé l'absorption de phosphore dans une mûraie.

* Auteur auquel adresser la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons entrepris une étude sur le terrain dans une nouvelle mûraie irriguée sur le campus de l'Institut de Développement et de Recherche Séricicoles de l'état du Karnataka en 1996-97. Le sol est un terreau sableux rouge avec un pH de 7,8 ; 0,56 % de carbone organique, 22,75 kg /ha de P et 340 kg / ha de K disponibles. Les pratiques de culture recommandées pour le mûrier dans des conditions irriguées sont suivies (Jolly, 1987) sauf pour le phosphore et le potassium qui sont appliqués en cinq doses égales. Le NPK est appliqué sous la forme d'un engrais global 15 : 15 : 15 et une quantité supplémentaire d'azote est appliquée sous la forme d'urée. La mûraie est irriguée une fois par semaine pendant les périodes sèches.

L'expérience est réalisée avec six traitements et trois répétitions sous échantillonnage aléatoire (R. C. B. D.).

Les traitements sont les suivants :

T1 : Variété M5 avec 60 × 60 cm d'espacement entre les plants

T2 : M5 avec 90 × 90 cm d'espacement entre les plants

T3 : Variété S36 avec 60 × 60 cm d'espacement entre les plants

T4 : S36 avec 90 × 90 cm d'espacement entre les plants

T5 : Variété DD avec 60 × 60 cm d'espacement entre les plants

T6 : DD avec 90 × 90 cm d'espacement entre les plants

Les trois variétés en l'occurrence M5, S36 et DD appartiennent à *Morus indica* L. Les observations sont enregistrées en récoltant les pousses après 70 à 75 jours de croissance, au cours de cinq récoltes couvrant un cycle de culture annuel. Des échantillons de feuilles et de tiges sont recueillis dans chaque micro parcelle et on enregistre leur teneur en humidité. Les échantillons sont d'abord séchés à l'air puis séchés à 70° C et réduits en poudre, et sont finalement utilisés pour l'estimation du phosphore dans la feuille et dans la tige en suivant la méthode de coloration jaune pour le phosphore de Vanadomolybdate (Jackson, 1973). D'après la teneur en phosphore de la feuille et de la tige, on calcule la quantité de phosphore absorbée sur matière sèche en fonction des différents traitements. On procède à l'estimation du rendement en pousses en récoltant tous les plants dans la micro-parcelle et en calculant le rendement estimé en kg / ha.

RESULTATS

La teneur en phosphore de la feuille de mûrier ne diffère pas de manière significative entre les traitements au cours des cinq récoltes et les valeurs moyennes varient de 0,31 % (T4) à 0,35 % (T1) pour les différents traitements (Tableau IV). La teneur en phosphore dans la tige de mûrier ne diffère pas de manière significative entre les traitements au cours des cinq récoltes, les valeurs moyennes étant comprises entre 0,18% pour T6 et 0,22 % pour T3 (Tableau V).

L'absorption de phosphore par la feuille de mûrier diffère de manière significative entre les traitements au cours des cinq récoltes. L'absorption maximum de phosphore par la feuille de mûrier est enregistrée avec T3 (43,1 kg / ha / année) et elle est minimum avec T4 (30,6 kg / ha / année) (Tableau VI). L'absorption de phosphore dans la tige de mûrier diffère de manière significative entre les traitements pour les récoltes I, II, et IV et les valeurs moyennes varient entre 11,68 kg / ha / année

pour T4 et 17,22 kg / ha / année pour T3 (Tableau VII). L'absorption totale de phosphore en kg / ha / année est comprise entre 42,28 kg pour T4 et 60,32 kg pour T3 (Tableau VIII).

Le rendement en feuilles de mûrier diffère de manière significative entre les traitements au cours des cinq récoltes (Tableau I). On enregistre une différence marquée pour le rendement en feuilles entre l'espacement plus serré (60 × 60 cm) et l'espacement plus large (90 × 90 cm). Quand on compare les variétés, on enregistre un rendement plus élevé en feuilles pour T3. Cependant, T3 et T5 sont égaux entre eux. On observe une tendance similaire pour le rendement en tiges et aussi pour le rendement en pousses (Tableau II et III). Le rendement moyen en feuilles est compris entre 9 043 kg / ha (T1) et 10 919 kg / ha (T3) pour l'espacement resserré et entre 5 648 kg / ha (T2) et 8602 kg / ha (T6) pour l'espacement plus large. Parmi les variétés, on enregistre le rendement le plus faible en feuilles avec la variété M5 tandis que les variétés D.D. et S36 sont égales entre elles soit respectivement 5648, 8602 et 8007 kg / ha avec l'espacement le plus large et respectivement 9043, 10225 et 10919 kg / ha avec l'espacement le plus étroit.

DISCUSSION

L'absorption totale de phosphore par la pousse de mûrier est comprise entre 42,28 kg / ha / année (T4) et 60,32 kg / ha / année (T3) dans cette étude. L'absorption de phosphore par la feuille seule est comprise entre 30,6 kg / ha / année (T4) et 43,1 kg / ha / année (T3). L'absorption de phosphore est comprise entre 55,61 kg / ha / année (T1, variété M5 à 60 × 60 cm) et 60,32 kg / ha / année (T3, variété S36 à 60 × 60 cm) pour les espacements plus étroits tandis que pour les espacement plus larges, elle est comprise entre 42,28 kg / ha / année (T4, variété S36 à 90 × 90 cm) et 49,49 kg / ha / année (T6, variété DD à 90 × 90 cm). Cela pourrait être dû à un rendement comparativement plus élevé en feuilles et tiges avec l'espacement plus étroit. La recommandation actuelle d'apport en engrais phosphaté pour le mûrier irrigué est de 120 kg / ha / année ajoutée à environ 60 kg de phosphore provenant de 20 tonnes de fumure (FYM) (0,3 % P avec du FYM) (Jolly, 1987). Les observations actuelles sont intéressantes parce qu'il est nécessaire d'étudier les nutriments sur le plan économique pour promouvoir une utilisation efficace des apports en nutriments. Selon Mengel et Kirkby (1987), si la quantité de phosphate disponible dans le sol est dans la norme, la quantité de phosphate à appliquer devrait correspondre à la quantité d'absorption de P par la plante. Dans les conditions indiennes, on observe un effet résiduel des applications de P jusqu'à 1 à 10 récoltes (Tandon, 1987). Bien qu'il existe plusieurs rapports sur la performance de rendement de variétés de mûrier améliorées (Ravikumar et coll., 1991 ; Ghosh et coll., 1997), il ne semble pas que des études approfondies aient été réalisées sur l'aspect économique des nutriments et sur l'optimisation des apports en fonction des performances de rendement. Les observations de cette étude vont donc permettre d'améliorer l'aspect économique de l'utilisation d'engrais surtout par rapport aux niveaux d'apports en engrais phosphatés.

En conclusion, on peut remarquer que l'absorption de phosphore dans le sol avec la culture de mûrier (comme le montre cette étude) est considérablement moins importante que la quantité de phosphore ajoutée par l'application d'engrais phosphatés au niveau recommandé de 120 kg de phosphore / ha / année.

IDENTIFICATION AND TACKLING THE FACTOR, HINDERING THE REGENERATION OF *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD.) THROUGH CUTTING - A BREAKTHROUGH

P. S. SINHA, M. C. JOSHI, S. BECK, R. KHARE*, A. GANGOPADHYAY, A. K. SINHA,
B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi (Jharkhand), India, PIN -835303.

For more than three decades, efforts are constantly made to make Terminalia arjuna, a primary food plant of tropical tasar silkworm, Antheraea mylitta, regenerate through cuttings, due to its far reaching implication in the development and multiplication of superior varieties, for bringing down the long gestation period and to have a uniform food plant population for more uniform rearings. Experiments done in this direction, however, mostly failed and in few rare cases, when some rooting was achieved, it was very low and inconsistent. Through this study, "mechanical barrier" in the form of Sclerenchymatous and Collenchymatous tissues have been identified as a factor hindering the root emergence and a technique / protocol suggested to counter this hindrance, to achieve excellent success rate of more than 86.6% root emergence, with considerable reduction in rooting time.

Keywords: Collenchyma, Sclerenchyma, mechanical barrier, wounding, root emergence.

INTRODUCTION

The ability of cuttings to regenerate varies with plant species. Some regenerate easily, other regenerate with difficulty or may not regenerate at all. *Terminalia arjuna* (Bedd) is the primary food plant of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. Propagation of *Terminalia arjuna* through cuttings has been a coveted consideration of the sericulturist, because of its far reaching implications such as the development of improved varieties, the reduction of the too long gestation period of tasar food plants and also for raising uniform plantation for uniform rearing. It is because of its enormous importance that the Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi, India, dedicated exclusively to research and development of tasar, since its very inception (about 4 decades back) has been constantly working on this aspect. All sorts of cuttings, ranging from normal pencil thickness cuttings to leaf node, soft wood, semi hard and hard, with and without rooting hormones have been tried for rooting, almost regularly from 1996 to 1997, but bearing some rare, erratic and inconsistent nominal / low rooting success, experiments mostly failed.

Tissue characteristics are known to affect rooting and presence of sclerenchyma and fibre tissues inhibits rooting in some plants (Nanda and Kochar, 1985). *T. arjuna* is a woody plant and contains a good amount of hard tissues like collenchyma and sclerenchyma. The present study was carried out to study the correlation between tissue characteristics of cutting and rooting in *T. arjuna*, to work out suitable measures for enhancing the root emergence from the cutting of *T. arjuna*.

* Present address: Research Extension Centre, Sultanpur, U. P. India.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out at field laboratory of Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi, Bihar, India. It was conducted in two sets as under:

- 1) Study on the co-relation between thickness of various hard tissues and rooting.
- 2) Study on the effect of mechanical breaking of the hard tissues on the rooting

Set 1:

Under set 1 cuttings of various thickness and maturity, such as juvenile cuttings (having stem apex and two newly unfurled leaves from a newly sprouted branch), leaf node (2nd node with a pair of leaves), semi hard (3rd to 5th node with leaves) and hard wood (5th to 8th nodes with leaves) taken from two different sources i.e. young bushes and mature trees, of the same age, were put to anatomical study through examination of their cross sections under microscope and measuring the thickness of hard tissues such as collenchyma and sclerenchyma using micrometer. It is brought out that the plants were maintained in bushy form by annual ground pruning. To generate juvenile and leaf node cuttings from plants already grown to tree, these trees were given light pruning (by cutting the branches having the girth of 3 cm or less), 60 days prior to utilisation. After having studied the anatomical features, all the above mentioned cuttings, were subsequently put to root in sterile sand filled in polybags of 30 × 10 cm, kept in sub soil pits of 2m × 1 m × 1 m and covered with transparent polythene sheet. These cuttings and walls of pits were sprayed with water two to three times a day to maintain humidity level around 80%. Regular observations were made on root initiation.

The rooted cuttings were again put to anatomical study of the cross sections of stems at and around the point of emergence of roots to know the tissue layer from where roots originate.

Set 2:

Study on the effect of partial removal of hard tissues through mechanical means, on rooting:

After having identified the various layers probably serving as a mechanical barrier to rooting, some portion of these layers were removed using a scalpel. This process henceforth will be termed as "wounding". Based on point of wounding, these have been categorized as nodal wounding, internodal wounding and basal wounding. Overall there were eight treatments under the wounding experiments i.e., T1 = control, T2 = nodal wounding, T3 = internodal wounding, T4 = basal wounding, T5 = no wounding + indole acetic acid (IAA) 100 parts per millions (ppm), T6 = nodal wounding + IAA 100 ppm, T7 = internodal wounding + IAA 100 ppm and T8 = basal wounding + IAA 100 ppm. For IAA treatment, wounded cuttings were dipped in IAA 100 ppm solution for 2 hrs. These wounded cuttings were put to root in sterile sand, filled in polybags by method described under set 1.

Under set 1, each type of cuttings was considered as one treatment so, in all, there were four treatments i.e. juvenile, leaf node, semi hard and hard wood cuttings. Each treatment was replicated five times. Under set 2, however, each treatment was replicated thrice only. There were 24 cuttings in each replication.

RESULTS AND DISCUSSION

Set (1)

a: Identification of mechanical barrier and point of origin of root:

Based on anatomical study of cross sections of various types of cuttings, with and without rooting it was inferred that:

1. The hypodermis comprising of sclerenchyma and collenchyma act as a mechanical barrier to lateral emergence of root.
2. Root originates from some living cells in the vascular region i.e. xylem region, phloem region, cambium region, medullary rays but from outside pith and never from cortex.

