

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

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*)
J. E. MIRANDA (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Statistiques 2000 / Statistics 2000

Revues / Reviews

- Lepidopteran insects on mulberry 343**
 Les insectes lépidoptères du mûrier 367
 T. K. NARAYANASWAMY, R. SRINIVASAGOWDA
 & V. T. SANNAVEERAPPANAVAR

- Sericultural by-products for various valuable commercial products as emerging bio science industry 369**
 Emergence d'une bio-industrie des produits dérivés de la sériciculture 393
 B. K. SINGHAL, ANIL DHAR, ARADHANA SHARMA, S. M. H. QADRI & M. M. AHSAN

Articles scientifiques / Scientific papers

- Studies on RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, nsd-z, in the silkworm, *Bombyx mori* 409**
 Etudes sur les marqueurs RAPD liés au gène de non sensibilité à la denonucleose, nsd-z, chez le ver à soie, *Bombyx mori* 417
 LI MUWANG, YAO QIN, HOU CHENGXIANG, LU CHENG & CHEN KEPING

- Studies on the relationship of feeding habit, economic characters and physiological aspects of the silkworm, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf and artificial diet . . . 421**
 Etudes sur la relation entre le comportement alimentaire, les caractères économiques et les aspects physiologiques chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. nourri avec de la feuille de mûrier et de l'aliment artificiel 433
 CUI W.-Z., SHANG J.-Y. & WANG Y.-W.

- Studies on the minor elements and the antiseptics of artificial diet for silkworm, *Bombyx mori* L. 439**
 Etudes sur les éléments mineurs et les antiseptiques des aliments artificiels pour le ver à soie *Bombyx mori* L. 445
 MIAO YUN-GËN & JIANG LI-JUN

- Optimal conditions of host-parasitoid density, ratio and age for the multiplication of *Nesolynx thymus* (Girault), a parasitoid of the uzifly, *Blepharipa zebina* walker . . . 449**
 Conditions optimales de densité, de ratio et d'âge de l'hôte et du parasitoïde, pour la multiplication de *Nesolynx thymus* (Girault), un parasitoïde de la mouche uzi, *Blepharipa zebina* Walker 455
 RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU

- Host plant attractivity in a model, *Cotesia glomeratus* – *Bombyx mori* – mulberry . . 459**
 Attractivité de la plante hôte dans l'exemple *Cotesia glomeratus* – *Bombyx mori* – mûrier 471
 T. V. SATHE & A. D. JADHAV

Rapports techniques / Technical reports

Detection and separation of Bacillariophyceae members resembling pebrine spore, <i>Nosema bombycis</i> during mother moth examination	479
Détection et séparation de Bacillariophyceae ressemblant à des spores de pébrine, <i>Nosema bombycis</i> pendant l'examen du papillon mère	487
N. R. PRASAD, N. PRABHUSWAMY, K. S. KESHAWA REDDY & S. T. GOVINDARAJU	
Efficacy of iodophor on growth and productivity and occurrence of diseases in silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., NB4D2 race	491
Efficacité du iodophore par rapport à la croissance, la productivité et l'apparition de maladies chez la race NB4D2 du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L.	501
P. VENKATARAMANA, N. SURYANARAYANA & R. K. DATTA	
Quantitative studies on the consumption and utilization of <i>Terminalia tomentosa</i> leaves by <i>Larja</i> larvae	507
Etudes quantitatives sur la consommation et l'utilisation de feuilles de <i>Terminalia tomentosa</i> par les larves <i>Larja</i>	513
U. S. P. SINHA, S. K. MATHUR, A. K. SINHA & B. N. BRAHMACHARI	
A repeatable protocol for the production of gynogenic haploid plants in mulberry . .	517
Un protocole reproductible de production de plants gynogéniques haploïdes chez le mûrier	523
R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH	

Statistiques 2000 - 2000 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 2000.

Table I. 2000 cocoon and raw silk production.

Pays <i>Country</i>	Cocons frais <i>Fresh cocoons</i> (tonnes)	Soie grège <i>Raw silk</i> (tonnes)
Brésil / <i>Brazil</i>	8 473	1 389
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	93	14
Centre Afrique / <i>Central Africa</i>	20	0
Chine / <i>China</i>	454 600	60 000
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	10.8	0.56
Egypte / <i>Egypt</i>	18.75	2.4
Inde / <i>India</i> ⁽¹⁾	126 084 ⁽²⁾	15 214 ⁽³⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	743.8	106.2
Iran	5 522	900
Italie / <i>Italy</i>	60.5	-
Japon / <i>Japan</i>	1 244	557
Malaisie / <i>Malaysia</i>	16.92	0
Ouganda / <i>Uganda</i>	15	2
Ouzbékistan / <i>Uzbekistan</i>	-	1 100
Philippines	8.8	-
Roumanie / <i>Rumania</i>	2	0
Syrie / <i>Syria</i>	32	-
Thaïlande / <i>Thailand</i>	2 287	955
Turquie / <i>Turkey</i>	59.7	10
Vietnam	10 000	1 000

- Non disponible / *Not available.*

(1) 99/2000.

(2) dont 1553 tonnes de cocons eri / *including 1 553 tons eri cocoons.*

(3) dont 1270 tonnes non mûrier / *including 1 270 tons non mulberry.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 2000.**Table II. 2000 cocoon and raw silk imports and exports.**

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Brésil / Brazil	0	1 474 ⁽¹⁾	0	44
Bulgarie / Bulgaria	-	-	4	-
Chine / China	-	10 496	-	-
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	0	0	0	0
Egypte / Egypt	0	0	0	22.7
France	-	2.6	-	318
Inde / India	31	499	26	6936 ⁽²⁾
Indonésie / Indonesia	1.2	3.3	-	5.8
Iran	0	0	50	-
Italie / Italy	0	93	49	3168
Japon / Japan	76	-	675	2360 ⁽³⁾
Malaysia	6	0	-	-
Ouganda / Uganda	0	2	-	-
Philippines	-	-	-	24.2
Roumanie / Rumania	0	0	0	0
Thaïlande / Thailand	0.16	0.36	10.28	138.56
Turquie / Turkey	21.6	0	-	-
Vietnam	0	-	0	0

Non disponible / Not available.

(1) dont 422 kg de soie ouvrée / including 422 kg of thrown silk yarn.

(2) dont 2081 tonnes non mûrier / including 2081 tons non mulberry.

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

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 2000.

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 2000.

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
Country	Price paid to producers (fresh cocoons)	Export price (dry cocoons)	Import price (dry cocoons)
Brésil / Brazil	2.15	-	xx
Bulgarie / Bulgaria	2.2	-	5.0
Centre Afrique / Central Africa	2.10	-	-
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	1.5	-	-
Egypte / Egypt	2.94	-	-
Inde / India	2.50	-	-
Indonésie / Indonesia	2.0	1.5	-
Iran	4.3	xx	-
Italie / Italy	7.50	xx	18.5
Japon / Japan	15.17	7.70	8.69
Malaysie / Malaysia	1.80	5.70	-
Ouganda / Ouganda	1.4	-	-
Philippines	2.39	-	-
Roumanie / Rumania	1.5	xx	xx
Syrie / Syria	4	-	-
Thaïlande / Thailand	1.70	4.3	5.1
Turquie / Turkey	3.70	4.72	-
Vietnam	1.82	xx	xx

- Non disponible / Not available.

xx : Pas d'exportation/d'importation de cocons.

No cocoon export/import.

LEPIDOPTERAN INSECTS ON MULBERRY

T. K. NARAYANASWAMY, R. SRINIVASAGOWDA &
V. T. SANNAVEERAPPANAVAR*

Department of Sericulture, U. A. S., GKVK, Bangalore - 560 065, India.

Keywords: Mulberry, leaf roller, *Diaphania pulverulentalis*, silkworm, *Bombyx mori*, Lepidopteran.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* sp.) is regarded as native of Himalayas. Its culture spread to India from China through Tibet by about 140 BC. It is now being cultivated in over 32 countries all over the tropical, temperate and subtropical regions of the world. Mulberry leaves serve as the sole food for silkworm, *Bombyx mori* L. Its production on scientific lines is essential for organising sericulture on sound economic lines. From the economic point of view, moriculture coupled with silkworm rearing remains a highly labour intensive activity providing vast scope for employment. Hence, it is essential to harvest more and better quality leaves through integrated nutrient management (INM) and integrated pest management (IPM) systems. Due to its ever green, perennial, luxuriant foliage it affords foods and shelter for a variety of insect and non-insect pests. In this paper, an attempt has been made to compile information on various *lepidopteran* pests causing damage to mulberry in different parts of the world in a very concise form.

A large number of insect and non-insect pests have been reported from different countries. Maki (1916) listed 87 insect and six non-insect pests on mulberry in Faramosa, whereas 118 insects were reported on mulberry in Korea (Umeya and Omi, 1935). In China and Japan, more than 126 and 200 insect species cause damage to mulberry, respectively (Chu and Chin, 1936; Kukuchi, 1976). In India, more than 70 insect and non-insect species belonging to *Lepidoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Orthoptera*, *Isoptera* and *Tetranychidae* are known to feed on mulberry crop (Biradar, 1989 and Naik, 1997).

It is evident from the available literature that more than 20 *Lepidopteran* species belonging to *Pyralidae*, *Arctiidae*, *Lymantridae*, *Noctuidae*, *Geometridae*, *Amatidae*, *synatomidae* and *Tortricidae* cause damage to mulberry crop in different parts of the world.

Distribution:

Details are presented in Table I.

Bio-ecology:

Life cycle:

The information pertaining to biology of different *lepidopteran* insects is presented in Table II.

Nature of damage:

The literature on nature of damage caused by different *lepidopteran* insects is pooled in Table III.

* Department of Entomology, U. A. S., GKVK, Bangalore - 560 065, India.

Table I. *Lepidopteran* insects infesting mulberry.Tableau I. Insectes *Lépidoptères* infestant le mûrier.

Pest	Country / State / District	Reported by
<i>Parasite</i>	<i>Pays / Etat / District</i>	<i>Observé par</i>
Amatidae		
<i>Amata passalis</i> Fabricius	India (Karnataka) / Inde (Karnataka) India / Inde	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Ceryx godarti</i> Bdv.	-do-	-do-
Bombycidae		
<i>Rondotia menciaria</i> Moor.	China / Chine	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Bombyx</i> (= <i>Theophila</i>) <i>mandarina</i> Leech	China and India / Chine et Inde	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
Arctiidae		
<i>Diacrisia</i> (= <i>Spilosoma</i>) <i>obliqua</i> Walker	India (Karnataka) / Inde (Karnataka) India, Philippines / Inde, Philippines	Anonymous, 1996 ; Anonyme, 1996 ; Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Jolly, 1987
	Taiwan / Taïwan China / Chine India / Inde	Maki, 1916 Desco <i>et al.</i> , 1986 Ayyar, 1963 ; Beeson, 1941 ; Nair, 1970
<i>Amsecta albistriga</i> Btlr.	South India / Sud de l'Inde	Ayyar, 1963 ; Haseman, 1913
<i>Hyphantria cunea</i> Dru.	Japan (Missouri) / Japon (Missouri) Japan / Japon USSR / URSS India (Karnataka) / Inde (Karnataka)	Aruga, 1994 Montermini <i>et al.</i> , 1984 Lyashenko, 1986 Chandrappa, 1994 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995 Tanaka, 1964 ; Maki, 1916
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Japan / Japon	
Eupterotidae		
<i>Eupterote mollifera</i> Walker	Tropical countries / Pays tropicaux	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990

Table I (Contd...) / Tableau I (Suite...).