Generally, the origin and development of adventitious roots take place next to and outward from central core of vascular tissues (Hartmann and Kester, 1976). In herbaceous plants, roots originate from outer cells, located between vascular bundles (Priestly and Swingle, 1929) and even in some plants adventitious root initials are already present (Carpenter, 1961; Lek, 1930). Such plants fall in easy to root category. Apparently in the *T. arjuna*, the origin of root from deeper regions, reaching up to inner most xylem layers in some cases, puts more obstacle to the route of root emergence and the presence of continuous ring of sclerenchyma and collenchyma surrounding the vascular bundles, makes the task of root emergence still more difficult. It is because of this, that rooting in *Terminalia arjuna* by following normal methods has been virtually unsuccessful, so far. Beakane (1961), Ciampini and Cellini (1958, 1963) and Sadhu (1989) have also attributed the poor rooting in some plants to the presence of sclerenchymatous rings.

b) Co. Relation between the thickness of mechanical barrier and rooting:

It was observed that the youngest cuttings (juvenile) taken from young bushes, either lacks collenchymatous and sclerenchymatous ring or contain a very thin (up to 0.00028 mm) layer of these tissues. With the increasing maturity of cuttings, which is in order of juvenile, < leaf node < semi hard and < hard wood, the thickness of collenchymatous and sclerenchymatous hypodermis has constantly increased e.g. thickness of collenchymatous and sclerenchymatous hypodermal layer reached to a value of 0.0056 mm in hard wood cuttings of bush, against 0.00028 mm in juvenile cuttings of bush origin, thereby recording an increase of 1900%. It was also seen that thickness of the layers of hard tissues in same categories of cuttings, is more in cuttings taken from young bushes than those taken from mature trees e. g. thickness of hypodermal ring in juvenile cuttings, taken from bushes and mature trees is 0.00028 and 0.0014 mm respectively i.e., a difference of 400%.

Data presented in Table I suggest that juvenile cuttings of bush origin have shown maximum rooting up to 86.6% followed by leaf node (up to 55 %), semi hard (up to 17.3%) and hard wood cuttings (up to 8.3%). This holds true for cuttings taken from mature trees also, however, quantum of rooting was comparatively very high in cuttings of the bush origin e.g. against 86.6% rooting in juvenile cuttings of bush origin there was merely, up to 36.2% rooting in the similar type of cuttings taken from mature trees. Besides rooting, there was a considerable difference in rooting time in various categories of cuttings. Softer cuttings (juvenile) rooted earliest and harder ones, took more time e. g. in bush cuttings, where hard wood cuttings took 43.1 days to root, juvenile rooted within 25.1 days. It was already mentioned that thickness of mechanical barrier i.e. sclerenchymatous and collenchymatous hypodermis increases in order of juvenile > leaf node > semi hard and > hard wood. Since rooting % decreased in the same order so a direct inverse co-relation between the mechanical barrier and rooting % is evident. This clearly shows an inverse co-relation between thickness of mechanical barrier and rooting % and a positive co-relation between thickness of mechanical barrier and rooting time. Foregoing discussion infers that hard tissues in form of collenchymatous and sclerenchymatous ring, is the most important hindering factor for root initiation in cuttings of *T. arjuna*.

Set 2. Effect of partial removal of hard tissues on rooting:

Table I also depicts the effect of partial removal of hard tissues (wounding) on semi hard and hard wood cuttings. This can be seen from the table that wounding has remarkable effect both on rooting % and rooting time and the point of wounding is also important. The wounding done on basal portion is most effective, followed by wounding on middle of internode or on node. As is evident from the data, basal wounding improved the rooting of semihard cuttings from 14.8% to 64.1% i.e. an enhancement of approx. 338.1%, with considerable reduction in rooting time from 33.8 days to 17.3 days i. e. by 48.8%. In hard wood cuttings basal wounding induced 35.8% rooting against 8.33% rooting in control sets. It is also evident that IAA has performed well with wounded sets, compared to unwounded.

Table I. Rooting response of *T. arjuna* cuttings under various treatments.

 Tableau I. Réponse de racinement de boutures de *T. arjuna* traitées de manières variées.

Treatments	Rooting (%)		Rooting time (Days)	
Traitements	Racinement (%)		Temps de racinement (Jours)	
A. Nature of cuttings	From bushes	From trees	From bushes	From trees
A. Nature des boutures	De buissons	D'arbres	De buissons	D'arbres
a. Juvenile cuttings / Boutures juvéniles	86.60	36.20	25.10	41.00
b. Leaf node cuttings / Boutures du noeud foliaire	55.00	26.00	30.30	40.90
c. Semi hard cuttings from bushes Boutures de buissons semi-dures	17.30	11.60	37.80	45.70
d. Hard wood cuttings from bushes Boutures de bois dur de buisson	8.70	0.00	43.10	NA
C. D at 5%	2.31	4.32	3.37	2.37
B. Wounding	Semihard cuttings	Hard wood cuttings	Semihard cuttings	Hardwood cuttings
B. Blessures	Boutures semi-dures	Boutures de bois dur	Boutures semi-dures	Boutures de bois dur
a. No wounding (control) / Pas de blessure (témoin)	14.80	8.33	33.80	40.00
b. Nodal wounding / Blessure nodale	22.50	11.70	17.70	30.90
c. Internodal wounding / Blessure internodale	32.50	22.50	17.00	31.80
d. Basal wounding / Blessure basale	64.10	35.80	17.30	30.60
e. No wounding + IAA 100 ppm Pas de blessure + IAA 100 ppm	30.50	10.00	35.00	40.00
f. Nodal wounding + IAA 100 ppm Blessure nodale + IAA 100 ppm	31.60	13.30	16.50	28.70
g. Internodal wounding + IAA 100 ppm Blessure internodale + IAA 100 ppm	50.80	34.20	17.30	29.20
h. Basal wounding + IAA 100 ppm Blessure basale + IAA 100 ppm	70.80	38.30	17.20	27.90
C. D. at 5%	5.12	6.59	4.31	3.99

Note. Values are the mean of two years data / Les valeurs sont la moyenne de deux années de données.

It is therefore inferred that in *T. arjuna* cuttings, root emerges from various points in vascular region and mechanical barrier in the form of sclerenchymatous and collenchymatous hypodermal ring is one of the most important factor responsible for inhibition or retardation of root emergence from the cuttings of *T. arjuna*.

These mechanical barriers may be tackled either by:

1. Using such material having least amount of mechanical barrier. Softer cuttings from young bushes is such a choice. These bushes can be prepared / maintained by repeated pruning of plants at 6" i.e. these plants should not be allowed to grow as mature tree.
2. By partial removal of hard tissues by scalpel at some points, preferably near the basal portion in harder types of cutting. This process not only induces rooting, but it also brings down rooting time considerably, as the natural process of making route through hard tissues is taken care of, artificially through wounding, thus saving considerable amount of energy and time.

REFERENCES

- BEAKBANE A. B. (1961) Structure of the plant stem in relation to adventitious. *Nature* 192: 954-955.
- CARPENTER J. B. (1961) Occurrence and inheritance of performed root primordia in stems of citron (*Citrus media* L.) *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 77: 211-218.
- CIAMPI C. & CELLANI R. (1958) Anatomical study on the relationship between structure and rooting capacity in olive cuttings, *Nuova Cziorn Bot Bot. Ital* 65: 417-424.
- CIAMPI C. & CELLINI R. (1963) Formation and development of adventitious roots in *Olea europaea* L. Significance of anatomical structure for the development of radicles. *Nuova Cziorn. Bot. Ital.* 70: 62-74.
- HARTMANN H. T. & KESTER D. F. (1976) Anatomical and physiological basis of propagation by cuttings. In "Plant propagation principles and practices Prentice Hall of India. Private Limited, New Delhi.
- LEK H. A. A. (1930) Anatomical structure of woody plants in relation to vegetative propagation. *Proc. IXth Int. Hort. Cong.* 66-76.
- NANDA K. K. & KOCHAR U. K. (1985) Propagation through cuttings. In "Vegetative propagation of plants. Pp 113-193, Kalyani Publishers New Delhi.
- PRIESTLY J. H. & SWINGLE C. F. (1929) Vegetative propagation from the stand point of plant anatomy. *U. S. D. A. Tech. Bul.* 151.
- SADHU M. K. (1989) Propagation on its own root system. In "Plant propagation pp. 173 to 194. Wiley Eastern Ltd., New Delhi.

IDENTIFICATION DU FACTEUR EMPECHANT LA REGENERATION DE *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD.) PAR BOUTURAGE

P. S. SINHA, M. C. JOSHI, S. BECK, R. KHARE*, A. GANGOPADHYAY, A. K. SINHA,
B. R. R. P. SINHA & THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi (Jharkhand), Inde, PIN – 835303.

Pendant plus de trois décennies, des efforts ont été constamment faits pour régénérer Terminalia arjuna par bouturage, une plante hôte primaire du ver à soie tasar tropical, Antheraea mylitta, afin d'obtenir et de multiplier des variétés supérieures et pour réduire la longue période de gestation et avoir une population de plantes hôtes uniformes afin d'avoir des élevages plus uniformes. Les expériences faites dans cette direction, cependant, ont pour la plupart échoué et dans quelques cas rares, quand on a obtenu un bouturage, il était très faible et inconsistant. Grâce à cette étude, " la barrière mécanique " des tissus sclérenchymateux et collenchymateux a été identifiée comme le facteur empêchant l'émergence des racines et on a mis au point une technique / un protocole pour contrer cet obstacle, afin d'obtenir un taux de succès excellent de plus de 86,6 % de développement des racines, avec une réduction considérable du temps de racinement.

INTRODUCTION

La capacité des boutures à se régénérer varie en fonction des espèces de plantes. Certaines se régénèrent facilement, d'autres se régénèrent avec difficulté ou ne se régénèrent pas du tout. *Terminalia arjuna* (Bedd) est la plante hôte primaire du ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta* D. La propagation de *Terminalia arjuna* par boutures est importante pour le sériciculteur parce qu'elle a des implications d'une portée considérable telles que la mise au point de variétés améliorées, la diminution de la trop longue période de gestation des plantes hôtes du tasar et aussi l'obtention de plantations uniformes pour un élevage uniforme. C'est à cause de son importance que l'Institut Central Tasar de Recherche et de Formation, de Ranchi en Inde, consacré exclusivement à la recherche et au développement du tasar depuis son tout début (il y a environ 4 décennies), a toujours travaillé dans ce domaine. Toutes sortes de boutures, allant des boutures normales de l'épaisseur d'un crayon, au nœud foliaire, au bois vert, semi dur et dur, avec et sans hormones de racinement ont été essayées pour le racinement régulièrement de 1996 à 1997, mais en raison de résultats rares, erratiques et d'un racinement nominal inconsistant / faible la plupart des expériences ont échoué.

On sait que les caractéristiques des tissus ont un effet sur le racinement et la présence des tissus sclérenchymateux et fibreux empêche le racinement chez certaines plantes (Nanda et Kochar, 1985). *T. arjuna* est une plante ligneuse et contient une grande quantité de tissus durs comme les collenchymes et les sclérenchymes. Cette étude a été entreprise afin d'étudier la corrélation entre les caractéristiques des tissus et le bouturage et le racinement chez *T. arjuna*, afin de mettre au point des mesures adaptées pour améliorer l'émergence des racines à partir de boutures de *T. arjuna*.

* Adresse actuelle : Research Extension Centre, Sultanpur, U. P. Inde.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée sur un terrain expérimental de l'Institut Tasar Central de Formation & de Recherche, de Nagri, Ranchi, Bihar en Inde. Elle a été réalisée de deux manières comme suit :

- 1) Etude sur la corrélation entre l'épaisseur de divers tissus durs et le racinement.
- 2) Etude de l'effet de la rupture mécanique des tissus durs sur le racinement.

1^{er} lot :

Dans le premier lot, des boutures d'épaisseur et de maturité variées, telles que des boutures juvéniles (extrémité d'une tige avec deux feuilles venant de se déployer sur une branche venant de pousser), le nœud foliaire (2^{ème} nœud avec deux feuilles), du bois semi dur (3^{ème} à 5^{ème} nœud avec des feuilles) et du bois dur (5^{ème} à 8^{ème} nœud avec des feuilles) provenant de sources différentes, (par exemple de jeunes buissons et d'arbres matures, du même âge), ont été étudiées anatomiquement par l'examen de leurs coupes sous un microscope et par la mesure de l'épaisseur des tissus durs comme les collenchymes et les sclérenchymes en utilisant un micromètre. Nous précisons que les plants sont maintenus sous la forme de buissons grâce à une taille annuelle. Pour générer des boutures juvéniles et un nœud foliaire chez des plants devenus arbres, on taille légèrement ces arbres (en coupant les branches dont la circonférence est de 2 cm ou moins) 60 jours avant l'utilisation. Après avoir étudié les traits anatomiques, toutes les boutures mentionnées ci-dessus sont par la suite mises à raciner dans du sable stérile disposé dans des sacs en polyéthylène de 30 × 10 cm, conservées dans des trous de 2 m × 1 m × 1 m creusés dans le sol et recouvertes avec une feuille de polyéthylène transparent. Ces boutures et les parois des trous sont vaporisés avec de l'eau deux à trois fois par jour pour maintenir un niveau d'humidité d'environ 80 %. On procède à des observations régulières sur la formation des racines.

Les boutures racinées sont à nouveau étudiées anatomiquement en analysant les coupes des tiges à l'endroit d'émergence des racines et autour pour savoir de quelle couche tissulaire les racines proviennent.

2^{ème} lot :

Etude de l'effet de l'enlèvement partiel des tissus durs par des moyens mécaniques, sur le racinement :

Après avoir identifié les couches variées servant probablement de barrière mécanique au racinement certaines parties de ces couches sont retirées en utilisant un scalpel. Ce procédé désormais s'appellera " la blessure ". En fonction de l'endroit de la blessure, on a établi des catégories telles que la blessure nodale, la blessure internodale et la blessure basale. Il y avait en tout huit traitements dans le cadre des expériences de blessure, soit T1 = témoin, T2 = blessure nodale, T3 = blessure internodale, T4 = blessure basale, T5 = pas de blessure + de l'acide indole acétique (IAA) 100 parties par million (ppm), T6 = blessure nodale + 100 ppm d'IAA, T7 = blessure internodale + 100 ppm d'IAA et T8 = blessure basale + 100 ppm d'IAA. Pour le traitement avec de l'IAA, les boutures blessées sont plongées dans une solution à 100 ppm d'IAA pendant 2 hrs. Ces boutures sont mises à raciner dans du sable stérile, puis transférées dans des sacs en polyéthylène d'après la méthode décrite plus haut.

Dans le 1^{er} lot, chaque type de bouture était considéré comme un traitement, il y avait donc en tout quatre traitements : les boutures juvéniles, de nœud foliaire, de bois semi dur et de bois dur. Chaque traitement a été répété cinq fois. Cependant, dans le deuxième lot, chaque traitement n'est répété que trois fois. Il y a 24 boutures pour chaque répétition.

RESULTATS ET DISCUSSION

Lot (1) :

a) Identification de la barrière mécanique et du point d'origine de la racine :

D'après l'étude anatomique des coupes de divers types de boutures, avec et sans racinement on peut en déduire que :

1. L'hypoderme comprenant les sclérenchymes et les collenchymes agit comme une barrière mécanique par rapport à l'émergence latérale de la racine.

2. La racine provient de cellules vivantes dans la région vasculaire, c'est à dire de la région du xylème, du phloème, du cambium, des rayons médullaires mais toujours de la moelle externe et jamais du cortex.

En général, l'origine et le développement des racines adventives a lieu près de et vers l'extérieur du cœur central des tissus vasculaires (Hartmann et Kester, 1976). Chez les plantes herbacées, les racines viennent des cellules extérieures, situées entre les paquets vasculaires (Priestly et Swingle, 1929) et même chez certaines plantes les prémices des racines adventives sont déjà présentes (Carpenter ; 1961 ; Lek, 1930). De telles plantes tombent dans la catégorie des plantes faciles à raciner. Apparemment chez *T. arjuna*, la racine provient des régions les plus profondes, des couches du xylème les plus profondes dans certains cas, ce qui crée plus d'obstacles pour le cheminement de la racine et la présence d'un anneau continu de sclérenchymes et de collenchymes entourant les paquets vasculaires rend l'émergence des racines encore plus difficile. C'est à cause de cela, que le racinement de *Terminalia arjuna* en suivant les méthodes normales n'a presque jamais réussi jusqu'à présent. Bcekane (1961), Ciamphi et Cellini (1958, 1963) et Sadhu (1989) ont aussi expliqué le mauvais racinement chez certaines plantes par la présence d'anneaux sclérenchymateux.

b) Corrélation entre l'épaisseur de la barrière mécanique et le racinement :

On a observé que les boutures les plus jeunes (juvéniles) prises sur de jeunes buissons, sont soit dépourvues d'un anneau collenchymateux ou sclérenchymateux soit contiennent une couche très fine (jusqu'à 0,00028 mm) de ces tissus. Avec l'augmentation de la maturité des boutures, qui se produit dans l'ordre bouture juvénile < nœud foliaire < bois semi-dur et < bois dur, l'épaisseur de l'hypoderme collenchymateux et sclérenchymateux augmente constamment, c'est à dire que l'épaisseur de la couche hypodermale atteint 0,0056 mm pour les boutures de bois dur, contre 0,00028 mm pour les boutures juvéniles provenant de buissons, soit une augmentation de 1900 %. On voit aussi que l'épaisseur des couches de tissus durs pour les mêmes catégories de boutures, est plus importante chez les boutures prises sur de jeunes buissons que chez celles prises sur des arbres matures, c'est à dire que l'épaisseur de l'anneau hypodermale des boutures juvéniles, prises sur des buissons et des arbres adultes est de respectivement 0,00028 mm et 0,0014 mm, soit une différence de 400 %.

Les données présentées dans le Tableau I montrent que les boutures juvéniles provenant de buissons présentent un racinement maximum allant jusqu'à 86,6 %, suivi par le nœud foliaire (jusqu'à 55 %), le bois semi dur (jusqu'à 17,3 %) et les boutures de bois dur (jusqu'à 8,3 %). Cela est aussi vrai pour les boutures prises sur les arbres adultes, cependant, la quantité de racinement est comparativement très élevée pour les boutures provenant de buissons, c'est à dire que pour les boutures juvéniles provenant de buissons il y a 86,6 % de racinement tandis qu'il n'y a que 36,2 % de racinement pour le même type de boutures prises sur des arbres adultes. Il existe aussi une différence considérable entre les différentes catégories de boutures non seulement pour le racinement mais aussi pour le temps de racinement. Les boutures les plus tendres (juvéniles) racinent plus tôt et les plus dures, prennent plus de temps, par exemple pour les boutures de buisson, les boutures de bois dur prennent 43,1 jours pour raciner tandis que les boutures juvéniles racinent en 25,1 jours. On a déjà expliqué que l'épaisseur de la barrière mécanique, c'est à dire de l'hypoderme sclérenchymateux

et collenchymateux augmente dans l'ordre juvénile > nœud foliaire > bois semi dur et > bois dur. Puisque le % de racinement baisse dans le même ordre, une corrélation inverse directe entre la barrière mécanique et le % de racinement est évidente. Cela montre clairement une corrélation inverse entre l'épaisseur de la barrière mécanique et le % de racinement et une corrélation positive entre l'épaisseur de la barrière mécanique et le temps de racinement. La discussion précédente prouve que les tissus durs sous forme d'anneau collenchymateux et sclérenchymateux représentent le facteur le plus gênant pour la formation des boutures chez *T. arjuna*.

Lot 2. Effet de l'enlèvement partiel des tissus durs sur le racinement :

Le Tableau I présente aussi l'effet de l'enlèvement partiel des tissus durs (blessure) sur les boutures de bois semi-dur et dur. D'après le tableau on observe que la blessure a un effet remarquable à la fois sur le % de racinement et sur le temps de racinement et que le point de blessure est aussi important. La blessure faite sur la partie basale est la plus efficace, suivie par la blessure au milieu de l'internœud ou sur le nœud. Il est évident d'après les données que la blessure basale améliore le racinement des boutures semi-dures de 14,8 % à 64,1 % soit une amélioration d'environ 338,1 % avec une réduction considérable du temps de racinement de 33,8 jours à 17,3 jours, soit une baisse de 48,8 %. Pour les boutures de bois dur, la blessure basale induit 35,8 % de racinement contre 8,33 % de racinement chez les lots témoins. Il est évident également que l'IAA donne de bonnes performances chez les lots blessés, par comparaison à ceux qui ne sont pas blessés.

On peut donc en déduire que chez les boutures de *T. arjuna*, la racine émerge à des endroits variés dans la région vasculaire et que la barrière mécanique sous forme d'anneau hypodermal sclérenchymateux et collenchymateux est l'un des facteurs les plus importants responsable de l'inhibition ou du retard de l'émergence de la racine.

On peut faire face à ces barrières mécaniques soit en :

1. Utilisant un matériau qui a le moins de barrières mécaniques. Des boutures plus souples de jeunes buissons sont un des choix. Ces buissons peuvent être préparés / maintenus grâce à une taille répétée des plants à 15cm de hauteur, c'est à dire qu'on ne doit pas laisser ces plants atteindre la taille d'un arbre adulte.

2. Enlevant partiellement les tissus durs au scalpel à certains endroits, préférablement près de la partie basale chez les types de bouture les plus durs. Ce processus non seulement induit le racinement, mais il réduit aussi considérablement le temps de racinement, puisque le processus naturel de cheminement par les tissus durs est réglé artificiellement par la blessure, ce qui économise beaucoup d'énergie et de temps.

PRELIMINARY OBSERVATIONS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF UZIFLY, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER (DIPTERA : TACHINIDAE)

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi – 835 303, India.

Gross morphological features of the embryo of uzifly *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae), a serious endoparasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) is described for the first time. Observations are based on the embryos that can be clearly seen in the live eggs through stereoscopic dissecting microscope and compound microscope. The freshly laid egg is enclosed in a transparent membrane. The creamy white eggshell is covered with glue mucilagenous layer and chorion is beset with minute hair like structures. There is a circular operculum situated on the antero-dorsal region.

The embryonic development is broadly divided into five distinct stages. The yolk in a fertilised egg is dispersed in a cytoplasmic network, which is observed in the periphery. In the first stage of development, no change is observed up to 6h. In the second stage (6 – 24 h) a distinct border of blastodermal cells is clearly seen on the periphery of the egg while in the third stage (24 – 39 h) embryonic tissue expands. The onset of fourth stage is characterised by the appearance of body segments, which become distinct at 57h. During fifth stage (60 – 72h) a recognizable larval form is seen. Hatching takes place through operculum and the maggot takes 20-25 minutes to emerge from the eggshell. The experiment was conducted at an average temperature of $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $60 \pm 5\%$ RH.

Keywords: Uzifly, *Blepharipa zebina*, silkworm, *Antheraea mylitta*, embryonic development, Tachinidae; Saturniidae.

INTRODUCTION

The tachinid fly *Blepharipa zebina* Walker – a larval endoparasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) causes considerable damage to sericulture (tasar) industry (Jolly, *et al.*, 1974; Singh and Thangavelu, 1991). Sometimes the loss due to this fly is about 40% in tropical tasar zone (Chaturvedi, *et al.*, 1986; Singh and Thangavelu, 1991). Uzi fly lays its eggs externally on the body of silkworm, *Antheraea mylitta*. Singh *et al.*, (1993) have provided some information with regards to its biology, reproduction, mode of infestation, control etc., but it is patchy. However, in recent years many researchers have made attempts to provide detailed information with regard to its biology, ecology and control method (Thangavelu and Singh, 1991; Singh and Thangavelu, 1991) to explore the possibilities for its control. In continuation of these studies, the present study has been undertaken to generate some information on embryonic development of *Blepharipa zebina* egg with particular reference to the external morphological features of embryos of different ages. This study will be helpful to find out sensitive age towards ovicidal action of various ovicides.

MATERIALS AND METHODS

Daba, a bivoltine race of silkworm *A. mylitta*, was reared. Nylon net (size: $12 \times 9 \times 3$ m) was used in the silkworm rearing field to avoid natural parasitisation by uzi fly. Fifth instar silkworms collected from this population were used in the study as host for uzi fly.

The puparia of *B. zebina* were obtained from laboratory culture and adults were allowed to emerge in netted cage (size: $45 \times 45 \times 45$ cm). 4-7 days old mated female uzi flies were obtained from a laboratory colony. To obtain the uzi fly eggs of uniform age, these flies were allowed to lay eggs for 15 minutes on the body of two days old fifth instar silkworm larvae and eggs laid during this period were considered as "0" h for calculation of egg age. Therefore, silkworm larvae having uzi eggs were reared at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ and $60 \pm 5\%$ RH in an incubator to obtain the eggs of required age. Sodium hypochlorite solution (1%) was used to clear the egg surface. The observations were made on embryonic development of uzi fly eggs at 3h interval after oviposition until completion of hatching.

The results presented deal only with the gross external morphological features of *Blepharipa zebina* embryos that can be clearly seen in live eggs through a binocular microscope. The results are based on observation of 15 eggs at each particular age.

RESULTS AND DISCUSSION

Egg is creamy white in colour and oblong in shape. It measures on average 1.02 ± 0.25 mm in length and 0.45 ± 0.14 mm in width. The posterior end of the egg is rounded whereas the anterior end is a little pointed. The dorsal surface of the egg is slightly convex whereas the ventral aspect is flattened. These observations are almost in agreement with reports of earlier workers on *Exorista bombycis* (Datta and Mukherjee, 1978; Kumar, 1987; Siddappaji, 1985; Kumar *et al.*, 1993) and on *B. zebina* (Singh *et al.*, 1993). A circular operculum is present on dorsal side, which is situated subterminally close to anterior end and is about 0.14 mm in diameter. Presence of operculum is in conformity with the findings of Siddappaji (1985) in the case of *E. bombycis*.

External eggshell is beset with small hair like structure, which is slightly bigger at both the ends of the egg. A glue mucilaginous layer is present all around the egg (Fig. 1). These observations are made for the first time. In the present study, it was found that egg is covered by transparent egg membrane and because of this, the present study of the embryogenesis in live egg was possible. On the contrary, Siddappaji (1985) has reported that egg is covered by opaque membrane in *E. bombycis*. Embryonic growth stages of uzi eggs at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ and $60 \pm 5\%$ RH are listed in Table I.