Pest	Country / State / District	Reported by
Parasite	Pays / Etat / District	Observé par
Geometridae		
<i>Hemerophilla</i> (= <i>Phithonandria</i>) <i>atrilineata</i> Butler	Burma, China, Japan, Korea and Vietnam <i>Birmanie, Chine, Japon,</i> <i>Corée et Vietnam</i>	Tanaka, 1964 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Jolly, 1987
Aegeriidae		
<i>Paradoxecia pieli</i> Lieu	China / <i>Chine</i>	Sengupta <i>et al.</i> 1990
Lymantridae		
<i>Lymantria obfuscata</i> Moore	India (Kashmir) / <i>Inde (Cachemire)</i>	Dharmadikari <i>et al.</i> 1985
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	India / <i>Inde</i>	Rangaswami <i>et al.</i> 1976
<i>Euproctis lunata</i> Moore	India / <i>Inde</i>	Sengupta <i>et al.</i> 1990
<i>Euproctis similis</i> <i>xanthocampa</i> Dyar	India / <i>Inde</i>	Sengupta <i>et al.</i> 1990
Noctuidae		
<i>Spodoptera</i> (= <i>Prodenia</i>) <i>litura</i> Fab.	China / <i>Chine</i>	Chu & Chin, 1936
	India / <i>Inde</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
	India (Jammu and Kashmir) / <i>Inde (Jammu et Kashmir)</i>	Sharma & Tara, 1985
	India / <i>Inde</i>	Chandrappa, 1994 ; Govindan <i>et al.</i> 1995
	Philippine / <i>Philippines</i>	Jones, 1913
<i>Glyphodes</i> (= <i>Margaronia</i> , <i>Diaphania</i>) <i>pulverulentalis</i> Hampson	Malaysia / <i>Malaisie</i>	Sengupta <i>et al.</i> 1990

Table I (Contd...).

Tableau I (Suite...).

Pest	Country / State / District	Reported by
Parasite	Pays / Etat / District	Observé par
<i>Diaphania</i> (= <i>Glyphodes</i>) <i>pulverulentalis</i> Hampson	South India-Bangalore rural, Kolar and Mandya (Karnataka) <i>Sud de l'Inde-Bangalore rural,</i> <i>Kolar et Mandya (Karnataka)</i>	Sidde Gowda <i>et al.</i> 1995; Geetha Bai <i>et al.</i> 1997 Anonymous 1996 Sidde Gowda <i>et al.</i> 1995; Geetha Bai <i>et al.</i> 1997 <i>Anonyme</i> 1996
	India-Karnataka, Andhra Pradesh and Tamil Nadu <i>Inde - Karnataka, Andhra Pradesh et</i> <i>Tamil Nadu</i>	Rajadurai <i>et al.</i> 1999
<i>Margaronia</i> (= <i>Glyphodes</i> , <i>Diaphania</i>) <i>pyralis</i> Walker	Japan, India, Burma, Ceylon and China <i>Japon, Inde, Birmanie,</i> <i>Ceylan et Chine</i>	Hampson 1896 and Ghosh 1924
	South China, Japan, , Formosa and India <i>Sud de la Chine, Japon</i> <i>Formose et Inde</i>	Howard & Buswell 1925 ; Chu 1936 ; Maki 1916 ; Watanabe 1940 ; Pillai 1921 ; Beeson 1941 ; Mathur 1980 ; Sharma and Tara 1985
<i>Glyphodes</i> (= <i>Margaronia</i>) <i>pryeri</i> Walker	Japan / Japon	Kiyoku 1939
<i>Archips micaceana</i> Walker	Thailand, Vietnam, India (Karnataka) <i>Thaïlande, Vietnam, Inde (Karnataka)</i>	Napombeth 1976 ; Rajashchekargouda <i>et al.</i> 1992
<i>Archips subsidaria</i> Walker	India (Haryana & Punjab) <i>Inde (Haryana & Punjab)</i>	Pawar and Parry 1988

Table II. Biology of lepidopteran insects on mulberry.

Tableau II. Biologie des insectes lépidoptères sur le mûrier.

Pest	Life stages						
	Egg			Larvae		Pupae	
	Character	Fecund. (N°)	Incuba. period (days)	Character (days)	Duration	Character (days)	Duration
<i>Périodes de vie</i>							
Parasite	Oeuf			Larves		Chrysalide	
	Caractère	Fécondité (N°)	Période d'incub. (jours)	Caractère	Durée (jours)	Caractère	Durée (jours)
a) <i>Amata passalis</i> Fabricius	ellow in colour, laid in round shape on ventral surface of the leaf, measures 0.67 to 0.69 mm diameter	500	6-7	Dull white with thin brownish hairs on the body, shiny head capsule, mature caterpillar measures 2-2.5cm in length, it moults for 7 times	32	Pupate in thin silken cocoon between leaf foldings	10-12
<i>Amata passalis</i> Fabricius	<i>Jaune de couleur, déposés en cercle sur la surface ventrale de la feuille, mesure entre 0,67 à 0,69 mm de diamètre</i>	500	6-7	<i>Blanc terne avec des poils fins plus ou moins marron sur le corps, et une capsule céphalique brillante en forme de capsule, la chenille adulte mesure de 2 à 2.5 cm de long, mue 7 fois</i>	32	<i>Fait sa chrysalide dans un fin cocon de soie entre les plis de la feuille</i>	10-12
b) <i>Ceryx godarti</i> Bvd.	Eggs are pale yellow, laid in batches on lower surface of leaf	130-235	5	Light brown, bears hairs on all segments, it has four moults, matured larvae measure 4-4.5 cm in length	30	Copper brown, pupate in thin silken cocoon between leaf foldings, measure 1.1-1.4 cm in length	12-13

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...).

<i>Ceryx godarti</i> Bdv.	Les oeufs sont de couleur jaune pâle et sont tassés sur la surface inférieure de la feuille	130-235	5	Marron clair a des poils sur tous les segments, a quatre mues les larves matures mesurent de 4 à 4,5 cm de longueur	30	Marron cuivré, fait sa chrysalide dans un fin cocon de soie entre les plis de la feuille mesure entre 1,1 et 1,4 cm de longueur	12-13
c) <i>Diacrisia obliqua</i> Walker	Green metallic, shining, laid in batches on lower surface of the leaf	1000-2000	5-7	Larvae moults six times, anterior and posterior regions are black and rest of the body reddish brown with 12 tubercles on each segment, larvae are gregarious in early instars		Dark brown, pupate in thin silken cocoon in soil	12-14
<i>Diacrisia obliqua</i> Walker	Vert métallique, brillant, déposés en tas sur la surface inférieure de la feuille	1000-2000	5-7	Larve mue 6 fois, les parties antérieures et postérieures sont noires et le reste du corps est marron rougeâtre avec 12 tubercules sur chaque segment, les larves sont grégaires pendant les premiers âges		Marron foncé, fait sa chrysalide dans un fin cocon de soie dans la terre	12-14
d) <i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Laid in clusters	3000	4-5	Dark brown to black colour, group feeding behaviour		Pupate in thin silken cocoon in soil	
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Déposés en grappes	3000	4-5	De marron foncé à noir Comportement de nourrissage de groupe		Fait sa chrysalide dans un fin cocon de soie dans la terre	
e) <i>Hyphantria cunea</i> Dru	Laid on lower surface of the leaf	800	10	Webbing the leaves and feeding from inside the folded leaves		Pupate in thin silken cocoon between leaf foldings	
<i>Hyphantria cunea</i> Dru	Déposés sur la surface inférieure de la feuille	800	10	Enroule les feuilles et se nourrit à l'intérieur des feuilles pliées		Fait sa chrysalide dans un fin cocon de soie entre les plis de la feuille	
f) <i>Eupterote mollifera</i> Walker	Eggs are round, flattened, sulphur yellow colour	-	9-13	Dark with tuft hairs larva moults four times, mature larva measures 4.8-5 cm in length	60	Pupate in thin silken cocoon, dark brown in colour and measures 1.8- 2cm in length	35-60

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...).

<i>Eupterote mollifera</i> Walker	Les oeufs sont ronds, aplatis de couleur jaune souffre	9-13	60	Foncé avec une touffe de poils, la larve mue 4 fois. Les larves adultes mesurent 4,8 à 5 cm de longueur	Chrysalide dans un fin cocon de soie, de couleur marron foncé et mesure de 1,8 à 2 cm de longueur	35-60
g) <i>Eupracticis fraterna</i> Moore	Oval, pale yellow, laid in clusters on lower surface of the leaf, covered with hairs	100-200	15-18	Young larvae are yellow with dark tuft of hairs on second and third abdominal segments, matured larva is brown and measures 2.0-2.5 cm in length	Dirty brown with hairy appearance in thin cocoon in soil	13-15
<i>Eupracticis fraterna</i> Moore	Ovale, jaune pâle déposé en grappes sur la surface inférieure de la feuille, couvert de poils	100-200	15-18	Les jeunes larves sont jaunes avec des touffes sombres de poils sur le deuxième et troisième segments de l'abdomen, la larve mature est marron et mesure entre 2.0 à 2.5 cm de longueur	Marron sale avec une apparence poilue dans un fin cocon dans la terre	13-15
h) <i>Eupracticis lunata</i> Moore	Laid in masses	127-300	4	Larva moults 7-8 times	Brown	
	Déposé en masses	127-300	4	La larve mue entre 7 et 8 fois	Marron	
i) <i>Spodoptera litura</i> Fabricius	Laid in clusters on lower surface of the leaf and covered with brown hairs	200-300	4-5	Larva is stout, cylindrical, pale greenish brown in colour with dark markings of transverse and longitudinal grey and yellow brands, mature larva measures 3.5-4.0 cm length	2-3 weeks	Pupate in soil 2 weeks
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	Déposé en grappes sur la surface inférieure de la feuille et couvert de poils de couleur marron	200-300	4-5	La larve est grosse, cylindrique, de couleur marron pâle tirant sur le vert avec des marques sombres jaunes et grises transversales et longitudinales, la larve mature mesure de 3,5 à 4,0 cm de longueur	2-3 semaines	Fait sa chrysalide dans la terre 2 semaines

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...)