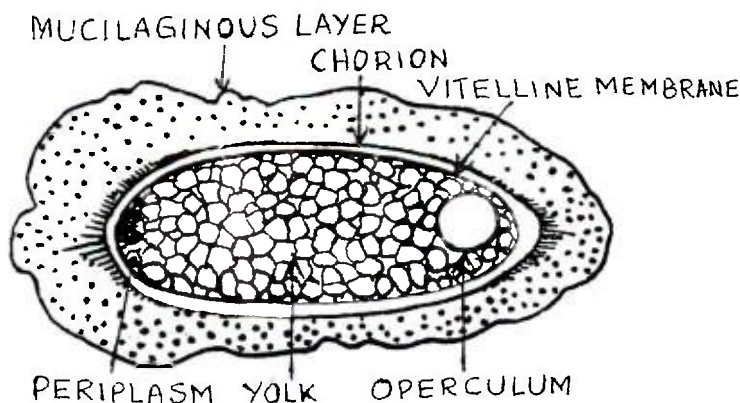


Fig. 1. Dorsal view of 5h old egg covered with mucilaginous layer.

Fig. 1. Vue dorsale d'un œuf de 5h recouvert d'une couche mucilagineuse.

Table 1. Time table for *Blepharipa zebina* embryonic growth stages at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ and $60 \pm 5\%$ R. H.

Tableau 1. Cinétique des stades de croissance embryonnaire de *Blepharipa zebina* à $24 \pm 1^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5\%$ H. R.

Sl. No No. de série	Stage / Stade	Hours / Heures
1	Formation of blastular band / <i>Formation de la bande blastulaire</i>	9
2	Wrinkles of early band / <i>Rides de la bande précoce</i>	12
3	Formation of lobes / <i>Formation de lobes</i>	30
4	Appearance of body segments / <i>Apparition de segments corporels</i>	42
5	Deepening of body segments / <i>Approfondissement de segments corporels</i>	57
6	First movement of the embryo / <i>Premier mouvement de l'embryon</i>	63-65
7	Appearance of hook and beginning of violent movement of embryo <i>Apparition de crochets et début du mouvement violent de l'embryon</i>	66
8	Hatching of egg / <i>Eclosion</i>	72

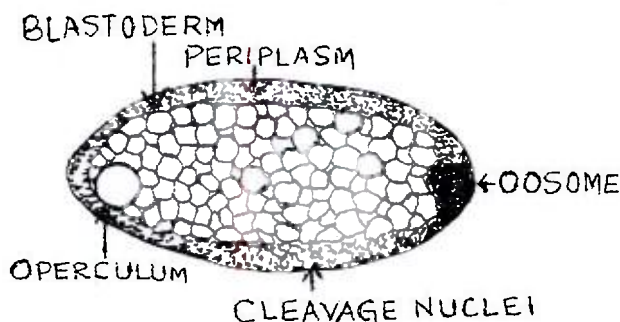


Fig. 2. Dorsal view of 9h old egg.

Fig 2. Vue dorsale d'un œuf de 9 h.

A freshly laid egg consists of yolk globules dispersed in a cytoplasmic network. At the periphery there is a cytoplasmic border devoid of yolk, which is commonly referred as the periplasm or cortex. At the posterior end of the egg, the periplasm is thick and contains granular material. It is known as Oosome (Fig. 1). For about 6 h after laying, the egg presents almost similar appearance and is considered as first stage of development.

Nuclear divisions and migration of cleavage nuclei cannot be seen in live eggs. The cleavage nuclei become visible at the periphery of the yolk as the blastula forms. Although the blastoderm covers the entire surface of the yolk, it is clearly visible only at the edges where the light shines through the thinner layer. Later there is a gradual separation of cellular elements and cytoplasm from the yolk and an increase in depth of the periplasm is observed, culminating in the establishment of a broad outer layer of cytoplasm and central core of yolk. After about 9h, the cleavage nuclei band is clearly visible in the egg (Fig. 2). Wrinkles occurring in the blastoderm on the dorsal side of the egg represent the early beginning of the germ band (Fig. 3). It was observed that changes in uzi fly embryos during early development resemble those of *Exorista sorbillans* (Kumar *et al.*, 1993).

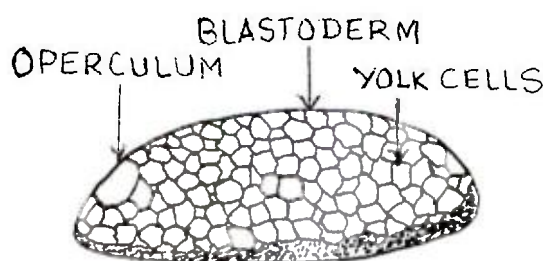


Fig. 3. Dorso-lateral view of 13 h old egg.

Fig. 3. Vue dorso-latérale d'un œuf de 13 h.

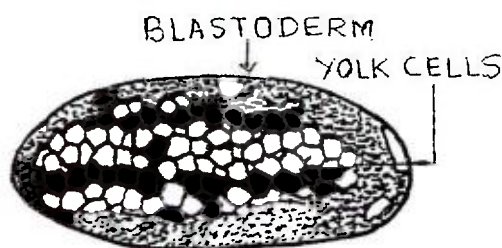


Fig. 4. Ventral view of 34h old egg.

Fig. 4. Vue ventrale d'un œuf de 34 h.

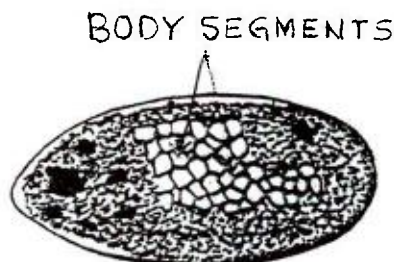


Fig 5. Ventral view of 41 h old egg.

Fig 5. Vue ventrale d'un œuf de 41 h.

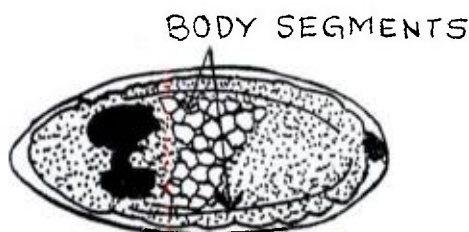


Fig. 6. Ventral view of 56h old egg.

Fig. 6. Vue ventrale d'un œuf de 56 h.

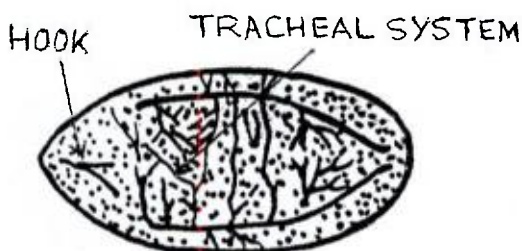


Fig 7. Ventral view of 68 h old egg.

Fig 7. Vue ventrale d'un œuf de 68 h.

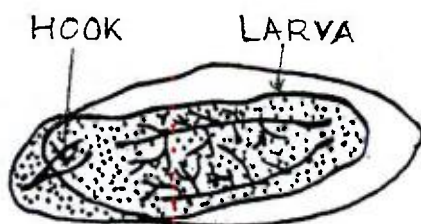


Fig 8. Egg showing hatching.

Fig 8. Œuf en train d'éclore.

During third stage (24-39 h), clear lobes can be seen in 30 h old embryo (Fig. 4). In 4th stage (39-60 h), at 42 hours, embryo occupies most of the space in the egg and for the first time body segmentation is visible (Fig. 5). These body segments became clearer at about 57 h of embryonic development (Fig. 6).

After 60 h of development, recognizable larval form is seen at between 63-65h and slight movements of the embryo for the first time could be detected. At 66h, mouth hook is clearly visible and tracheal system in rudimentary form is present. At this stage vigorous movements of embryo can be seen which continue till hatching.

At about 69-70 h, larva is fully formed with well-developed tracheal system (Fig. 7) and is ready for hatching. Incubation period is about 72 h at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ temperature and $60 \pm 5\%$ relative humidity. At the time of hatching, anterior portion of the maggot comes out first through operculum (Fig. 8), followed by remaining portion of the body. This observation is in agreement with Clausen (1940)

who also reported that hatching in tachinid species attacking caterpillars, e. g. *Phorocera*, *Erhestica*, *Winthemia* etc., is affected by the lifting of a definite lid or operculum. It was observed that changes in *B. zebina* during early development resemble those of *Culex tarsalis* (Rosay, 1959). Maggot took about 20-25 minutes to completely emerge out from the eggshell.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Shri L. B. N. Shahadeo for his assistance rendered during the present study.

REFERENCES

- CHATURVEDI H. K., SAXENA V. & KHOTALE V. (1986) Survey of uzifly infestation in Bastar district (India). *Indian J. Zool.*, 14(2): 27-32.
- CLAUSEN C. P. (1940) *Entomophagous insects*. Mc Graw Hill Book Company Inc. New York and London. 448 pp.
- DATTA R. K. & MUKHERJEE P. K. (1978) Life history of *Tricholyga bombycis* (Diptera: Tachinidae), a parasite of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Ann Entomol. Soc. Am.* 71: 767-770.
- JOLLY M. S., SEN S. K. & AHSAN M. A. (1974) *Tasar culture*, Ambika Publishers, Bombay, India, 266pp.
- KUMAR, PRADIP (1987) Contribution to our knowledge on *Tricholyga bombycis*—a serious parasite of *Bombyx mori* and its control. Ph. D. Thesis, Mysore University, Mysore.
- KUMAR V., KUMAR P. & MANJUNATH D. (1993) Gross external morphology of embryo of *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae), *Recent Adv. Uzifly Res.*, 79-84.
- ROSAY B. (1959) Gross external morphology of embryos of *Culex tarsalis* Conquillant (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 52: 481-484.
- SIDDAPPAJI C. (1985) Bioecology and management of the Indian uzifly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of mulberry silkworm. Ph. D. Thesis, UAS, Bangalore.
- SINGH R. N. & THANGAVELU K. (1991) Parasites and predators of tasar silkworm *Antheraea mylitta* and their control measures. *Indian Silk*. 29(12): 33-36.
- SINGH R. N., MANDAL K. C. & SINHA S. S. (1993) Studies on the biology of *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of *Antheraea mylitta* Drury. *Indian J. Seric.*, 32(1): 15-19.
- THANGAVELU K. & SINGH R. N. (1991) Integrated pest management in tasar culture. *Ann. Entomol.*, 9(2): 59-65.

OBSERVATIONS PRELIMINAIRES SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA MOUCHE UZI, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER (DIPTERA : TACHINIDAE)

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi – 835 303, Inde.

Nous décrivons pour la première fois les étapes morphologiques générales du développement embryonnaire de la mouche uzi *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae), un endoparasitoïde sévère du ver à soie, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). Les descriptions se basent sur les observations des embryons dans les œufs vivants grâce à un microscope stéréoscopique de dissection et un microscope composé. L'œuf venant d'être pondu est enfermé dans une membrane transparente. La coquille d'un blanc crémeux est recouverte par une couche mucilagineuse collante et le chorion est doté de structures minuscules ressemblant à des cheveux. Il y a un opercule circulaire situé dans la région antéro-dorsale.

Le développement embryonnaire se divise en gros en cinq phases. Le vitellus d'un œuf fécondé est dispersé dans un réseau cytoplasmique, que l'on observe dans la périphérie. Pendant la première étape de développement, on n'observe aucun changement jusqu'à 6 h. Pendant la deuxième étape (6 à 24 h) on voit distinctement une bordure de cellules blastodermiques à la périphérie de l'œuf tandis que pendant le troisième stade (24 – 39 h) le tissu embryonnaire s'étend. Le commencement du quatrième stade est caractérisé par l'apparition de segments corporels, qui deviennent distincts au bout de 57 h. Pendant le cinquième stade (60 à 72 h), on voit une forme larvaire reconnaissable. L'éclosion a lieu par l'opercule et l'asticot met 20 à 25 minutes à émerger de la coquille. L'expérience est réalisée à une température moyenne de $24 \pm 1^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5\%$ d'HR.

INTRODUCTION

La mouche tachinaire *Blepharipa zebina* Walker – un endoparasitoïde larvaire du ver à soie *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) provoque des dégâts considérables pour l'industrie séricicole (tasar) (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). Parfois les pertes provoquées par cette mouche sont d'environ 40 % dans la zone tasar tropicale (Chaturvedi et coll., 1986 ; Singh et Thangavelu, 1991). La mouche uzi pond ses oeufs à l'extérieur du corps du ver à soie, *Antheraea mylitta*. Singh et coll., (1993) ont apporté des informations sur sa biologie, sa reproduction, son mode d'infestation, et les moyens de lutter contre elle, mais elles sont dispersées. Au cours des dernières années de nombreux chercheurs ont essayé de fournir des informations détaillées sur sa biologie, son écologie et sur les méthodes de lutte (Thangavelu et Singh, 1991 ; Singh et Thangavelu, 1991). Cette étude a été entreprise à la suite de ces travaux, pour disposer d'informations sur le développement embryonnaire de *Blepharipa zebina* en s'attachant plus particulièrement aux traits morphologiques externes des embryons à des âges différents. Cette étude aura son utilité pour déterminer l'âge adéquat pour utiliser des ovicides variés.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons élevé Daba, une race bivoltine du ver à soie *A. mylitta*. Un filet en nylon est utilisé (taille : 12 × 9 × 3 m) dans le champ d'élevage pour éviter la parasitisation par la mouche uzi. Les vers à soie du 5^{ème} âge recueillis sur cette population sont utilisés dans l'étude comme hôtes de la mouche uzi.