Pest/Ravageur	Life stage										
	Egg			Larva		Pupa		Adult		Reported by	
	Characters	Fecundity (N°)	Incubation period (days)	Characters	Duration (days)	Characters	Duration (duration)* (days)	Charac.	Duration (days)		
	Stades de vie										
	Oeuf			Larve		Chrysalide		Adulte			
Caractères	Fécond. (N°)	Période d'incubation (jours)	Caractères	Durée (jours)	Caractères (période)*	Durée (jours)	Caractères	Durée (jours)			
<i>Glyphodes (Diaphania) pulverulentis</i> Hampson	Laid on leaf buds or on ventral surface and pink in colour	100-250	2-5	Greenish-brown with black markings on the lateral sides of abdomen	8-18	Deep brown (March to January)	7-10	Greyish-white	4-14	Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997 ; Rajadurai <i>et al.</i> , 1999 ; Siddegawda <i>et al.</i> , 1995 & Anonymous, 1996	
<i>Glyphodes (Diaphania) pulverulentis</i> Hampson	Déposés sur des bourgeons foliaires ou sur une surface ventrale et de couleur rose	100-250	2-5	Marron- verdâtre avec des taches noires sur les côtés latéraux de l'abdomen	8-18	Marron très foncé (de mars à janvier)	7-10	Blanc grisâtre	4-14	Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997 ; Rajadurai <i>et al.</i> , 1999 ; Siddegawda <i>et al.</i> , 1995 & Anonyme, 1996	
<i>Glyphodes (Margarona) pyralis</i> Walker	Laid on lower surface of the leaves	100-400	3-9	Bluish-green -with small dark black spots on either side of each segment	13-19	Deep brown (March to January)	4-10	Light silvery cream	9-14	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Aruga 1994 ; Mathur 1980 ; Yokoyama 1925 ; Sharma & Tara 1985 ; Bceson 1941 and Govindan <i>et al.</i> , 1992	

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...).

f)-	March to July <i>De mars à juillet</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990 Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
g) Yellow coloured two dark spots are present on the apical angle and two large ones on cubital angle of fore wing of female, in addition one dark spot near the costal margin in the forewing in male <i>Deux taches foncées de couleur jaune sont visibles sur l'angle apical et deux grosses taches sur l'angle cubital de l'aile antérieure de la femelle, avec en plus, une tache foncée près de la marge costale sur l'aile antérieure du mâle.</i>	September to February <i>De septembre à février</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Biradar, 1989 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990 Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Biradar, 1989 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
h) -	September to February <i>De septembre à février</i>	Gouda <i>et al.</i> , 1983
i) Adults are stout with fore wings dark wavy white markings, hind wings are white with brown margin <i>Les adultes sont robustes avec des ailes avant ; avec des taches ondulées blanc foncé. Les ailes postérieures sont blanches, avec un contour de couleur marron.</i>	March to July <i>De mars à juillet</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990 Sengupta <i>et al.</i> , 1990

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...)

Pest/Ravageur	Life stage									Reported by
	Egg			Larva		Pupa		Adult		
	Characters	Fecundity (N°)	Incubation period (days)	Characters	Duration (days)	Characters	Duration (duration)* (days)	Charac.	Duration (days)	
	Stades de vie									
	Oeuf			Larve		Chrysalide		Adulte		
Caractères	Fécond. (N°)	Période d'incubation (jours)	Caractères	Durée (jours)	Caractères (période)*	Durée (jours)	Caractères	Durée (jours)	Décrit par	
<i>Glyphodes (Diaphania) pulverulentalis</i> Hampson	Laid on leaf buds or on ventral surface and pink in colour	100-250	2-5	Greenish-brown with black markings on the lateral sides of abdomen	8-18	Deep brown (March to January)	7-10	Greyish-white	4-14	Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997 ; Rajadurai <i>et al.</i> , 1999 ; Siddegowda <i>et al.</i> , 1995 & Anonymous, 1996
<i>Glyphodes (Diaphania) pulverulentalis</i> Hampson	Déposés sur des bourgeons foliaires ou sur une surface ventrale et de couleur rose	100-250	2-5	Marron- verdâtre avec des taches noires sur les côtés latéraux de l'abdomen	8-18	Marron très foncé (de mars à janvier)	7-10	Blanc grisâtre	4-14	Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997 ; Rajadurai <i>et al.</i> , 1999 ; Siddegowda <i>et al.</i> , 1995 & Anonyme, 1996
<i>Glyphodes (Margarana) pyloalis</i> Walker	Laid on lower surface of the leaves	100-400	3-9	Bluish-green -with small dark black spots on either side of each segment	13-19	Deep brown (March to January)	4-10	Light silvery cream	9-14	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Aruga 1994 ; Mathur 1980 ; Yokoyama 1925 ; Sharma & Tara 1985 ; Beeson 1941 and Govindan <i>et al.</i> , 1992

Table II (Contd...) / Tableau II (Suite...)

Glyphodes (Margaronia) pyloalis Walker	Déposés sur la surface inférieure des feuilles	100 400	3-9	Vert bleuâtre avec de petites taches de couleur noir foncé sur les deux côtés de chaque segment	13-19	Marron foncé (de mars à janvier)	4-10	Crème clair tirant sur l'argenté	9-14	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Aruga 1994; Mathur 1980 Yokayama 1925 ; Sharma & Tara 1985 ; Beeson 1941 <i>et</i> Govindan <i>et al.</i> , 1992
Glyphodes (Margaronia) pryeri Walker	Eggs are deposited on the leaves	150	3.5-9.0	Hibernate in late October when temperature is about 16-18°C	15-33	(February to April)	8-20		15	Kiyoku 1939
Glyphodes (Margaronia) pryeri Walker	Les oeufs sont déposés sur les feuilles	150	3.5-9.0	Hibernent vers la fin octobre lorsque la température est entre environ 16 et 18°C	5-33	(De février à avril)	8-20		15	Kiyoku 1939
Archips micaceana Walker	Laid in masses and greenish yellow in colour	130- 557	6.5-9.0	Light green to dirty green with brown head capsule	17-22	Light yellowish to chocolate brownish	6-10	Greyish chocolate brown	7	Puttarudriah <i>et al.</i> , 1960 ; Rajashchekargouda <i>et al.</i> , 1992 . Sannaveerappanavar <i>et al.</i> , 1999
Archips micaceana Walker	Déposés en tas et de couleur jaune verdâtre	130 557	6.5-9.0	Allant du vert au verdâtre avec une capsule céphalique marron	17-22	Allant du jaunâtre clair à la couleur chocolat tirant sur le marron	6-10	Marron chocolat grisâtre	7	Puttarudriah <i>et al.</i> , 1960 . Rajashchekargouda <i>et al.</i> , 1992 ; Sannaveerappanavar <i>et al.</i> , 1999

*=Diapause duration / *=Durée de la diapause

Table III. Nature of damage caused by different lepidopteran pests of mulberry.

Tableau III. Nature des dommages causés par les différents lépidoptères ravageurs du mûrier.

Pest	Nature of damage	Reported by
Ravageur	Nature des dommages	Observé par
<i>Spilosoma</i> (=Diacrisia) <i>obliqua</i> Walker	Early instars are aggregate on single leaf and scrape the green leaf matter, later instars are voracious feeders on whole leaf	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Spilosoma</i> (=Diacrisia) <i>obliqua</i> Walker	<i>Les premiers âges sont rassemblés sur une seule feuille et ils grattent la matière verte de la feuille, les derniers âges sont des mangeurs voraces qui se nourrissent de la feuille toute entière</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Feeds on buds <i>Se nourrit de bourgeons</i>	Tanaka, 1964
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	Cut the young shoots <i>Couper les jeunes pousses</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Hyphantria cunea</i> Drur	Feeding from inside the leaf foldings	Aruga, 1994
<i>Hyphantria cunea</i> Drur	<i>Se nourrit de l'intérieur des plis foliaires</i>	Aruga, 1994
<i>Eupterote mollifera</i> Moore	Feeds on leaves <i>Se nourrit de feuilles</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	-do-	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Biradar, 1989 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Amata passalis</i> Fabricius	-do-	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Ceryx godardi</i> Bdv.	-do-	-do-
<i>Pachytelia unicolor</i>	Feeds on opening buds <i>Se nourrit de bourgeons en éclosion</i>	Tanaka, 1964

Table III. (Contd...).

Tableau III. (Suite).

Pest	Nature of damage	Reported by
<i>Ravageur</i>	<i>Nature des dommages</i>	<i>Observé par</i>
<i>Hemerophilla atrilineata</i> Butler	-do-	Tanaka, 1964
<i>Diaphania</i> (= <i>Glyphodes</i> , <i>Margaronia</i>) <i>pulverulentalis</i> Hampson	Young caterpillars feed on soft green tissues of leaf surface and inhabit the growing apical portion of the mulberry shoot. Grown up caterpillars devour tender leaves. Single leaf is rolled up and the caterpillar is found between the folded leaf.	Geetha Bai <i>et al.</i> , (1997)
<i>Diaphania</i> (= <i>Glyphodes</i> <i>Margaronia</i>) <i>pulverulentalis</i> Hampson	<i>Les jeunes chenilles se nourrissent des tissus frais tendres de la surface foliaire et demeurent dans la portion apicale en expansion de la tige du mûrier. Les chenilles adultes dévorent les feuilles plus tendres. La feuille est enroulée et la chenille se trouve entre les plis foliaires.</i>	Geetha Bai <i>et al.</i> , (1997)
<i>Glyphodes</i> (= <i>Margaronia</i>) <i>pyloalis</i> Walker	Feeding is noticed in between the leaves which are closely webbed together <i>Le nourrissage a lieu entre les feuilles qui sont étroitement enchevêtrées</i>	Chen <i>et al.</i> , (1932)
<i>Archips micaceana</i> Walker	First instar caterpillars construct a silken web using the tender leaves and feed by scraping. The grown up caterpillars bring two to three leaves together and feed by nibbling or making holes	Rajashekhargouda <i>et al.</i> , (1992)
<i>Archips micaceana</i> Walker	<i>Les chenilles des premiers âges bâtissent une toile en soie en utilisant les feuilles tendres et se nourrissent en raclant la surface. Les chenilles adultes rassemblent deux ou trois feuilles et s'en nourrissent en les grignotant ou en faisant des trous.</i>	Rajashekhargouda <i>et al.</i> , (1992)

Table IV. Seasonal incidence of different lepidopteran insects on mulberry.

Tableau IV. Incidence saisonnière de différents insectes lépidoptères sur le mûrier.