Les pupariums de *B. zebina* sont obtenues à partir d'un élevage en laboratoire et on laisse les adultes émerger dans une cage grillagée (taille : 45 × 45 × 45 cm). On obtient d'une colonie de laboratoire des mouches uzi femelles de 4 à 7 jours ayant été accouplées. Pour obtenir des œufs de la mouche uzi d'un âge uniforme, on laisse ces mouches pondre des œufs pendant 15 minutes sur le corps de larves de vers du 5^{ème} âge âgées de deux jours et les œufs pondus pendant cette période sont pris en considération en tant que heure "0" pour le calcul de l'âge de l'œuf. Les larves de vers à soie avec des œufs uzi sont ainsi élevées à 24 ± 1° C et 60 ± 5 % d'HR dans un incubateur pour obtenir les œufs de l'âge désiré. On utilise une solution d'hypochlorite de sodium (1 %) pour nettoyer la surface de l'œuf. Des observations sont effectuées sur le développement embryonnaire des œufs de la mouche uzi à 3 h d'intervalle après l'oviposition jusqu'à la fin de l'éclosion.

Les résultats présentés ne concernent que les traits morphologiques extérieurs de base des embryons de *Blepharipa zebina* que l'on peut voir plus clairement dans les œufs vivants avec un microscope binoculaire. Les résultats s'appuient sur l'observation de 15 œufs à chaque âge particulier.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'œuf est de couleur blanc crème et de forme oblongue. Il fait en moyenne 1,02 ± 0,25 mm de longueur et 0,45 ± 0,14 mm de largeur. La partie postérieure de l'œuf est arrondie tandis que la partie antérieure est un peu pointue. La surface dorsale de l'œuf est légèrement convexe tandis que l'aspect ventral est aplati. Ces observations sont presque en accord avec des rapports antérieurs de chercheurs sur *Exorista bombycis* (Datta et Mukherjee, 1978 ; Kumar, 1987 ; Siddappaji, 1985 ; Kumar et coll., 1993) et sur *B. zebina* (Singh et coll., 1993). Un opercule circulaire est présent sur le côté dorsal, qui est situé sub-terminalement près de l'extrémité antérieure et fait un diamètre de 0,14 mm environ. La présence d'un opercule confirme les observations de Siddappaji (1985) chez *E. bombycis*.

La coque externe est dotée d'une petite structure ressemblant à des poils, qui est légèrement plus grosse aux deux extrémités de l'œuf. Une couche mucilagineuse collante est présente tout autour de l'œuf (Fig. 1). C'est la première fois que ces observations ont été faites. Dans cette étude, on a trouvé que l'œuf est recouvert par une membrane transparente et grâce à cela, l'étude de l'embryogenèse dans l'œuf vivant est possible. Au contraire, Siddappaji (1985) a signalé que l'œuf de *E. bombycis* est recouvert par une membrane opaque. Les stades de croissance des œufs uzi à 24 ± 1° C et 60 ± 5 % d'HR sont présentés dans le Tableau I.

Un œuf fraîchement pondu est constitué de globules de vitellus dispersés dans un réseau cytoplasmique. A la périphérie, il y a une bordure cytoplasmique dépourvue de vitellus, que l'on désigne couramment comme le périplasma ou le cortex. A l'extrémité postérieure de l'œuf, le périplasma est épais et contient un matériau granuleux. Il est connu sous le nom d'oosome (Fig. 1). Pendant environ 6 h après la ponte, l'œuf présente une apparence presque similaire et ceci est considéré comme la première étape du développement.

On ne peut pas voir les divisions nucléaires et la migration des noyaux de segmentation dans les œufs vivants. Les noyaux de segmentation deviennent visibles à la périphérie du jaune alors que la blastula se forme. Bien que le blastoderme couvre la surface entière du vitellus, il est clairement visible seulement aux extrémités où la lumière brille au travers de la couche la plus mince. Plus tard, il y a une séparation progressive des éléments cellulaires et du cytoplasme du vitellus et on observe une augmentation en profondeur du périplasma, qui culmine par l'établissement d'une large couche extérieure de cytoplasme et du noyau central du vitellus. Après environ 9h, la bande des noyaux de

segmentation est clairement visible dans l'œuf (Fig. 2). Les rides qui se produisent dans le blastoderme sur le côté dorsal de l'œuf représentent le début précoce de la bandelette germinative (Fig. 3). Les changements dans les embryons de la mouche uzi observés pendant le développement précoce ressemblent à ceux d'*Exorista sorbillans* (Kumar et coll., 1993).

Pendant la troisième étape (24-39 h), on peut voir des lobes clairs dans l'embryon de 30 h (Fig. 4). Pendant le 4^{ème} stade (39-60 h), à 42 heures, l'embryon occupe la plupart de l'espace dans l'œuf et pour la première fois, la segmentation du corps est visible (Fig. 5). Ces segments corporels deviennent plus clairs après 57 h de développement embryonnaire (Fig. 6).

Après 60 h de développement, on voit une forme larvaire reconnaissable entre 63-65 h et on peut détecter pour la première fois des mouvements légers de l'embryon. A 66 h, on voit un crochet labial clairement visible et le système trachéen est présent sous forme rudimentaire. A ce stade, des mouvements vigoureux de l'embryon peuvent être vus qui continuent jusqu'à l'éclosion.

A environ, 69 à 70 h, la larve est pleinement formée avec un système trachéen bien développé (Fig. 7) et elle est prête à l'éclosion. La période d'incubation dure environ 72 h à une température de 24 ± 1 °C et une humidité de 60 ± 5 %. Pendant l'éclosion, la partie antérieure de l'asticot sort la première par l'opercule (Fig. 8), suivie par le reste du corps. Cette observation est en accord avec celle de Clausen (1940) qui a aussi signalé que l'éclosion chez les espèces de tachinaires attaquant les chenilles, c'est à dire chez *Phorocera*, *Erhestica*, *Winthemia* etc., se produit avec le soulèvement d'un couvercle définitif ou d'un opercule. On peut observer que les changements qui se produisent chez *B. zebina* pendant le développement précoce ressemblent à ceux de *Culex tarsalis* (Rosay, 1959). L'asticot prend environ 20 à 25 minutes pour émerger complètement de la coquille.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	313
General sericulture	
Mûrier	315
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	319
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	327
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	329
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	333
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	337
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	339
Silkworms: silk glands	
Soie	341
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

Bangladesh silk industry.

2001 Indian Silk, Vol. 40(2), 23.(E)

Sensitization to silk and childhood asthma in rural China.

CELEDON J.C., *et al.*

Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's hospital, Boston, Massachusetts.

2001 Pediatrics, Vol. 107(5), E80. (E)

Prospects of sericulture in west Godavari district of Andhra pradesh.

CHOWDARY N.B., SREEKUMAR S., SUBBUSWAMY M.R.

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(2), 13-14.(E)

The strategy for the development of bio-ressources utilizing sericultural products and insects.

CHU LEE W., KIM I.

Department of Sericulture and Entomology, R.D.A., Suwon 441-100 Korea.

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 95-102. (E)

Recent breakthroughs in sericultural technology in India to match the requirement of silk industry in tropics.

DATTA R.K.

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

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 79-86. (E)

Break-through in multivoltine breeding for silk quality improvement.

DATTA R.K., *et al.*

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(3), 5-6. (E)

Risk and uncertainty in sericulture.

KUMARESAN P., VIJAYAPRAKASH N.B.

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(2), 21-22.(E)

Price spread in silk industry - an economic analysis.

MATTIGATTI R., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 163-164.(E)

Sericulture extension - challenges ahead.

NARAYAN ROY T., PANDIT D., GHOSH S.

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(1), 13-15.(E)

Bivoltin sericulture in Tamil Nadu.

RAMASWAMY L.S., GNANASEKARAN R., THIAGARAJAN V.

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(1), 7-8.(E)

Institutional credit to sericulture - a pulse reading.

RAMESHA K., SUBRAMANYA H.S., SUKUMAR MENON K., RANJAN P.

National Institute of Bank Management, Pune and Academy for Development, ADITI,
Bangalore, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(1), 16-22.(e)

Assesment of factors influencing the productivity of commercial mulberry silkworm rearing at farmers level - A case study in Andhra Pradesh.

SHANKAR RAO K.V., GIRIDHAR K.

Regional Tasar Research Station, Jagdalpur 494005, Madhya Pradesh, India.

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 1-9. (E)

Potential of oak tasar in North-Western himalayas.

SHARMA K.R.

Regional Office, CSB, New Delhi, India;

2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 26-28. (E)

Some observations on chinese sericulture.

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

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

2000 Bulletin of Indan Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 93-98.(E)

Present situations and future prospects of sericulture in China.

YIREN L.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sc.,
Zhenjiang 212018, Jiangsu Province, P.R. China

2000 International Journal of Industrial, Vol. 1(2), 87-90.(E)

Mûrier

Mulberry

Effect of fertilizing on yield of mulberry tree leaves during the autumn.

ALEXANDROV A., SAHARIEVA K., GREKOV D.

High Institute of Agriculture - Plovdiv, Bulgaria.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 111-114.(B,e)

Studies on the seasonal incidence of the whitefly (*Dialeuropora decempuncta* Quaintance and Baker) causing leaf curl on mulberry in relation to abiotic factors.

BANDYOPADHYAY U.K., et al.

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

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(1), 65-71. (E)

Yield loss in mulberry due to sucking pest whitefly, *Dialeuropora decempuncta* Quaintance and Baker (Homoptera : aleyrodidae).

BANDYOPADHYAY U.K., SANTHA KUMAR M.V., DAS K.K., SARATCHANDRA B.

Entomology Division, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742101 West Bengal, India.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 75-78. (E)

Prevalence and occurrence of major mulberry diseases and pests in Darjeeling and Sikkim hills.

BISWAS S., DAS S.K., DAS D.

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, West Bengal, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(3), 7-10. (E)

Effect of different plant densities and nitrogen levels on viswa (DD), S-36 and M-5 mulberry (*Morus indica* L.) varieties under irrigated condition.

BONGALE U.D., NARAYAANA GOWDA S.N., VEERESH M.

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 103-107. (E)

Evaluation of mulberry varieties for coastal saline soils in West Bengal.

CHAKRABORTY S.P., et al.

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

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 41-45.(E)

Breeding of a fruit mulberry variety "hongguo 1".

CHAO S., *et al.*

Research Institute of Sericulture and Silk, Shaanxi Academy of Agricultural Sciences, Zhouzhi 710400 China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 27(1), 59-60. (C,e)

Influence of sewage water irrigation on soil and plant microflora of mulberry (*Morus alba* L.).

GOWDA A., *et al.*

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

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 34(4), 297-301.(E)

Experiment on Techniques of soil moisture preservation in the mulberry field of limestone hill.

JIHUA Y., WEIGUO L., WEI G.

College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018 China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 27(1), 61-65. (C,e)

Variation of mineral composition in the regional, and seasonal mulberry leaves.

KIM I., *et al.*

Department of Sericulture & Entomology, National Instit of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100 Korea

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 2(1), 27-35.(E)

Role of organic manure on growth and quality of mulberry leaf and cocoons.

KRISHNA M., BONGALE U.D.

KSSR & DI, Thalaghattapura, Bangalore 560 68, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(2), 11-12.(E)

A new leaf blight disease on mulberry, caused by *Helminthosporium tetramera* MC kinney.

LATHA J., *et al.*

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

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 172-173.(E)

***Apanteles bisulcata* Cam.(hymenoptera : braconidae), a new parasitoid of the leaf roller of mulberry.**

MARIMADAIAN B., GEETHA BAI M.

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

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 178-179.(E)

Mycorrhiza association in mulberry.

PADMA S.D., SUKUMAR J., NAGENDRA KUMAR T.D.

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

2000 *Bulletin of Indian Academy of Sericulture*, Vol. 4(2), 18-26.(E)

Study on the productivity and initial rooting ability of mulberry varieties introduced in Bulgaria from Ukraina.

PETKOV Z., *et al.*

Experimental Station of Sericulture, Vratsa, Bulgaria.

2000 *Agricultural Science*, Vol. 38(2), 40-50.(B,e)

The crystals of a mannose-specific jacalin-related lectin from *Morus nigra* are merohedrally twinned.

RABIJNS A., *et al.*

Laboratorium voo Analytische Chemie en Medicinale Fysicochemie, Van Evenstraat 4, B-3000 Leven, Belgium.

2001 *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, Vol. 57(4), 609-611.(E)

Role of potassium in mulberry.

RAMAKANT, *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, West Bengal, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(3), 11-12. (E)

Some aspects of senescence in the foliage of mulberry (*Morus alba* L.).

SANGEETHA N., RAMARETHINAM S.

Research and Development Centre, The United Nilgiri Tea Estates Co. Ltd., Coimbatore - 641018, India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 97-102. (E)

A survey on the occurrence of bacterial blight disease complex in mulberry.