Pest / Ravageur	Season / Saison	Reported by / Observé par
<i>Spilosoma obliqua</i> Walker	August to February November to January August to September <i>D'août à février</i> <i>De novembre à janvier</i> <i>D'août à septembre</i>	Sengupta <i>et al.</i> 1990 ; Ayyar, 1963 ; Rangaswami <i>et al.</i> , 1976
<i>Hyphantria cunea</i> Drur.	Spring / Printemps	Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Spring, autumn <i>Printemps, automne</i>	Aruga, 1994 ; Tanaka, 1964 ; Maki, 1916
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	August to February <i>D'août à février</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Eupterote mollifera</i> Moore	August to February <i>D'août à février</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	March to August <i>De mars à août</i>	-do-
<i>E. similisxanthocampa</i> Dyar	Spring to Autumn <i>Du printemps à l'automne</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Biradar, 1989 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Amata passalis</i> Fabricius	February to August <i>De février à août</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990 Rangaswami <i>et al.</i> , 1976
<i>Ceryx godarti</i> Bdv.	-do-	Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Rangaswami <i>et al.</i> 1976
<i>Hemerophilla</i> <i>atrilineata</i> Butler	Summer, Autumn and Spring <i>Été, automne et printemps</i>	Tanaka, 1964 ; Sengupta <i>et al.</i> 1990
<i>D. pulverulentalis</i> Hampson	June to February <i>De juin à février</i>	Anon., 1998a ; Rajadurai <i>et al.</i> , 1999
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	May to June <i>De mai à juin</i>	Yokoyama, 1925 ; Mathur, 1980
<i>Glyphodes pryri</i> Walker	May to July <i>De mai à juillet</i>	Kiyoku, 1939

Table V. Alternate hosts of lepidopteran pests of mulberry.**Tableau V. Hôtes alternatifs des lépidoptères ravageurs du mûrier.**

Pest	Crop / host	Reported by
Ravageur	Récolte / Hôte	Rapporté par
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	Field crops, forest trees, castor, sesamum	Beeson, 1941 ; Rangaswami <i>et al.</i> , 1976
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	Récolte des champs, arbres forestiers, ricin, sesame	Beeson, 1941 ; Rangaswami <i>et al.</i> , 1976
<i>Spilosoma obliqua</i> Walker	Polyphagous (Taiwan) / <i>Polyphage (Taiwan)</i> Polyphagous (China) / <i>Polyphage (Chine)</i> Polyphagous (India) / <i>Polyphage (Inde)</i> Polyphagous (India, Knt) / <i>Polyphage (Inde, Knt)</i>	Maki, 1916 Desco <i>et al.</i> , 1986 Rangaswami <i>et al.</i> , 1976
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	Sweet potato (India) / <i>Patate douce (Inde)</i> Polyphagous / <i>Polyphage</i> Polyphagous (South India) / <i>Polyphage (Sud de l'Inde)</i>	Ayyar, 1963 Aruga, 1994 Nair, 1970
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	Tobacco, Potato / <i>Tabac, Pomme de terre</i> Tomato / <i>Tomate</i>	Ayyar, 1963 Beeson, 1941
<i>Hyphantria cunea</i> Drur.	Polyphagous / <i>Polyphage</i> Aruga, 1994 Box apple / <i>Pomme naine</i> <i>Acer negundo</i>	Ferriari and Trevisan, 1989 Haseman, 1913 Montermini <i>et al.</i> , 1984
<i>Amata passalis</i> Fabricius	Castor / <i>Ricin</i>	Nair, 1970 Sengupta <i>et al.</i> , 1990 Ayyar, 1963
<i>Diaphania pulverulentalis</i> Hampson	<i>Sonchus brachyotis</i>	Anonymous 1996/ <i>Anonyme, 1996</i> Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	<i>Eugenia jambolina</i> , Fig. olive and Box trees <i>Figuers, oliviers et arbres nains</i>	Anonymous, 1996/ <i>Anonyme, 1996</i> Beeson 1941; Nair 1970
<i>Archips micaceana</i> Walker	Fig., grapes, apple and walnut <i>Figues, raisins, pommes et noix</i>	Puttarudriah <i>et al.</i> , 1960
<i>Archips subsidaria</i> Walker	Apple, walnut, apricot and lucerne <i>Pomme, noix, abricot et luzerne</i>	Pawar and Parry 1988

Table VI. Cultural and mechanical methods suggested for the management of lepidopteran pests of mulberry.

Tableau VI. Méthodes culturelles et mécaniques proposées pour lutter contre les lépidoptères ravageurs du mûrier.

Pest	Methods	Reported by
<i>Ravageur</i>	<i>Méthodes</i>	<i>Décrit par</i>
<i>Diacrisia obliqua</i> Walker	Collection and destruction of early instar worms, deep ploughing and irrigation to kill pupae, installation of light traps	Tanaka, 1964 Rangaswami, <i>et al.</i> , 1976 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Diacrisia obliqua</i> Walker	<i>Ramassage et destruction des vers aux 1ers stades</i> <i>labourage profond et irrigation pour tuer les chrysalides,</i> <i>installation de pièges légers</i>	Tanaka, 1964 Rangaswami, <i>et al.</i> , 1976 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	-do-	Maki, 1916 ; Tanaka, 1964 ; Aruga, 1994
<i>Hyphantria cunea</i> Drur	-do-	Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	-do-	Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Eupterote mollifera</i> Moore	-do-	Rangaswami, <i>et al.</i> , 1976 Biradar, 1989 ; Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	-do-	-do-
<i>Euproctis similis-xanthocampa</i> Dyar	-do-	-do-
<i>Amata passalis</i> Fabricius	Collection and destruction of egg masses <i>Recueil et destruction des masses d'oeufs</i>	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Sengupta <i>et al.</i> , 1990
	Collection and destruction of gregarious young caterpillars <i>Ramassage et destruction des jeunes chenilles grégaires</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990

Table VI (Contd...)

Tableau VI (Suite...).

Pest / Ravageur	Methods / Méthodes	Reported by / Décrit par
<i>Hemerophilla atrilineata</i> Butler	Straw rope bands to the trunk <i>Bandelettes de corde de paille attachées au tronc</i>	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Ceryx godarti</i> Bdv.	-do- Installation of molasses trap <i>Installation de pièges à mélasse</i>	-do- Tanaka, 1964
<i>Diaphania pulverulentalis</i> Hampson	Clipping affected apical portion, collection and burning of affected portions, deep ploughing during summer, encouraging bird predators	Anonymous, 1996 ; Siddegowda <i>et al.</i> , 1995 ; Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997 Rajadurai <i>et al.</i> , 1999
<i>Diaphania pulverulentalis</i> Hampson	<i>Coupe de la portion apicale affectée, ramassage et brûlure des parties affectées, labourage profond pendant l'été encourageant les oiseaux prédateurs</i>	<i>Anonyme, 1996 ;</i> Siddegowda <i>et al.</i> , 1995 ; Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	Rope band to the trunk and large branches installation of light traps <i>Bandelettes de paille sur le tronc et les grosses branches. Installation de pièges lumineux</i>	Mathur, 1980 ; Yokoyama, 1925 ; Aruga, 1994 ; Kikuchi, 1976 ; Rangaswami <i>et al.</i> , 1976

Seasonal incidence:

The information pertaining to seasonal activity of different *lepidopteran* insects on mulberry is presented in Table IV

Alternate hosts:

The occurrence of *lepidopteran* insect pests of mulberry on other host plants is presented in Table V.

Management:

a) Cultural and mechanical methods

The information on cultural and mechanical methods employed in the management of different *lepidopteran* pests on mulberry is presented in Table VI.

b) Use of botanicals:

Spraying of neem seed kernel extract (2.5 %) and the neem oil (0.015 %) minimises the larval population of *Diaphania pulverulentalis* on mulberry (Rajadurai *et al.*, 1999).

Table VII. Natural enemies associated with lepidopteran pests of mulberry.

Tableau VII. Ennemis naturels associés aux ravageurs lépidoptères du mûrier.

Pest	Natural enemy	Reported by
Ravageur	Ennemi naturel	Rapporté par
<i>Diacrisia obliqua</i> Walker	<i>Apanteles obliqua</i> Ashm <i>Trichogramma chilonis</i> Ishii (Hymenoptera : Braconidae)	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Govindan <i>et al.</i> , 1995; Anon, 1996; Katiyar <i>et al.</i> , 1999
<i>Diacrisia imparilis</i> Walker	-do-	Tanaka, 1964
<i>Hyphantria cunea</i> Dru	* <i>Agelena opulenta</i> <i>Baccillus</i> sp. <i>B. thuringiensis</i> Berl <i>Metarrhizium anisopliae</i> Metsch. Virus, fungi, nematode. <i>Virus, champignons, nématodes.</i> NPV (tetragonal & triangular)	Deseo <i>et al.</i> , 1986 Montermini <i>et al.</i> , 1984, Deseo <i>et al.</i> , 1986 Aruga, 1994
<i>Lymantria obfuscata</i>	<i>Apanteles</i> sp. <i>Rogas</i> sp (Hymenoptera : Braconidae) <i>Exorista</i> sp. <i>Palexoristas</i> sp, (Diptera : Tachinidae) <i>Brachymeria</i> sp. (Hymenoptera : Chalcidae)	Dharmadikari <i>et al.</i> , 1985
<i>Euproctis</i> <i>similisxanthocampa</i> Dyar	<i>Enterobacter</i> sp. (Bacteria)	Tomita and Washita, 1987
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	<i>Apanteles</i> sp. <i>Chelonus</i> sp (Hymenoptera : Braconidae)	Jones, 1913 Chin and Chou, 1976
<i>Diaphania</i> <i>pulverulentalis</i> Hampson	<i>Calasoma</i> sp. (Coleoptera : Carabidae) <i>Richirbus</i> sp. (Heteroptera : Reduviidae) ; <i>Eocanthecona</i> sp. (Heteroptera : Pentatomide) and <i>Menochilus sexmaculatus</i> (Coleoptera : Coccinellidae)	Anonymous, 1998b Anonyme, 1998b 1998b
	<i>Trichogramma chilonis</i> Ishii (Hymenoptera : Trichogrammatidae) <i>Phaenotoma noyes</i> Zettle (Hymenoptera : Braconidae) ; <i>Apanteles bisulatus</i> (Hymenoptera : Braconidae)	Rajadurai <i>et al.</i> , 1999 Geetha Bai <i>et al.</i> , 1997

* Predator / Prédateur.

Table VII (Contd...) / Tableau VII (Suite).

Pest	Predator / parasitoid / microbe	Reported by
Ravageur	Prédateur / Parasitoïde / microbe	Rapporté par
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	<i>Apanteles obliquae</i> Ashm (Hymenoptera : Braconidae) ; <i>Chlaenius pictus</i> (Coleoptera : Carabidae) ; <i>Exeristes roborator</i> Fab. (Hymenoptera : Braconidae) <i>Phanerotoma hendecasillosa</i> Green muscardine, Yellow muscardine <i>Muscardine verte, muscardine jaune</i> <i>Tetragnatha</i> sp. (Tetragnathidae : Araneae) <i>Philodromus</i> sp. (Philodromidae : Araneae)	Nishikawa, 1919 Kuwana <i>et al.</i> , 1939 Beeson, 1941 Anonymous / <i>Anonyme</i> 1998b
<i>Archips subsidaria</i> Walker	<i>Apanteles</i> sp. (Hymenoptera : Braconidae)	Pawar and Parry, 1988
<i>Diaphania pulverulentalis</i> Hampson	<i>Nosema bombycis</i> Nageli (Microsporida : Protozoa)	Anonymous 1996 / <i>Anonyme</i> 1996 and Geetha Bai <i>et al.</i> (1997)
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	Bm DNVI, DNVII and IFV <i>Nosema</i> sp. N ₁ SH ₅ (Microsporida : Protozoa)	Wanatabe <i>et al.</i> , (1988) Hayasaka and Yonemura (1999)

c) Sex pheromone

Female moths of *G. pyloalis* produce the sex pheromone 10, 12, 14-hexadecatrienyl acetate which attracts male moths (Seol *et al.*, 1987) and amount of pheromone produced is 1-2ng/female (Honda *et al.*, 1990).

d) Predators, parasitoids, pathogens:

The insect predators, parasitoids and pathogens associated with different *lepidopteran* pests of mulberry are listed in Table VII.