SHARMA D.D., *et al.*

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

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 113-116.(E)

Nitrogen uptake and shoot yield in three improved varieties of mulberry (*Morus indica* L.) under irrigated field cultivation.

SHIVAPRAKASH R.M., *et al.*

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 068, India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 145-148.(E)

Developmental process of mulberry idioblast relation to calcium deposition.

SUGIMURA Y., UEMURA I., FURUSAWA T.

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo, Kyoto 606-8585, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(1), 63-68.(E)

Leaf quality evaluation of mulberry (*Morus* spp.) genotypes through chemical analysis.

SUJATHAMMA P. & DANDIN S.B.

Department of Sericulture, S.P. Mahila Visvavidyalayam, Tirupati - 517 502, India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 117-121.(E)

Studies on the identification of suitable mulberry genotypes for block plantation under dry farming.

SUSHEELAMMA B.N., *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Chamarajanagara - 571 323, India.

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 34(4), 330-334. (E)

Breeding behaviour of some wild mulberry.

TIKADAR A., DANDIN S.B.

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(1), 9-10.(E)

Pollen morphology studies in mulberry (Morus spp.).

TIKADER A., ANANDA RAO A., MUKHERJEE P.

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur - 635 109, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 160-162.(E)

Plant regeneration from leaf explants of mulberry : influence of sugar, genotype and 6-benzyladenine.

VIJAYAN K., CHAKRABORTI SP., ROY BN.

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

2000 Indian J. Exp.Biol., Vol. 38(5), 504-508.(E)

Agronomic characteristics of new mulberry cultivars - Comparison of new mulberry cultivars Norin N 10_N 16, at 15 locations.

YAMANOUCHI H., *et al.*

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

2001 Bulletin of the National Institute of Sericultural and Entomological Science, Vol. 23, 1-104. (J,e)

The effect of cold treatment on pupation and emergence of the mulberry longicorn beetle, Apriona germari hope.

YOON H.J., MACH Y.II., MOON J. Y.

Dep of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korean.

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol.1(2),161-193.(E)

Effects of rearing temperature and photoperiod on the larval development of the mulberry longicorn beetle, Apriona germari Hope, on an artificial diet.

YOUN H. J., MACH Y.II., MOON J. Y.

Dep of Sericulture and Entomology, National Inst of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, 441-100, Korea.

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 137-141.(E)

Research progress on the identification techniques of disease resistance for mulberry yellow dwarf.

ZHENYU L., *et al.*

Shandong Agriculture University, Taiwan 271018, China.

2000 Bulletin of Sericulture, Vol. 31(1), 10-12.(C,e)

Report on breeding a new mulberry variety, Sheng tong-1.

Rapport sur l'obtention d'une nouvelle variété de mûrier, Sheng tong-1.

ZHIYI Y., *et al.*

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

2000 Bulletin of Sericulture, Vol. 31(1), 13-14.(C,e)

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

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

Study on some lines silkworm *Bombyx mori* L. in connection with their use in the breeding.
ARNAUDOVA K.

High School "Agricultural College" in High Agricultural Institute - Plovdiv, Bulgaria.
2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(1), 44-47.(B,e)

Study on combining ability of line Plovdiv 14 of silkworm (*Bombyx mori* L.).

ARNAUDOVA K.
Agricultural College - Plovdiv, Bulgaria.
2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 103-106.(B,e)

Leaf quality of mulberry (*Morus indica* L.) and cocoon crops of the silkworm (*Bombyx mori* L.) as influenced by sewage and borewell water irrigation.

BONGALE U.D., KRISHMA M.
Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 062, India.
2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 165-168.(E)

NTP binding protein of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus.

BOXIONG Z.
Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029 China.
2001 Acta Sericologica sinica, Vol.27(1), 38-42. (C,e)

Breeding of summer-autumn rearing fluoride enduring silkworm variety lu Ping X Qing Guang and improvement of guang's endurance to fluoride.

CHANGQI L., *et al.*
The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018 China.
2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 24-28. (C,e)

Combining ability studies in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

CHAUCHAN T.P.S., LAKSHAMANAN V., RAJALAKSHMI E.
Regional Sericultural Research Station, Sahaspur - 248-197, Dehradun, India.
2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 127-130(E)

CSR18 x CSR19 - a robust bivoltine hybrid for all season rearing.

DATTA R.K., *et al.*
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Sirampura, Mysore 570008, India.
2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 5-7. (E)

Breeding of complete sex-limited marking silworm variety Dong.Ting XBi.Bo for summer-autumn rearing.

DINGGUO G., *et al.*

The Sericultural Research Institute of Human Province, Lixian 415500 China.

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 29-33. (C,e)

Effect of potassium nitrate supplementation on economic parameters of the silkworm *Bombyx mori* L.

GOUDAR S., KALIWAL B.B.

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

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(1), 47-52. (E)

Investigation on chemical and the amino acid composition of different dried silkworm pupae meal.

GREKOV D., KIPRIOTIS E.

Higher Institute of Agriculture- Plovdiv, Bulgaria.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 107-110. (B,e)

Loose egg incubation frame for improvement in hatching.

HIMANTHARAJ M.T., *et al.*

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

2001 Indian Silk, Vol. 40(1), 5-6.(E)

Influence of hybridization approaches and schemes on heterosis, depression, and levels of dominance in between breed crosses in silk butterfly (*Bombyx mori* L.). II. Cocoon weight and cocoon shell weight.

IGNATOVA L., PETKOV N., NACHEVA J.

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgarie.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(1), 48-58.(B,e)

Influence of hybridization approaches and schemes on heterosis, depression, and levels of dominance in between breed crosses in silk butterfly (*Bombyx mori* L.).IV. Number of normal eggs in one batch.

IGNATOVA L., PETKOV N., NACHEVA J.

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgarie.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(2), 74-79.(B,e)

Influence of hybridization approaches and schemes on heterosis, depression, and levels of dominance in between breed crosses in silk butterfly (*Bombyx mori* L.).III. Length of silk filament.

IGNATOVA L., PETKOV N., NACHEVA J.

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgarie.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(2), 67-72. (B,e)

Characterization of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection in cell lines from *Bombyx mori*.

IKEDA M., *et al.*

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(1), 49-58.(E)

Analysis of the prevalence of the pebrine disease of the silkworm with the methods of key years.
JIPING L., GUOQUAN Z., XINGYAO X.
Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642 China.
2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 55-58. (C,e)

Breeding of a new silkworm variety, chunsujam, with a high silk yield in spring rearing season.
KANG P.D., *et al.*
Dept. of Sericulture and Entomology National Inst. of Agricultural Science and Tecnology, RDA,
Suwon 441-100, Korea.
2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 65-68. (E)

Study on some Bulgarian silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) in conditions of Greece.
KEPRIOTIS E.
Agricultural Experimental Station - Komotini, Greece.
2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(3), 65-68.(B,e)

Characterization of crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* NT0423 isolate from Korean sericultural farms.
KIM H. S., LI L.S., ROH J.Y.
Lab. of Insect Pathology and Genetic Engineering, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.
2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 115-122. (E)

Some nutritional studies on some Bulgarian silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids reared in Northern Greece.
KIPRIOTIS E., GREKOV D.
National Agricultural Research Foundation, Agricultural Research Station, Komtini 69100, Greece.
2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 155-159.(E)

A preliminary report on intensifying silkworm (*Bombyx mori* L.) efficiency by rearing directly on mulberry plantation under plastic shed.
KIPRIOTIS E., GREKOV D., BAO L.C.
National Agricultural Research Foundation, Agricultural Research Station of Komotinini - Komotini, Greece.
2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 69-72.(E,b)

Gravimetrics of pupal weight loss in the domestic silkworm, *Bombyx mori* Linn. (Lepidoptera : Bombycidae).
KUMAR V., KARIAPPA B. K., CHATURVEDI H. K., SARKAR A., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore -570008, Karnataka, India.
2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(1), 25-28. (E)

Studies on economics of bivoltine versus cross-breed cocoon production in K.R. nagar taluk of Mysore district.
LAKSHMANAN S., GEETHA DEVI R.G., SUMA N.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 008, India.
2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 149-151.(E)

Effects of photoperiods on the growth of entomopathogenic fungi, *Paecilomyces japonica*, during the production of the silkworm-dongchunghacho, silkworm vegetable wasp and plant worm.
LEE E. H., *et al.*
Department of Sericultural and Entomological Biology, Miryang National University,
miryang 627-130, Korea.
2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 83-86. (E)

Evaluation of improved mulberry genotypes for production of leaf suitable for young age silkworm rearing, with annual 12 leaf harvest schedule.

MALLIKARJUNAPPA R.S., *et al.*

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 122-126.(E)

Performance of bivoltine X multivoltine cross breeds of silkworm for cocoon and silk traits.

NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R., ANANTHANARAYANA S.R.

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 169-171.(E)

Evaluation of bivoltine x multivoltine hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. through combining ability for cocoon yield and silk technological traits.

NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R., ANANTHANARAYANA S.R., RAMESH S.

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

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 62-74.(E)

Evaluation of two promising hybrids Viz., HSP1 (A3 X 935E) and HSP2 (A3 X 916B) in the silkworm *Bombyx mori* L.

NASEEMA BEGUM A., *et al.*

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

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 103-109. (E)

Automatic artificial diet feeding system for rearing silkworm, *Bombyx mori*.

OHURA M., ZAN LI M.

Laboratory of Mass Production System, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericulture, Vol. 70(1), 59-62.(E)

Effect of low doses gamma ray irradiation during post-embryonic stage of *Bombyx mori* L. on the phenotypic expression of basic quantitative traits.

PANAIOTOV M.

Tracian University - Stara Zagora, Bulgarie.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(1), 59-63.(B,e)

Silkworm faecal pellet examination as diagnostic method for detecting pebrine.

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

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

2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 11-12. (e)

Improvement of initial lines of silkworm hybrid hebar 1/18X hebar 2/1, directed for practical use in summer-autumn feeding. I. Average values and variability of quantitative selection traits.

PETKOV K., NACHEVA I., TSENOV P., GREKOV D.

Sericulture Research Station - Vratsa, Bulgaria.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 89-93.(B,e)

On the problem of transgressions in some production traits of silkworms (*Bombyx mori* L.)

PETKOV N., *et al.*

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgaria.

2000 Agricultural Science, Vol. 38(2), 51-52. (B,e)

Assesment of combining ability of prospective Bulgarian and Ukrainian silkworm breeds (*Bombyx mori* L.) by the method of diallel analysis.

PETKOV N., *et al.*

Sericulture Research Station - Vratsa, Bulgarie

2000 Journal of animal Science, Vol. 37(4), 79-83.(B,e)

Studies on the degree of genetic divergence for different quantitative traits between parental lines of silkworm, *Bombyx mori* L., hybrids.

PETKOV N., GREKOV D., RAMNALI P.

Sericultural Experiment Station, Vratza 3000, Bulgaria.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 79-81.(E)

Studies on reproductive traits of simple (DI-) and complex (three and tetra-) hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.)

PETKOV N., IGNOTAVA L., NACHEVA I., TSENOV P.

Sericulture Reserch Station - Vratsa, Bulgaria.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 84-88.(B,e)

Improvement of initial lines of silkworm hybrid hebar 1/18X hebar 2/1, directed for practical use in summer-autumn feeding. II. Correlations and inheritance of quantitative selection traits.

PETKOV N., NACHEVA I., TSENOV P., GREKOV D.

High Institute of Agriculture - Vratsa, Bulgaria.

2000 Journal of Animal Science, Vol. 37(4), 94-97.(B,e)

The problem of selecting breeds genetically labelled by sex in the egg and larval stages of the silkworm (*Bombyx mori* L.).

PETKOV N., NACHEVA Y., TZENOV P.

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgaria

2000 Agricultural Science, Vol. 38(4), 43-45.(B,e)

Schemes for industrial hybridization in developing tetrahybrids of the silkworm.

PRETKOV N., *et al.*

Experimental Station of silkworm breeding - Vratsa, Bulgaria.

2000 Agricultural Science, Vol. 38(1), 41-43.(B,e)

Effect of ethion on water and utilization in silkworm, *Bombyx mori* L.

RADHAKRISHMA P.G., DELVI M.R., SHIVAKUMAR C.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore - 560 056, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 180-182.(E)

Effect of fortification of mulberry leaf with lactalbumin hydrolysate and MM insect cell culture medium on silkworm, *Bombyx mori* L.

RAI M.M., RATHOD M.K., KLURAD A.M.

Centre for Sericulture and Biological Pest Management Research, Nagpur University, Nagpur 440022, Maharastra, India.

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 27-33.(E)

Innovative low cost uzi trap.

RAJA GOPAL REDDY C., RAJASLKHAR REDDY P.

Department of Sericulture, Government of Andhra, Ananthapur, India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 8.(E)

Effect of temperature and relative humidity on spinning behaviour of silkworm (*Bombyx mori* L.).

RAMACHANDRA YL., BALI G., RAI SP.

Department of Life Science, Kuvempu University, Jnanasahyadri, Shimoga 577451, India.

2001 *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 39(1), 87-89.(E)

Study on biological and technological values of basic characteristics of silkworm breeds (*Bombyx mori* L.) selected at high temperature and humidity.