Table VIII. Chemical control of lepidopteran pests of mulberry.

Tableau VIII. Contrôle chimique des ravageurs lépidoptères du mûrier.

Pest	Chemicals and concentrations	Reported by
<i>Ravageur</i>	<i>Produits chimiques et concentrations</i>	<i>Présenté par</i>
<i>Amata passalis</i> Fabricius	DDVP 0.2%	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Spilosoma obliqua</i> Walker	DDVP 1 ml/l Dipteron 4%	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Hyphantria cunea</i> Drur	DDVP, deltamethrin, dimethoate, malathion, diflubenzuron, dimlin, fenvalerate, DDVP 1 ml/l, Dipteron 4%	Ferriari and Trevisan, 1989 ; Tanaka, 1964
<i>Euproctis fraterna</i> Moore	Monocrotophos, dichlorvos	Devaiah and Suhas, 1983
<i>Eupterote mollifera</i> Moore	-do-	-do-
<i>Euproctis similixanthocampa</i> Dyar	80% DDVP 1 ml/l	Sengupta <i>et al.</i> , 1990
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius	DDVP, malathion Endosulfan 0.1% Permethrin and 0.025 g ai/ha, and cypermethrin 0.1% Monocrotophos and Dichlorvos 0.25 to 2.00%	Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Govindan <i>et al.</i> , 1995 ; Chandrappa, 1994 Sengupta <i>et al.</i> , 1990 ; Devaiah and Suhas, 1983 Aruga, 1994 ; Kikuchi, 1976
<i>Diaphania pulverulentalis</i> Hampson	DDVP@ 0.076 to 0.152%	Gectha Bai <i>et al.</i> , (1997)
<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker	DDVP@ 0.038 to 0.076%	Rangaswami <i>et al.</i> , 1976 ; Kikuchi, 1976 ; Gupta and Vijayveer, 1986 ; Aruga, 1994
<i>Archips micaceana</i> Walker	Trichlorophos 0.5%	Puttarudriah <i>et al.</i> , 1960

e) Host plant resistance

Fotedar *et al.* (1998) reported a few resistant varieties viz., KNG, Saniish 5, Himachal local and Chinese white of temperate and Tr₈, Tr₁₀, Tr₁₃₀₁, C₄, M₅ and Mysore local of tropical origin to *M. Pyloalis*.

f) Use of chemicals

The use of chemicals like BHC and DDT as dusts was recommended earlier against few of the pests of mulberry. However in recent years the use of the above chemicals was not recommended against any pest due to its longer persistence and adverse effect on the environment. Dichlorvos (DDVP) an organophosphorus insecticide was most recommended chemical due to its shorter residual toxicity.

The information on use of chemicals against different *lepidopteran* pests of mulberry is compiled in Table VIII.

Prospects:

Systematic surveys to study the distribution of various *lepidopteran* insects, their seasonal incidence, natural enemies and qualitative loss on different mulberry varieties under different cropping systems are needed in all mulberry growing areas. Studies are also required on bio-ecology of major pests, effective management practices including host plant resistance. Cost effective pest management strategies are to be evolved with least emphasis on use of chemicals.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1996) The leaf roller pest *Diaphania (Margaronia) Pulverulentalis* (Hampson) (*Lepidoptera* : *Pyrilidae*). Annual Report, KSSR & D1., pp : 57-60.
- ANONYMOUS (1997a) Bionomics and integrated control of *Spilosoma obliqua* and other important *lepidopteran* mulberry pests, Annual Report, KSSR & D1., pp : 106-107.
- ANONYMOUS (1997b) Annual Report, Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, India pp : 86-91.
- ANONYMOUS (1998a), Bionomics and integrated control of *Spilosoma obliqua* and other *lepidopteran* mulberry pests (Seasonal occurrence of the leaf roller pest and its parasitoids). Annual Report, KSSR & D1., pp : 107-111.
- ANONYMOUS (1998b), New record of natural enemies of leaf roller *Diaphania pulverulentalis* (*Lepidoptera* : *Pyrilidae*). CSR & T1 News, 7(3) pp : 1-2.
- ARUGA H. (1994) Principles of Sericulture. Oxford and IBH Publications, New Delhi, pp. 79-81.
- AYYAR T. V. (1963) Hand Book of Economic Entomology for South India, Govt. Madras pp. 301.
- BEESON C. F. C. (1941) The Ecology and Control of the Forest insects of India and the Neighboring countries, pp. 527.
- BIRADAR N. (1989) Faunestic study of Arthropods infesting mulberry (*Morus* sp) and Biology of *Euproctis Fraterna* Moore (*Lepidoptera* : *Lymantridae*). M. Sc, (Ser.) Thesis. UAS, Bangalore, pp. 81.
- CHANDRAPPA P. L. (1994), *Reshme Besaya* (Kannada) pp. 27-34.
- CHE, K. F, TSIANG, AND N. P. AND SUNG, T. L. (1932). An experiment with straw banding around the trunk and large branches of mulberry trees for trapping insects. Bur. Ent. Hangchow. 2: pp : 267-271.
- CHIN S.C. AND CHOU, L.Y. (1976), Hymenopteran parasitoids of *Spodoptera litura*. J. Agric. Res. China, 25 : 237-241.
- CHU (1936) Notes on Cheloninae of China, with description of a new species (*Hymenoptera* : *Braconidae*) Ent & Phytopathology, 4(35):682-685.
- CHU J. AND CHIN, S. (1936), Notes on the life history and control measures of the mulberry twig borer *Paradozeca pili* (Lieu). Bur. Ent. Hangchow, 5 : 149-158.
- DESEO K. V., RAVESTI, L., MONTERMINI, A., CORTELINI, W. (1986), First microbiological control experiment on the *Hyphatiria cunea*, *Infreatore fitopatologica*, 30 : 17-22.
- DEVAIAH M.C. AND SUHAS, Y. (1983). Efficacy of insecticides against tobacco cut worm, *Spodoptera litura* infesting mulberry. National Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, pp. 104.

- DHARMADIKARI P.R., RAMASESHIAH, G., ACHAN, P.D. (1985), Survey of *Lymantria obfuscata* its natural enemies in India. Entomophaga, 30 : 399-408.
- FERRIARI R. AND TREVISAN, M. (1989), Control of *Hyphantria cunea* and repercussions on culture of *Bombyx mori*. *Informatore Fitosanitario*, 37 : 55-58.
- FOTEDAR R. K. DHUR. A., DANDIN, S. B. (1998) Screening of mulberry genotypes against major fungal diseases and insect pests under field conditions. Indian J. Seric. 37 (1) : 40-43.
- GEETHABAI M., MARIMADIAH, B., NARAYANASWAMY, K. C. RAJ GOPAL. (1997) An outbreak of leaf roller pest *Diaphania* (= *Margaronia*) *Pulverulentalis* (Hampson) on mulberry in Karnataka *Geobios News Reports*, 16 (2) : 73-79.
- GHOSH C. C. (1924) Report by Entomologists mandalay for year end 30th June 1922-1923 pp : 1-14 & 1-19
- GOUDA R. R., DEVAIAH, M. C. AND SUHAS, Y. (1983), Study on the biology of the hairy caterpillar *Euproctis fraterna* (Walker) (Lepidoptera : Lymantriidae). National Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, pp. 104.
- GOVINDAN R., DEVAIAH M. C., RANGASWAMI, H. R., NARAYANA SWAMI. T. K., 1995 Reshmi Vyavasaya (Kannada), UAS, Bangalore, pp : 370.
- GUPTA B. K. AND VIJAYAVEER, 1986, Laboratory Bioassay of some insecticides as contact poison against third instar larvae of *Glyphodes pyloalis* (Walker) (Lepidoptera : Pyralidae) Indian Forester 112 (6) : 528-532
- HAMPSON (1896) Fauna of British India Moths IV pp. 357.
- HASEMAN L. (1913), Some orchard insects of Missouri, Missouri State Board of Horticulture Bulletin, 15 : 1-31.
- HAYASAKA B., YONEMURA, N. (1999) Infection and development of *Nosema* sp N¹SH⁵ (Microsporidia : Protozoa) in several lepidopteran insects) JARQ., 33 : 52-57.
- HONDA H. ANDO, T. OGURA, Y. TERA MINE, T. VEDA, R. (1990) Identification of sexpheromone of the mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* (Wlk) (Lepidoptera : Pyralidae) Appl. Ent. Zool., 25 (2) : 265-272.
- HOWARD C. W., BUSWELL, K. P. (1925) A survey of the Silk Industry of South China. Seric. Agric. Bull., 12 : 208.
- JOLLY M. S. (1987) Appropriate sericulture Technique, pp. 32-34.
- JONES C. R. (1913) The tobacco caterpillar *Prodenia litura*. Philippine Agric. Res., Manila, 6 : 425 - 432.
- KATIYAR R. L., YOGANANDA, M. C., MANJUNATH, D., SEN, A. K., ASHEN, M. M. AND DATTA, R. K. (1999) Role of *Trichogramma chilonis* (Ishii) in the suppression of field population of the Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua* Walker, Indian J. Sericulture, 38 : 40 - 43.
- KIYOKU M., (1939) On the life history and habits of *Glyphodes pryeri* Trans. Kansai. Ent. Soc., 9 (2) : 43 - 46.
- KUKUCHI W., (1976) Control of insect pests of Mulberry in Japan. Japan pesticides information, 29 (1) : 9 - 11.
- KUWANA Z., ISHII, G. KUROSAWA, T (1939) Studies on the hymenopterous parasites of *Margaronia pyloalis* (Wlk) External morphology and ecology of *Exorista roborator* (Tab.) Bull. Imp. Seric. Exp. Stat. 9 (8) : 469 - 494.
- LYASHENKO L. I. (1986), The fall web worm, *Zaschita Rastanii*, 1 : 57.
- MAKI M. (1916), Report on injurious insects of mulberry tree in Faramosa. Faramosan Govt. Agric. Expt. Stat., N° 90, pp. 265.
- MATHUR R. N. (1980) Biology of the mulberry defoliator *Glyphodes pyloalis* (Wlk.) (Lepidoptera. Pyralidae) Indian for. Bull., 273 : 1 - 6.
- MONTERMINI A., CORTELLINI, W., DESEO, K. W. (1984), Microbial control of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera : Arctiidae) in South Italy, *Difesa della piante*, 8 : 17 - 19.
- NAIK, S. L. (1997), Bioecology of thrips infesting mulberry. M. Sc. (Seri) Thesis UAS Bangalore - p 65.
- NAIR M. R. G. K. (1970) Insect and Mite pests of Field crops. ICAR New Delhi. Pp 375.