RAMNALI P.H.

High Institute of Agriculture - Plovdiv, Bulgaria.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol. 37(4), 98-102.(B,e)

Expression of the cryIAc gene under the control of the native or the α -amylase promoters in an acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain.

ROH J.Y., *et al.*

Graduate School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 1(2), 123-129. (E)

Efficacy of two antibiotics against bacterial flacherie of silkworm, *Bombyx mori* L.

SRIDAR R., SUBRAMANIAN A., CHANDRAMOHAN N.

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore - 3,

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 176-177.(E)

Effect of feeding mulberry leaves fortified with protein supplements on the productivity of silkworm, *Bombyx mori* L.

SUNDAR RAJ S., CHINNASWAMY K.P., SANNAPPA B.

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore 560065, Karnataka, India.

2000 *Bulletin of Indian Academy of Sericulture*, Vol. 4(2), 34-40.(E)

Influence of Protein Supplements on Performance of PM x NB4 D2 silkworm breed.

SUNDAR RAJ S., *et al.*

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

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 34(4), 302-307. (E)

Study on heterosis and its components at silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) with participation of the tropical breed bonde 517.II. Traits that characterize the conversion of consumed quantity mulberry leaves.

TSENOV P., PETKOV N., NACHEVA J.

Experimental Station of Sericulture - Vratsa, Bulgaria.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol. 37(3), 69-73.(B,e)

Genetic factors affecting insecticidal crystal protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*.

WOO PARK H., FEDERICI B. A.

Department of Entomology, University of California Riverside, Riverside, California 92521 USA.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 1(1), 1-17.(E)

Effects of FBS and inactivated silkworm hemolymph on the development and multiplication of the *Nosema bombycis* in vitro.

YONGHUA Q., *et al.*

Research Institute of Sericulture and Silk of Shaanxi Province, Zhouzhi 710400 China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.27(1), 72-74. (C,e)

Progress in breeding of silkworm varieties with especially coarse or fine cocoon filament size.

YONGQIANG W., *et al.*

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

2000 Bulletin of Sericulture, Vol. 31(3), 9-12.(C,e)

The host range expanded hybrid *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

YONGZHU Y., *et al.*

Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture Zhenjiang 212018 China.

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 75-76. (C,e)

Artificial diet rearing for the silkworm II. Nutritive components of artificial diets.

YUNGEN M.

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

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 10-18.(E)

Brief reports on the miniature trial reeling machine.

ZUOZHONG H., ZEHONG S., ZHOU D.

The Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000 China.

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 77-79.(C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Promotion of muga silk under trips regime.

CHADHURI M., DAS P.K.

Muga Seed Development Project, Guwahati, India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 18-19. (E)

Eri : product diversification pays.

CHAOBA K., BENCHAMIN K.V.

Central Muga and Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh, Jorhat, Assam and Serified, Kerala, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(1), 11.(E)

Field trial of elite crosses of eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt.

DEBARAJ Y., et al.

RERS, Mendipathar, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(2), 15-16.(E)

Characterization of SSUrRNA sequence of a new microsporidium *Nosema* sp.(nosematidae : microsporidia), isolated from *Antheraea mylitta* Drury (lepidoptera : saturnidae) in India.

HATAKEYAMA Y., et al.

The College of Bioresource Sciences, Nihon University, Japan.

2000 Indian Journal of Sericultural, Vol. 39(2), 131-134.(E)

Construction and characterization of transformed insect cells expressing baculovirus very late factor in an infection - independent manner.

PARK H. J., et al.

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714 Korea.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 19-26. (E)

Characterization of cypovirus isolates from tropical and temperate Indian saturniidae silkworms.

QANUNGO KR., KUNDU SC., GHOSH AK.

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, Kharagpur 721302, India.

2000 Acta. Virol., Vol. 44(6), 349-357. (E)

Progressive embryonic development of the eri silkworm *Samia ricini* Donovan (1798).

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

Dep. of Sericulture, College of Agriculture, University of Agricultural Science, Bangalore 560085, Karnataka, India.

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 75-83.(E)

Role of mycorrhiza and secondary phytobiomass in ericulture.

SHARMA S., *et al.*

Centre for Rural Development and Technology, Indian Institute of Technology,
New Delhi - 110 016, India.

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 152-159.(E)

TQM in tasar reeling - a check list.

SHIVAKUMAR M.

Post-cocoon Technology, Nippon Koei Company Ltd., Consultancy Team for MP Sericulture Project,
Bilaspur, India.

2001 Indian Sillk, Vol. 39(12), 16-17. (E)

Nutritional content of healthy and diseased leaves of castor and papaya, the food plants of the eri silkmoth *Samia ricini* Donovan.

SHREE M.P., CHANDRA M., RAVI KUMAR K.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560056, Karnataka, India.

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 89-90.(E)

Post-infectional biochemical changes in the leaves of tasar food plants.

SHREE M.P., SURESH BABU V.S., CHANDRA M., RAVI KUMAR K.

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

2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 108-112.(E)

Study on the correlation between food efficiency and the physical and chemical characters of tussah gut fluid.

XIANMIN M., DEFU J.

Sericultural Research Institute of Liaoning Province, Fengcheng 118100 China.

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 80-82. (C,e)

Genetic variability of rooting and its contributing characters in Som, *Machilus bombycina* King (Laurales : Lauraceae).

YADAV G.S., RAJARAM, DEVNATH M., SENGUPTA A.K.

Central Tasar Research & Tr. Institute, Central Silk Board, Hatgamharia
833 214, West Singhbhum, Bihar, India.

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol. 4(2), 50-56.(E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Two novel pao-like retrotransposons (kamikaze and yamato) from the silkworm species *Bombyx mori* and *B. mandarina* : common structural features of pao-like elements.

ABE H., *et al.*

Dep. of Biological Production, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Japan.

2001 *Mol. Genet. Genomics*, Vol.265(2),375-385. (E)

Preliminary Research on the genetics of Sichuan wild wing spot-A mutant in silkworm.

FANGYING D., CHENG L., ZHONGHUI X.

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University Chongqing 400716 China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.27(1),66-67. (C,e)

Studies on the light-stained G-band chromosomes of mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina* Moore) in China.

FANGZHOU S., PING'AN C., YUNQIANG L.

College of Sericulture and Silk Southwest Agricultural University, Chongqing 400716 China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.27(1),6-10. (C,e)

Nucleotide sequence of genome segment 5 from *Bombyx mori* cypovirus 1.

HAGIWARA K., KOBAYASHI J., TOMITA M., YOSHIMURA T.

Venture Laboratory, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan.

2001 *Arch. Virol.*, Vol.146(1), 181-187. (E)

Construction of a novel baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus producing the fluorescent polyhedra.

HO JE Y., *et al.*

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-100, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(1), 19-23. (E)

Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4.

IKEDA K., *et al.*

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan.

2001 *Journal of Virology*, Vol.75(2),988-995.(E)

Construction of the silkworm, *Bombyx mori*, with a green fluorescence by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

JIN B.R., *et al.*

College of natural Ressources and Life Sciences, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(2),149-153.(E)

Genetic homogeneity in the domestic silkworm, *Bombyx mori*, phylogenetic relationship between *B. mori* and the wild silkworm, *B. mandarina* using mitochondrial COI gene sequences.

KIM I., *et al.*

College of Natural Ressources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(1),9-17. (E)

Cloning, sequencing and characterization of mitochondrial control region of the domestic silkworm, *Bombyx mori*.

LEE J. S., *et al.*

CoreBio Research Institute of Lifescience and Biotechnology, CoreBio System Co., Ltd., Seoul 150-073, Korea.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(1), 87-89. (E)

Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells.

OKANO K., SHIMADA T., MAEDA S.

laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, Wako, Saitama, Japan.

2001 *Virology*, Vol.282(2),348-356.(E)

Molecular cloning and characterization of very late expression factor 1 gene, vlf-1 from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus K1.

PARK H. J., *et al.*

College of Natural Ressources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(1),29-33. (E)

***Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells.**

PIJLMAN GP., VAN DEN BORN E., MARTENS DE., VLAK JM.

Laboratory of Virology, Wageningen, The Netherlands.

2001 *Virology*, Vol.283(1),132-138.(E)

The research of gene sch effects on healthiness and cocoon weight of the silkworm.

PING C., YONG Z., CHENG L., ZHONGHUAI X.

College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol.27(1),11-15. (C,e)

Identification of highly transcribed genes in Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*, using PCR-based cDNA library.

SUNG LEE J., *et al.*

Dep of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Tech, RDA, Suwon 440-746, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(2),171-175.(E)

An element downstream of the transcription start site is required for activation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus bro-c promoter.

SUZUKI MG., KANG WK., MAEDA S.

Laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, wako, Japan.

2001 *Arch. Virol.*, Vol.146(3),495-506. (E)

An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm.

TAN YD., *et al.*

Lab. of Molecular and Statistical Genetics, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 41081, China

2001 *Genetics*, Vol.157(3),1277-1284.(E)

Cytogenetic analysis shows that the unusually large chromosome in the sex-limited pB silkworm (*Bombyx mori*) strain consists of three chromosomes.

TANAKA N., YOKOYAMA T., ABE H., TSUCHIDA K., NINAGI O., OSHIKI T.

Dept. of Biological Production, University of Agriculture and Technology, Saiwai-cho 3-5-8, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

2000 *Hereditas*, Vol.133(2),95-103.(E)

Structural analysis of gene encoding cuticle protein BMCP18, and characterization of its putative transcription factor in the silkworm, *Bombyx mori*.

TOGAWA T., *et al.*

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Minamiosawa, Hachioji-shi, 192-0397, Tokyo, Japan.

2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol.31(6-7),611-620.(E)

Expression of the gene encoding firefly luciferase using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus vector.

WOO S. D., *et al.*

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(1),53-58. (E)

Molecular cloning of the *Bombyx mori* ubiquitin homologue gene that is up-regulated upon infection.

YUN E. Y., *et al.*

Dep of Sericulture and Entomology, The National Inst of Agricultural Science and Tech, RDA, Suwon 441-100 Korea.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(1),61-64. (E)

Protein databank for several tissues derived from five instar of silkworm.

ZHONG BX.

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

2001 *Yi Chuan Xue Bao*, Vol.28(3),217-224. (E)

Role of interaction between two silkworm RecA homologus DNA pairing.

KUSAKABE T., KAWAGUCHI Y., MAEDA T., KOGA K.

Laboratory of Silkworm Sciences, Kyusyu Univ. Graduate School, Fukuoka, Japan.

2001 *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 388(1), 39-44. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Substituent-dependent, positive and negative modulation of *Bombyx mori* adenylyate cyclase biosynthetic octopamine/tyramine analogues.

AYOMA M., *et al.*

Department of Life Science and Biotechnology, Shimane University, Matsue, Shimane, Japan.

2001 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 47(1), 1-7.(E)

Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone binding proteins with a fluorescence binding assay.

CAMPANACCI V., *et al.*

Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Centre National de la Recherche Scientifique, 13402, Marseille, France.

2001 *J. Biol. Chem.*, March 27.

Multiple transport pathways for dibasic amino acids in the larval midgut of the silkworm *Bombyx mori*.

CASARTELLI M., *et al.*

Department of Biology, University of Milan, via Celoria 26, 20133, Milan, Italy.

2001 *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 31(6-7), 621-632.(E)

Influence of methoprene on *Bombyx mori*(L.).

CHANGAMMA C., RAJASEKHAR R., GOVINDAPPA S.

Division of Sericulture, Department of Zoology, S.V. University, Tirupati - 517 502, India.

2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 135-138.(E)

Adenylyate cyclase in prothoracic glands during the larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*.

CHEN C., GU S., CHOW Y.

Chung Hwa College of Medical Technology, 89 Wen-hwa 1st Road, Tainan County 717, Jen-Te Hsiang, Taiwan.

2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 31(6-7), 659-664.(E)

Action kinetics of a prothoracicostatic peptide from *Bombyx mori* and its possible signaling pathway.

DEDOS SG., NAGATA S., ITO J., TAKAMIYA M.

Department of Integrated Biosciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan.

2001 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 122(1), 98-108. (E)

The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori* : hormonal control, ovarian expression and functional properties.

EYSTATHIOY T., SWEVERS L., IATROU K.

Dep. of Biochem. and Molecular Biology, University of Calgary, 3330 Hospital Drive N.W., T2N 4N1, Calgary, AB, Canada.

2001 *Mech. Dev.*, Vol. 103(1-2), 107-115. (E)

Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.

FUJIMOTO S., et al.

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tottori University, 680-8553, Tottori, Japan.

2001 *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 128(4), 709-718. (E)

Effect of hydrocortisone on the economic parameters of the domestic silkworm, *Bombyx mori* L.

GOUDAR K. S., KALI WAL B.B.

Post Graduate Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwad-580003, India.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 1(1), 41-45. (E)

Effect of methyl testosterone on the economic parameters of the silkworm, *Bombyx mori* L.

GOUDAR K. S., KALI WAL B.B.

Post graduate Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwad - 580003, India.

2000 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.1(1), 35-40. (E)

Effect of Androstenedione on the economic parameters of the silkworm, *Bombyx mori*.

GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.

Post-graduate Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwad 580003, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 2(1), 69-74. (E)

Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*.

HUANG Q., DEVERAUX Q.L., MAEDA S., STENNICKE H.R., HAMMOCK B.D., REED J.C.

Department of Entomology, University of California, Davis 95616, USA.

2001 *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1499(3), 191-198. (E)

Is glycogen essential for silkworm embryonic diapause ?

JAYASWAL K.P.

Central Sericulture Research and Training Institute, Mananadavadi Road, Sirampura, Mysore 570008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 39(12), 9-10. (E)

The wings of *Bombyx mori* develop from larval discs exhibiting an early differentiated state : a preliminary report.

KANGO -SINGH M., SINGH A., GOPINATHAN K.P.

Department of Microbiology and Cells Biology, Indian Institute of Science, Bangalore 560012, India.

2001 *J. Biosci.*, Vol. 26(2), 167-177. (E)

Significance of peristaltic squeezing of sperm bundles in the silkworm, *Bombyx mori* : elimination of irregular eupyrene sperm nuclei of the triploid.

KAWAMURA N., YAMASHIKI N., SAITOH H., SAHARA K.

Biology Laboratory, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan.

2001 *Zygote*, Vol. 9(2), 159-166. (E)

Peristaltic squeezing of sperm bundles at the late stage of spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*.

KAWAMURA N., YAMASHIKI N., SAITOH H., SAHARA K.
Biological Laboratory, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan.
2000 J. Morphol., Vol. 246(2), 53-58.(E)

Cocoon spinning behavior in the silkworm, *Bombyx mori* : comparison of three strains constructing different cocoons in shape.

KIYOSAWA M., *et al.*
Department of Applied Biology, Faculty of Textile Sc. Tech. Shinshu University, Ueda, Nagano 386-8567, Japan.
1999 Zoological Science, Vol. 16, 215-223.(E)

Biochemical properties of acetylcholinesterase from the larval head of *Bombyx mori*.

LEE H.J., *et al.*
School of Biological Resources and Material Engineering, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.
2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(1), 73-78. (E)

Modulation of leucine absorption in the larval midgut of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

LEONARDI MG., *et al.*
Dipartimento di Biologia, Università di Milano, via Celoria 26, 20133, Milano, Italy.
2001 Comp. Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol., Vol. 129(2-3), 665-6672.

Haemolymph proteins of F1 progeny raised from ethyl methanesulfonate treated silkworm *Bombyx mori* L.

MAHESHA H.B., THEJASWINI P.H., HONNAIAH S.
Department of Studies in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, India.
2000 Indian Journal of Sericulture, Vol. 39(2), 139-144.(E)

Characterization of acyl-CoA binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*.

MATSUMOTO S., *et al.*
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa 2-1, Wako-shi, 351-0198, Saitam, Japan.
2001 Insect Biochem. Mol.Biol., Vol 31(6-7), 603-609.(E)

Effects of juvenile hormone on the secretion of prothoracicotropic hormone in the last - and penultimate instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*.

MIZOGUCHI A.
Division of Bbiological Science, Nagoya University, furao-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan.
2001 J. Insect Physiol., Vol. 47(7), 767-775. (E)

Detection of removal of an artefact fatty acid from the binding site of recombinant *Bombyx mori* pheromone- binding protein.

OLDHAM NJ., KRIEGER J., BREER H., SVATOS A.
Max-Planck-Institute for Chemical Ecology, Carl-Zeiss-Promenade 10, D-07745 Jena, Germany.
2001 Chem. Senses, Vol. 26(5), 529-531 (E)

Role of cephalic appendages in spinning behaviour of silkworm (*Bombyx mori* L.) larvae.
 RAMACHANDRA Y.L., BALI G., PADMALATHA RAIS.
 Department of Zoology, Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore - 560 056, India.
 2000 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 39(2), 174-175.(E)

Moulting mechanism in silkworm.
 RAO C.G.P., CHANDRASHEKARAIAH
 APSSRDI, Kirikera, Hindupur (AP), India.
 2001 *Indian Silk*, Vol. 40(3), 13-15. (E)

Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus*.
 ROGERS ME., STEINBRECHT RA., VOGT RG.
 Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, SC 29208, USA.
 2001 *Cell Tissue Res.*, Vol. 303(3), 433-446.(E)

Isolation and characterization of a human alternative complement pathway-inhibiting protein from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.
 SEKIJIMA Y., *et al.*
 Department of Immunology, Saitama Prefectural University Junior College,
 343-8540, Koshigaya, Japan.
 2001 *Dev. Comp. Immunol.*, Vol. 25(2), 89-100.(E)

Synthesis and resorption of a humoral chymotrypsin inhibitor, CI-8, by fat body of the silkworm, *Bombyx mori*.
 SHIRAI K., FUJII H., DOIRA H., IWAMOTO H.
 Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hokazaki,
 Fukuoka 812-8581, Japan.
 2000 *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 30, 363-368.(E)

Identification of nonviral infection-specific polypeptides in midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with B. moridensovirus type 2.
 SOTOSHIRO H., *et al.*
 Laboratory of Sericulture and Entomoresources, Nagoya University, Chikusa,
 Nagoya 464-8601, Japan.
 2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(1), 39-48.(E)

Radiosurgery by heavy ion beams for biological study of the silkworm, *Bombyx mori*.
 TU ZL., *et al.*
 Shinshu University, Ueda 3-15-1, Nagano 386-8567, Japan.
 2000 *Proceedings, CISC.*, Vol. 4, 13-17.(E)

The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph : gene and functional analysis.
 VERMUNT A.M.W., KAMIMURA M., HIRAI M., KIUCHI M., SHIOTSUKI T.
 National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.
 2001 *Insect Molecular Biology*, Vol. 10(2), 147-154.(E)

Effects of vitamin B6 on nitrogen metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*.
 YUSONG X., JUNLIANG X.
 College of Animal Sciences, Zhejiang University Hangzhou 310029 China.
 2001 *Acta Sericologica Sinica*, Vol. 27(1), 34-37. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Production of the eggs with abnormal shape from the domestic silkworm, *Bombyx mori*, infected with *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*.

MONG LEE S., *et al.*

Department of Sericultural and Entomological Biology, Miryang National University, Miryang 627-130, Korea.

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(2), 111-114. (E)

Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs.

MORIBE Y., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

Lab. of Sericulture and Entomoresources, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Japan

2001 Eur. J. Biochem., Vol. 268(12), 3432-3442. (E)

Isolation and characterization of a *Bombyx* vasa - like gene.

NAKAO H.

Department of Insect Genetics and Breeding, 1-2 Oowashi, Tsukuba 305-8634, Japan.

1999 Dev. Genes Evol., Vol. 209(5), 312-316.(E)

***Antheraea yamamai* paralytic peptide induces egg diapause as well as larval paralysis in *Bombyx mori* : the primary sequence-activity correlations.**

SONG H.S., AN Y., YAMASHITA T., SUZUKI K.

Department of Agro-Bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8, Morioka 020-8550, Japan.

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(1), 33-38.(E)

Studies on the possibilities for obtaining ameiotic gynogenetic individuals in the silkworm (*Bombyx mori* L.)

VASILEVA Y., TSENOV P.

2000 Agricultural Science, Vol. 38(3), 42-43.(B)

Biochemical analysis of temperature-sensitive silkworm eggs under high temperature and low humidity incubation condition.

JIANRONG L., *et al.*

Departement of Sericulture and Fassion, Guangzhou 510642 China.

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 16-19. (C,e)

Studies on parthenogenesis of commercial silkworm races.

YONQIANG W., MENGKUI X., XIULING H., JIANGUO X.

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

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 20-23. (C,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Structure of *Bombyx mori* silk fibroin before spinning in solid state studied with wide angle x-ray scattering and (13)C cross-polarization/magic angle spinning NMR.

ASAKURA T., *et al.*

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184 Japan.

2001 Biopolymers., Vol. 58(5), 521-525.(E)

The distribution of H⁺ - translocating vacuolar - type ATPase in the middle silk gland of *Bombyx mori*.

AZUMA M., MIYAMOTO Y., AN Z.

Laboratory of Insect Biochemistry, Tottori University, Koyanna-cho, Tottori 4-101, Tottori 680-8553, Japan.

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(1), 25-32.(E)

A spider tRNA Ala requires a far upstream sequence element for expression.

CINTRON I., *et al.*

University of Puerto Rico, Department of Biology, PO Box 23360, UPR Station, San Juan, PR 00931-3360, Puerto Rico.

1999 Gene, Vol. 231, 195-201.(E)

Differential expression of the fibroin gene in developmental stages of silkworm, *Antheraea mylitta* (Saturniidae).

DATTA A., GHOSH AK., KUNDU SC.

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, 721302, Kharagpur, India.

2001 Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., Vol. 129(1), 197-204.(E)

Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences.

GATESY J., *et al.*

Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, WY82071, USA.

2001 Science, Vol. 291(5513), 2603-2605.(E)

Syntheses of glycine and L-serine by their interconversion in the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.

OSANAI M., OKUDAIRA M.

Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Japan.

2001 Amino Acids, Vol. 20(2), 113-121. (E)

Involvement of cathepsin B- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*.

SHIBA H., UCHIDA D., KOBAYASHI H., NATORI M.

Department of Applied Biological Science, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa, 252-8510, Japan.

2001 Arch. Biochem. Biophys., Vol. 390(1), 28-34. (E)

Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* are present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*.

TANAKA K., MIZUNO S.

Laboratory of Molecular Biology, Tohoku University, 1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, 981-8555, Sendai, Japan.

2001 Insect. Biochem. Mol. Biol., Vol. 31(6-7), 665-677. (E)

Soie

Silk

A repeated beta-turn structure in poly (Ala-Gly) as a model for silk I of *Bombyx mori* silk fibroin studied with two-dimensional spin diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance.

ASAKURA T., *et al.*

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Koganei, 184-8588, Japan.

2001 J. Mol. Biol., Vol. 306(2), 291-305.(E)

Conformation transition kinetics of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy.

CHEN X., *et al.*

Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai, PR China.

2001 Biophys. Chem., Vol. 89(1), 25-34.(E)

Studies on PVA/Chitosan/Fibroin blend sponge sheet : preparation and wound healing effects in rats.

HONG YEO J., *et al.*

Dep. of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea.

2000 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 1(1), 59-64. (E)

Effect of silk fibroin on the protection of alcoholic hepatotoxicity in the liver of alcohol preference mouse.

KANG G. D., *et al.*

School of Biological Resources and Materials Engineering, Seoul National University, Suwon 441-744 Korea.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 15-18. (E)

A comparison of silk fibroin hydrolisates by hydrochloric acid and proteolytic enzymes.

MADYAROV S.R., *et al.*

Inst of Phys and Biophysics, Academy of Sciences of Rep of Uzbekistan, 1, Nyazov street, Tashkent - 700095, Uzbekistan.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol. 2(1), 7-13. (E)

Relationship between wrinkles and reelability in the cocoon of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L.

MINGYING Y., LIANGJUN Z., YUNGEN M.

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

2000 Bulletin of Indian Academy of Sericulture, Vol 4(2), 57-61.(E)

Spider silk has an ice nucleation activity.

MURASE N., *et al.*

Dep. of Biotech., College of Sci. and Eng., Tokyo Denki University, Hatoyama, Hiki-gun, Saitama 350-0394, Japan.

2001 Naturwissenschaften, Vol. 88(3), 117-118. (E)

Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice.

SAZAKI M., KATO N., WATANABE H., YAMADA H.

Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan.

2000 Oncology Reports, Vol. 7, 1049-1052. (E)

Annato - a bright natural colour source for silk.

SHARADA DEVI A., SUMANTHY B.S., KATYAYINI V.K.L.T.

AICRP-CT, Postgraduate & Research Centre, Acharya N.G. Ranga Agricultural University, Hyderabad, India.

2001 Indian Silk, Vol. 39(12), 20-23. (E)

Physical and chemical characters and biocompatibility of crosslinked porous silk fibroin gel.

SIJIA M., SHUNLIN L.

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

2001 Acta Sericologica Sinica, Vol. 27(1), 43-48.(C,e)

Functionalized silk-based biomaterials for bone formation.

SOFIA S., MC CARTHY MB., GRONOWICZ G., KAPLAN DL.

Tufts University, Dept. of Chemical Engineering and Biotechnology Center, 4 Colby Street, Medford, Massachusetts 02155.

2001 J. Biomed. Mater. Res., Vol. 54(1), 139-148.(E)

Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silkprotein sericin.

TSUJIMOTO K., *et al.*

Technology Department, Seiren Co.Ltd., Keya, Fukui 918-8560, Japan.

2001 J. Biochem., Vol. 129(6), 979-986. (E)

Liquid crystalline spinning of spider silk.

VOLLRATH F., KNIGHT DP.

Zoology Department University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK

2001 Nature, Vol. 410(6828), 541-548. (E)

Silk fibroin : structural implication of a remarkable amino acid sequence.

ZHOU CZ., *et al.*

Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud et CNRS, Orsay Cedex, France.

2001 Proteins, Vol. 44(2), 119-122. (E)

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.

- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.