- NAPOMPETH, B. (1976) Soyabean Insect Pest Management. Kasetsart Universities Publication. Thailand N° : 26 - 27.
- NISHIKAWA I. (1919) Studies on insect enemies of the silkworm, Sangyo Shimpo 312 : 244 - 251.
- PATEL J. C. AND PATEL, R. C. (1971), Study on the biology of *Declonius heliopa* (Gupta) a larval parasite of *Spodoptera litura*. Indian J. Ent., 33 : 50 - 54.
- PAWAR A. D., PARRY, M. (1989) Record of natural enemies of important fruit pests in ladak (Jammu and Kashmir). Indian J. Plant Protection, 17 (2) : 291 - 292.
- PILLAI R. M. (1921) Short Notes on the Insect pests of crops in Travancore. Travancore. Dept. Agric., pp. 53.
- PUTTARUDRIAH M., KATAGIHALLI MATH, S. S., CHANDRASEKHAR, (1960) A note on the occurrence of *Cacoecia micaceana*. Walker as a pest on grapes. Mysore Agric. J. 35 (4) : 228 - 232.
- RAJASHEKHARGOUDA R. SUSHAS YELSHETTY, DEVAIA M. C. (1992) Studies on the life-history of *Archips micaceana* (Wlk.) (Lepidoptera : Tortricidae) - A pest of mulberry. Indian J. Agric. Res., 26 (3) : 160 - 164.
- RAJADURAI S. MANJUNATH, D., KATIYAR R. L. PRASAD, K. S., SEN, A. K. SHEKHAR M. A., AHSAN M. M., DATTA R. K. (1999) Leaf-roller. A serious pest of mulberry Indian Silk, 37 (12) 9 - 11.
- RANGASWAM, G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISHWANATHAN K., SASTRY, C. R., JOLLY, M. S. (1976). Sericulture Manual - I Mulberry Cultivation FAO Rome pp 50.
- SANNAVEERAPPANAVAR V. T., NARAYANASWAMY, T. K. GOVINDAN R. (1999). Biology of the bellmoth, *Archips micaceana* (Walker) (Lepidoptera : Tortricidae) on mulberry National Sem. Trop. Seric. Pp : 22.
- SENGUPTA, K., KUMAR, P. BAIG, M. GOVINDAIAH (1990) Hand Book of Pests and Disease Control of Mulberry and Silkworm ESCAP, Thailand, p : 88.
- SEOL K. Y., HONDA, H., MATSUMOTO K. (1986). Artificial diets for mass rearing of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* (Walker) (Lepidoptera : Pyralidae) Appl. Ent. Zool., 21 (1) : 109 - 113.
- SEOL K. Y. HONDA H., USUI K. ANDO T. MATSUMOTO, Y. (1987) 10, 12, 14 - Hexa decatrinyl acetate, sex pheromone of the mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* (Walker). (Lepidoptera Pyralidae) Agric. Biol. Chem., 51 (8) : 2285 - 2287.
- SHARMA B. TATA, J. S. (1985) Insect pests of Mulberry plants (*Morus* sp) in Jammu region of Jammu and Kashmir state. Indian J. Seric., 24 (1) : 7 - 11.
- SHARMA, S. D., BALAVENKATASUBBIAH, M., BAIG, M. (1989), A report of the presence of various pathogenic microbes in a wild population of Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua*. Current Science, 58 : 762 - 763.
- SIDDEGOWDA, D. K., VINOD KUMAR GUPTA, SEN A. K. BENCHAMIN, K. V., MANJUNATH, D. SATYAPRASAD, K. MAGDUM, S. B., DATTA, R. K. (1995) *Diaphania* sp. Infests Mulberry in South India. Indian Silk, 34 (8) : 6 - 8.
- TANAKA, Y. (1964), SERICOLOGY, CSB Publication, Bombay, pp. 277.
- TOMITA, K. AND IWASHITA, Y., Study on the pathogenicity of *Enterobacter* sp. multiplying in the cytoplasm of midgut cells of some *Lepidopteran* larvae. Japanese J. App. Ent. Zool., 31 : 63 - 64.
- UMEYA, Y. AND OMI, Y. (1935), Studies on Noxious insects of mulberry trees in Korea. Rep. Seric. Exp. Stat., Korea, 3 : 145 - 164.
- WATANABE, C. (1940) Hymenopterous parasites of the mulberry pyralid moth., *Margaronia Pyloalis* Walker in Japan. *Insecta Matsum.*, 14 (2 - 3) : 85 - 94.
- WATANABE, H. KURIHARA, Y. WANG, Y. X., SHIMIZU, T. (1988) Mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* : habitual host of nonoccluded viruses pathogenic to the silk worm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol 52 (3) : 401 - 408.
- YOKOYAMA, K. (1925) Studies on the *Glyphodes pyloalis* (Walker) in Japan. Contribution-I : Bionomics and external Anatomies. Bull. Imp. Seric. Exp. Sta., Japan., 2 : 27 - 101.

LES INSECTES LEPIDOPTERES DU MURIER

T. K. NARAYANASWAMY, R. SRINIVASAGOWDA &
V. T. SANNAVEERAPPANAVAR*

Department of Sericulture, U. A. S., GKVK, Bangalore – 560 065, Inde.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* sp.) est considéré comme natif de l'Himalaya. Sa culture est répandue de l'Inde à la Chine en passant par le Tibet depuis environ 140 avant J. C. Il est maintenant cultivé dans plus de 32 pays dans toutes les régions tropicales, tempérées et subtropicales du globe. Les feuilles de mûrier sont l'unique nourriture du ver à soie, *Bombyx mori* L. Sa production sur des bases scientifiques est essentielle pour organiser la sériciculture d'une manière solide sur le plan économique. D'un point de vue économique, la moriculture associée à l'élevage des vers à soie demeure une activité utilisant beaucoup de main d'œuvre et fournissant de nombreux débouchés en matière d'emplois. Il est donc essentiel de récolter plus de feuilles de meilleure qualité grâce aux systèmes de gestion intégrée des nutriments (INM) et de gestion intégrée des parasites (IPM). En raison de son feuillage persistant, vivace et luxuriant il fournit une nourriture et un abri à des insectes et à des non-insectes parasites variés. Dans cet article, nous essayons de rassembler des informations d'une manière concise sur des parasites lépidoptères variés entraînant des dégâts chez le mûrier dans différents endroits du monde.

De nombreux parasites insectes et non-insectes ont été répertoriés dans différents pays. Maki (1916) a listé 87 parasites insectes et 6 parasites non-insectes du mûrier à Faramosa tandis que 118 insectes ont été répertoriés sur le mûrier en Corée (Umeya et Omi, 1935). En Chine et au Japon, plus de 126 et 200 espèces d'insectes respectivement provoquent des dégâts chez le mûrier (Chu et Chin, 1936 ; Kukuchi, 1976). En Inde, on sait que plus de 70 espèces d'insectes et de non-insectes appartenant aux *Lepidoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Orthoptera*, *Isoptera* et *Tetranychidae* se nourrissent sur le mûrier (Biradar, 1989 et Naik, 1997).

Il est évident d'après la littérature disponible que 20 espèces de *Lépidoptères* appartenant aux *Pyralidae*, *Arctiidae*, *Lymantridae*, *Noctuidae*, *Geometridae*, *Amatidae*, *Syntotomidae* et aux *Tortricidae* entraînent des dégâts pour la culture du mûrier dans différentes parties du globe.

Distribution :

Les informations sont présentées dans le Tableau I.

Bio-écologie :

Cycle de vie :

Les informations concernant la biologie de différents insectes *Lépidoptères* sont présentées dans le Tableau II.

Nature des dégâts :

La littérature sur la nature des dégâts provoqués par les différents insectes *Lépidoptères* est rassemblée dans le tableau III.

* Department of Entomology, U.A.S., GKVK, Bangalore – 560 065, Inde.

Incidence saisonnière :

L'information appartenant à l'activité saisonnière de différents insectes lépidoptères sur le mûrier est présentée dans le Tableau IV.

Hôtes alternés :

La présence de parasites lépidoptères du mûrier sur d'autres plantes hôtes est présentée dans le Tableau V.

Gestion :

a) Méthodes culturales et mécaniques :

Les informations sur les méthodes culturales et mécaniques employées dans la gestion de différents parasites Lépidoptères du mûrier sont présentées dans le Tableau VI

b) Utilisation de produits végétaux :

La vaporisation d'un extrait de noyau de graine de margousier (2,5 %) et d'huile de margousier (0,015 %) réduit la population larvaire de *Diaphania pulverulentalis* sur le mûrier (Rajadurai et coll., 1999).

c) Phéromone sexuelle :

Les papillons femelles de *G. pyloalis* produisent la phéromone sexuelle 10, 12, 14-hexadécatriényl acétate qui attire les papillons mâles (Seol et coll., 1987) et la quantité de phéromone produite est de 1 à 2 ng / femelle (Honda et coll., 1990).

d) Prédateurs, parasitoïdes, pathogènes :

Les insectes prédateurs, les parasitoïdes et les pathogènes associés à différents parasites lépidoptères du mûrier sont répertoriés dans le Tableau VII.

e) Résistance de la plante hôte :

Fotedar et coll., (1998) a répertorié quelques variétés résistantes à *M. pyloalis* telles que KNG, Saniish 5, Himachal local et Chinese white d'origine tempérée et Tr8, Tr10, Tr1301, C4, M5 et Mysore local d'origine tropicale.

f) Utilisation de produits chimiques :

L'utilisation de produits chimiques comme le BHC et le DDT en poudre était recommandée auparavant contre certains parasites du mûrier. Cependant, récemment l'utilisation de ces produits chimiques n'a pas été recommandée contre les parasites à cause de la durée de sa persistance et de son effet négatif sur l'environnement. Le dichlorvos (DDVP) un insecticide organo-phosphoré est un produit chimique recommandé en raison de la durée plus courte de sa toxicité.

Les informations sur l'utilisation de produits chimiques contre différents parasites Lépidoptères sont rassemblées dans le Tableau VIII.

Perspectives :

Des études systématiques sont nécessaires pour étudier la distribution des insectes lépidoptères variés, leur incidence saisonnière, leurs ennemis naturels et la perte qualitative sur différentes variétés de mûrier avec différents systèmes de culture dans toutes les zones de culture du mûrier. Il faut aussi entreprendre des études sur la bio-écologie des principaux parasites, sur les pratiques d'exploitation efficaces et sur la résistance des plantes hôtes. Il faut mettre au point des stratégies de lutte rentables contre les parasites avec le moins d'utilisation possible de produits chimiques.

SERICULTURAL BY-PRODUCTS FOR VARIOUS VALUABLE COMMERCIAL PRODUCTS AS EMERGING BIO SCIENCE INDUSTRY

B. K. SINGHAL, ANIL DHAR, ARADHANA SHARMA*, S.M.H. QADRI & M. M. AHSAN**

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu-181101, India.

Keywords: Mulberry, silkworm, pupae, silk, by-products, several commercial products, sustainable sericulture.

INTRODUCTION

Sericulture in India is interwoven with age old Indian culture. According to the Indian legend, sericulture was introduced about 2000 years ago and silk moth producing yellow silk fibre was very popular from the ancient time though according to European scholars, Chinese bivoltine silk was introduced in India in 140 B.C. Even during the British period, India was producing good quantity of local silk yarn which was exported to U.K. and France and mainly utilised in parachute industry (Datta and Chatterjee, 1991). India received a setback in post world war II period when the parachute silk yarn was replaced by the nylon thread and demand for silk fell down drastically. However, sericulture in India again resumed significantly especially in late 70's and 80's and reached to a production level of more than 14,000 MT in 1999-2000 putting India at second rank among silk producing countries after People's Republic of China due to new dimensions in research and technologies. Since silk is rooted in Indian social tradition, the domestic market is strong and most of the production of raw silk is consumed within the country. India has the distinction of being the only country in the world to produce all the commercially known varieties of silk, namely, mulberry, tasar, eri and muga.

In India, sericulture is a cottage industry practised in about 59,000 villages. It is a labour intensive industry providing full and part time employment to about 6 million people in host plant cultivation and pre & post cocoon production activities providing them livelihood and thus making it as one of the important sector of the economy (Singhal *et al.*, 1998). During 1999-2000, India has earned a foreign exchange of more than 900 crore rupees by exporting more than 400 lakh square metres of silk goods. Silk is user friendly and environmentally sound because of its hygroscopic character which absorbs moisture upto 30% of its weight and thus makes the wear more comfortable. To make this industry more profitable, R & D efforts put in so far have already yielded improvements in silk production by improving productivity of silkworm races and their host plants, but yet silk has to become a common man's textile. Further, the present trend of silk production is not very encouraging due to erratic rainfall, wide temperature fluctuations, thrust on agricultural land, high cost of inputs and comparatively low price of cocoon in the market. The situation is likely to aggravate further with

* Regional Research Laboratory, Council of Scientific & Industrial Research, Jammu - 180 001, India.

**CSR & TI, Pampore, Kashmir, India.

implementation of WTO terms and market globalization wherein cheap cocoon and yarn imported from across borders will compete with indigenous produce. Besides, the present generation of sericulturists is slowly switching over to other more profitable industrial sectors. Increase in education level is also resulting into shift from traditional cottage sericulture industry to urban employments which do not have risks of natural calamities common in a sector like sericulture.

To tackle this alarming situation, it is imperative that a new structure, concept and approach of diversification is worked out and introduced in present day sericulture to face the challenges of the day. This could be achieved if our R & D understands the need of the hour, identifies and develop technologies which can make full utilization of mulberry and silkworm refuse in the form as a valuable by-product industry. This will supplement huge profits from sericulture and make this industry economically viable. In this context, the present paper deals with the possible exploitation of each sericulture component for developing highly value-based industrial products and to develop sericulture as a valuable natural bioresource life-science industry.

INDUSTRIAL EXPLOITATIONS

It has been estimated that while consuming 42 kg leaves by 1000 larvae, only about 22.5 kg is ingested in larval body and the rest goes as waste and out of ingested food, about 13kg is left unutilized and is excreted out as silkworm litter. Thus, in the whole cycle, a substantial quantity of residual mulberry leaves, waste of silkworm, pupae, moths and silk are available for by-products development. The unutilized silkworm eggs, egg shells, diseased silkworms, excreta, moths, that are not utilized as feed material can supplement the income of the mulberry cultivator, grainer, rearer, reeler and others in many ways. Industrialists can convert all these waste into various highly valuable commercial products. Scope of all possible exploitations from each of the sericulture component which could be industrially viable for sustainable sericulture are discussed.

MULBERRY FOR INDUSTRIAL PRODUCTS

Mulberry, *Morus* sp., is mainly grown for its leaf production which is the sole food plant for silkworm, *Bombyx mori*. It is a surprising fact that this plant, the main associate of silk production industry is also a great bio-resource for various industrial products as summarized below:

Mulberry shoots for commercial products:

Shoots are source of good charcoal and are also used for extraction of value added chemicals and drug materials (Majumder, 1997). Mulberry chips are processed for conditioning *in situ* enzyme action, deflaking, drying, chopping and pulping, gluing and mixing, mat forming and pressing to prepare fibre boards. From the phloem of shoots, cotton type fibres can be produced for using as supplementary cotton. Fibres are used in spinning while jute-like fibres are also prepared for making ropes, nets, etc. Substances extracted from shoots are effective in improving hair growth in animals like rabbits and sheeps, while polyphenol or its derivatives, polysaccharides including pectin and glucose form a viscose material used for softening of skin and hairs.

Further, mulberry twigs are a very useful resource in basket industry for which there is a lot of demand especially in civil construction works. It is estimated that on an average 2500 to 3000 medium sized baskets can be fabricated from the twigs available per year from one hectare of mulberry garden which in turn can provide an additional sum of about 15,000.00 rupees (about 319.56 US \$) / ha / yr in northern belt of India.

Table I. Biogenic amines level and their precursors in the leaves of *Morus alba*.*Tableau I. Niveau d'amines biogéniques et de leurs précurseurs dans les feuilles de Morus alba.*

Compound	pg / g (dry powder) Mean $\pm$ SD
<i>Composé</i>	<i>pg / g (poudre sèche)</i> <i>Moyenne $\pm$ SD</i>
Da (dopamine)	54.370 $\pm$ 0.44*
DOPAC (dihydroxyphenylacetic acid)	58.503 $\pm$ 5.08
HPAC-4 (hydroxyphenylacetic acid)	15.719 $\pm$ 0.75
KYN (kynurenine)	94.377 $\pm$ 5.76
L-DOPA	18.818 $\pm$ 3.79
MN (metanephrine)	24.682 $\pm$ 4.94
NE (norepinephrine)	7.842 $\pm$ 0.70
TRP (tryptophan)	149.806 $\pm$ 5.12
TYRA (tyramine)	14.625 $\pm$ 0.98
TYR-4 (tyrosine)	111.785 $\pm$ 11.50

* ng / g (dry powder) / ng / g (poudre sèche)
SHIMIZU *et al.* (1992)

Mulberry leaf – a source of “kuwacha-(r) tea”:

In Japan, tea is prepared from the powder of mulberry leaves, which is consumed by some people as a traditional healthy diet (Nomura, 1988). Tsushida *et al.* (1987) and Machii (1990) have measured gamma-aminobutyric acid (GABA) in tea and mulberry leaves and have developed “gabaron-tea” using N₂ gas. This “gabaron-tea” has property to control high blood pressure (Omori *et al.*, 1987). Now, the mulberry leaf derived tea “Kuwacha-(R)” has been commercialised and is available at Hoshina co. Ltd., Saitama, Japan. To explore the biological functions of this tea Shimizu *et al.* (1992) have analysed the leaves of mulberry for trace amounts of aromatic amino acids. A wide range of biogenic amines, i.e. dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), hydroxyphenylacetic acid (HPAC-4), dopa (L-DOPA), norepinephrine (NE) and tyramine (TYRA) were detected in the leaves (Table I). As amino acids, kynurenine (KYN), tryptophan (TRP) and tyrosine (TYR-4) were detected in the leaves. Metabolic pathways such as HPAC-4 $\leftarrow$ TYRA $\leftarrow$ TYR-4 $\rightarrow$ L-DOPA $\rightarrow$ DA $\rightarrow$ NE/DOPAC for catecholamine were also found. It was reported that the high L-DOPA content may act as an anti-feedant to insects. Shimizu *et al.* (1992) reported that in mulberry DOPA content occur in very less concentration and may not have an anti-feedant effects to insects. The presence of gamma-GABA in mulberry leaf may reduce high blood pressure in human beings. As caffeic acid is very active for anti-bacterial activity (Iizuka *et al.*, 1976), Shimizu *et al.*, (1992) opined that presence

of L-DOPA in mulberry leaf may act as a precursor to caffeic acid in mammals. It was thus emphasized that since biogenic amines and their precursors occur in trace amounts "Kuwacha tea" from mulberry can be taken regularly without pharmacological or poisonous effects. However, overdose of "Kuwacha" should be avoided due to gamma-GABA.

Mulberry fruit:

Mulberry fruits are syncarpous formed by the coalescence of flowers spike. Each flower produces a nut-like fruit surrounded by fleshy floral parts. The shape and size of fruits vary from variety to variety. Usually they are ovoid or subglobose or ellipsoid to cylindric. The colour varies from white to pinkish white, purple or dark purple to black. In northern India, mulberry is usually grown as tree in the backyard of houses mainly for the purpose of its well flavoured soft and tasty sweet fruit. By gently shaking of trees, the ripened fruits are harvested and are eaten as such or made into a jam, jelly or sherbet. In Europe, a wine is also prepared by the fermentation of fruits which is very popular as a ladies drink. The fruit juice is used for curing sore throat, fever, dyspepsia and melancholia (Philip, 1989).

Mulberry as fodder:

Mulberry leaf is also used as fodder for cattle, poultry and in pisciculture. Rabbits have a great liking for mulberry leaves. The mountain sheep feed well on the leaves and increase milk yield. In China and India, the leftover leaf alongwith silkworm litter is fed to the milk cows (Dandin and Ramesh, 1987). In the hilly tract of Kumaon region (UP, India) *Morus serrata* is growing in fallow land which is extensively used as a leaf fodder. In China, the bed refuse is thrown into fish ponds as a nutritious food.

Mulberry as wood:

Mulberry wood is a blend of strength and elasticity, which is used in the manufacture of sport goods and fancy articles. Jallunder (Punjab) and Merrut (U.P.) in India are known for producing and marketing sport goods and fancy articles made up of mulberry wood. There are about 80 small scale industries in these cities engaged in this work. Mulberry sap wood is yellowish white while the heart wood is yellowish brown. The sap wood is as hard as the teak. Being highly shock resistant and not liable to split, it is preferred in the manufacture of sport articles like hockey stieks, cricket bats and stumps. Wood is highly elastic, flexible and can be steam bent, hence used in the manufacture of tennis rackets. The wood is easy to saw and peels well in turnery and thus used in the manufacture of bobbins, tool handles and toys. Furniture madeup of mulberry wood has got very smooth finishing.

Mulberry as fuel:

Mulberry farms can easily be designed to meet the fuel requirement of rural families. It can be popularized particularly in the western ghats and the Himalayan belt of India where large tracts of non arable land are available for cultivation under social forestry programme through which sericulture in these areas can also be promoted. Moreover, mulberry is one of the plant having fastest regeneration capacity after Bamboo.

Chinnaswamy and Hariprasad (1998) found out that fuel value of mulberry is much superior over most of the agriculture residues and is closer with the values of maize (Table II) recommended for agro-forestry but less close to the few selected fire wood species (Table III). Thus, mulberry farming, a non-commercial fuel sector could definitely become a commercial fuel yielding sector and can solve the energy crisis of the rural areas where mulberry can easily be grown and sericulture is not in practice.

Table II. Calorific value of different agricultural wastes in comparison to mulberry.

Tableau II. Valeur calorifique de différents déchets agricoles par comparaison au mûrier.

Crop waste	Calorific value (cal g ⁻¹)
<i>Déchet de culture</i>	<i>Valeur calorifique (cal g⁻¹)</i>
Rice straw / Paille de riz	3000
Wheat straw / Paille de blé	3800
Cotton sticks / Branches de coton	3300
Maize stalks / Tiges de maïs	4700
Maize cobs / Epis de maïs	3500
Bajra stalks / Tiges de Bajra	3850
Pearl millet husk / Enveloppe de millet	3626
Groundnut straw / Paille d'arachide	4200
Castor stalks / Tiges de ricin	4767
Mustard straw / Paille de moutarde	4034
Mustard stalks / Tiges de moutarde	3948
Gram straw / Paille de pois chiche	3950
Moth straw	3800
Masoor straw / Paille de Masoor	3810
Moong straw / Paille de Moong	3820
Spent coffee grounds / Marc de café	5000
Mulberry twigs / Brindilles de mûrier	4545

Chinnaswamy and Hariprasad (1998)
(Originally / A l'origine Tyagi, 1989).

Table III. Calorific value of some tree species.

Tableau III. Valeur calorifique de certaines espèces d'arbres.

Tree species	Calorific value (cal. g ⁻¹)
Espèce d'arbres	Valeur calorifique (cal. g ⁻¹)
Cutch / <i>Acacia catechu</i> (<i>Acacia catechu</i>)	5118
Laurel / <i>Laurier</i> (<i>Terminalia tomentosa</i>)	5083
Sal (<i>Shorea robusta</i>)	5395
Sal (<i>Sterculia urens</i>)	5651
Chir (<i>Pinus longifolia</i>)	4948
Cedar / <i>Cèdre</i> (<i>Cedrus deodara</i>)	5478
Sissu (<i>Dalbergia sisso</i>)	5056
Sandan (<i>Ongeimia dalbergiodes</i>)	5090
Teak / <i>Teck</i> (<i>Tectona grandis</i>)	5468
Bilijali (<i>Acacia leucophloea</i>)	4779
Bahan (<i>Populus euphratica</i>)	4938
Mulberry / <i>Mûrier</i> (<i>Morus alba</i>)	4600

Chinnaswamy and Hariprasad (1998)

(Originally: Krishna and Ramaswami, 1931 / *A l'origine Krishna et Ramaswami, 1931*)

Mulberry wood as a potential disinfectant in sericulture :

After using mulberry wood as fuel, the ash can be used as viricidal against silkworm viruses like nuclear polyhedrosis, flacherie and denso-nucleosis to the extent of 80-90% (Kumar *et al.*, 2000). This type of property has been reported to be due to high and stable alkalinity (pH 10.7-11.5) of wood ash.

Mulberry in paper industry:

In China and Europe, the bark is stripped from waste and pruned branches of mulberry are used in paper industry (Dandin and Ramesh, 1987). The pulp for the purpose is obtained by caustic soda digestion and active chlorine bleaching. In addition, young dried shoots, which contain high cellulose, are also used for manufacturing paper. The wood contains 32% tannin and is considered suitable for tanning and colouring purpose.

Mulberry as ornamental plant:

There are many mulberry varieties having ornamental value. One of the Russian mulberry variety with drooping branches, when grafted at a height on suitable stock, forms the best weeping lawn tree. This type of tree is popular in America and commonly known as "teas" weeping mulberry. The variety

Venulosa of *M. alba* with attractive lobbed leaves is said to be one of the best ornamental mulberries. Mulberry has not gained popularity in India as an ornamental plant though commonly planted as shade tree or avenue in the north-western parts of India.

Mulberry in pharmaceutical industry :

Mulberry also occupies a significant position in the field of medicine (Bose, 1987; Shiva Kumar *et al.*, 1995; Dandin and Ramesh, 1987; Singhal *et al.*, 2001). It contains complex chemical substances like other medicinal plants and have tremendous medicinal properties in its parts like root, leaf, stem, fruit and the bark as discussed below.

The root is reported to possess anthelmintic and astringent properties (Bhattari, 1992). The roots of black mulberry, *Morus nigra*, have a special effect on the pancreas and glycogenolysis. Hence, root juice is administered to diabetic patients as decoction which has capacity to reduce blood sugar (Wealth of India, 1962). Mulberry root juice has the capacity of agglutinating the blood. The medicine prepared from the root of *M. alba* is called Glucosidae which can be administered to the patients suffering from high blood pressure (Hui-reng, 1987; Singhal *et al.*, 2001). The methanolic extract of roots has anti-inflammatory, exudative, proliferative and antipyretic activities (Sencer and Binjol, 1988; Jawad *et al.*, 1988). As mulberry has latex producing capacity, the stem on any injury produces free flowing latex which has the property of healing wounds and injuries (Shivakumar *et al.*, 1995). It can be used as dermal ointment. The stem bark is used as purgative and vermifuge (Singh and Ghosh, 1992). Leaves are considered diaphoretic and emollient (Shivakumar *et al.*, 1995; Singhal *et al.*, 2001). A decoction of leaves is used as a gargle to soothe inflammation of the throat (Shivakumar *et al.*, 1995). An infusion of leaves causes a drop in blood sugar sometimes diuretic and a reduction of arterial pressure. It has no effect on glucosuria. Leaves are also used in the preparation of the official syrup of mulberries, which possesses refrigerant and laxative properties. The juice which is refrigerant may be used as a drink in febrile diseases. It has a special quality of moisturising capacity for the skin and keeps the skin smooth and healthy. The mulberry leaves also act as stimulant for lactation in the cattle (Singhal *et al.*, 2001). The leaf of *M. bombycis* contains N-methyl-1-deoxynojirimycin which is used as antidiabetic agent and inhibits the infectivity of human immuno deficiency virus, HIV (Asano *et al.*, 1994). The fruit after fermentation, may be used for the purpose of affording an intoxicating beverage. The fruit of *M. alba* is having cooling effect and is laxative. It is used for sore throat, dyspepsia and melancholia (Jain and De Filippis, 1991). The juice which is refrigerant may be used as drink in febrile diseases. It checks thirst and cools the blood. The fruit juice is also commonly used for reducing high fever as febrifuge. This is the first treatment normally given to any patient with symptoms of fever during endemic malaria (Shivakumar *et al.*, 1995). It is also used to provide strength to withstand under high fever. It has the property of preventing diarrhoea and cold. However, it should be prevented when the patients have confirmed amoebiasis. Syrups and recipes prepared from fruits of *M. alba* are used against hyperlipemia (Shu-tang *et al.*, 1987), constipation and insomnia (Ming-han and Zhu, 1988), antiaging (Yao-ren *et al.*, 1987) and premonitory and apoplexy (Cheng-xiang *et al.*, 1989). Decoctions prepared from fruits are used against cerebral arteriosclerosis (Yong-chang, 1987), chronic nephritis (Jun *et al.*, 1987), kidney asthenia (Wie-xin *et al.*, 1988), Alopecia areata (Ke *et al.*, 1988), central retinitis (Gao-nian, 1988) and nasopharyngeal cancer (Jing-guang and Lin, 1989). The bark of the root has a bitter taste and is somewhat acrid, possesses cathartic and anthelmintic properties. Its juice helps in killing round worms (*Ascaris* sp.), tape worms (*Taenia* sp.) and hook worms (*Ancylostoma* sp.) in the digestive system (Shivakumar *et al.*, 1995). Several decoctions prepared from root bark are used against acute nephritis (Hui *et al.*, 1987), bronchial asthma (You-kui, 1991), pneumonia (Yan-yuan and Ji-hua, 1991), cirrhosis (You and Jain-min, 1994), acne vulgaris (Ya-ru *et al.*, 1989), pertusis (Qi-zhong *et al.*, 1989), whooping cough (Yi-bao, 1989), senile pneumonia (Zu-yin, 1989) and hemoptysis (Wei-ping *et al.*, 1989). The root bark of *M. nigra* contains deoxyjirimycin (DNJ) alkaloid which is said to be effective against AIDS virus (Singh and Ghosh, 1992).

Besides, a good number of bio-chemical compounds are isolated from mulberry. A bio-chemical called Moranoline isolated from mulberry, containing 5 carbon atoms and one nitrogen atom is under investigation by a group of Japanese scientists for its possible use in pharmaceutical industry (Jeffery *et al.*, 1999). Alba furan A (C₂₄ H₂₆ O₄) is found in shoot epidermis of *Morus alba* together with alba furan B, an isomer having anti-fungal activity (Jeffery *et al.*, 1999). Rastogi and Mehrotra (1995, 1998) indicated that Albanol A (C₃₄H₂₆O₈) and Mulberrofuran G found in the root bark of *Morus alba* and other species have hypotensive activity. Morusin isolated from mulberry can inhibit the activation of protein kinase C by teleocidin *in vitro*. They have further stated that pre-treatment of mice skin with morusin for 10 min. inhibits the induction of ornithine decarboxylase by teleocidin, which indicates that morusin inhibits tumor promotion by teleocidin. In this regard three more medicinal compounds isolated from callus tissue of mulberry are Mulberrofuran-T, Kuwanol-E, Calystegin-C1 and (1) – hydroxymoracin-N (Rastogi & Mehrotra, 1995). Morusin, morusin 4-glycoside and Kuwanon H isolated from the root are reported against HIV (Singh and Ghosh, 1992).

SILKWORM WASTE FOR COMMERCIAL INDUSTRIAL PRODUCTS

Availability of dry pupae of mulberry silkworm in India is approximately equal to the raw silk production of about 14,000 tonnes (Sonwalkar, 1998). At present, pupae are not effectively exploited for any useful industrial products. This is necessary not only to make the silk reeling sector more viable and stable but also to generate more employment opportunities. The industrial products in this line can be as follows.

Anti-bacterial peptides to fight leukemia cells:

The anti-bacterial peptides present in mulberry silkworm are reported by the Chinese scientists to work against diseases in human beings (Iyengar, 1998). The killing action of anti-bacterial peptides from *Bombyx mori* have been found by Hongulu *et al.* (1997) against K562, *Myelogenous leukemia* cells. They have reported that the B component of anti-bacterial peptide purified from haemolymph of the silkworm pupae induced by *E. coli* could kill K562, myelogenous leukemia cells cultured *in vitro* but had no effect on normal human B leukocytes. The ultra-structure of K562 cells and B leukocytes treated with the anti-bacterial peptides showed some pathological changes i.e. the membrane was broken, mitochondria were swollen and intracellular substances were leaked out, and the cells died soon. But the treated B leukocytes was reported as the same as in the case of non-treated control. Mandel (1991) has reported that the Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine has developed “ganxuebao” from silkworm excreta, which has an efficiency rate of 95.6% for cancer patient.

Anti-fungal fraction from silkworm haemolymph:

Iyenger (2000) has highlighted that the Japanese team of scientists from sericulture experiment station of Miyagi prefecture and the Iwate University, Faculty of Agriculture have prepared the antifungal fraction from the haemolymph of the silkworm by acid methanol extraction and HPLC. It has inhibitory effect on the mycelial growth of *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *F. cucumerinum*, *Glomerella cingulata* and *Alternaria porri*.

As commercial food:

In countries like Hong-kong, China, Korea and Japan, the healthy silkworm larvae are sterilized and vacuum dried and sold as commercial food. In powder form, it is used as a common source of animal protein in soups and sauce preparations. It is used in speciality diets for cardiac and diabetic patients because of its low cholesterol content.

Commercial products from pupae waste:

Bose and Majumder (1990) reported that the pupae-powder contains water content (7.18%), fat (29.57%), protein (48.98%), glycogen (4.65%), Chitin (3.37%), ash (2.19%) and others like vitamins, etc. (3.7%), showing that pupa is a good source of fat and protein.

Extraction of pupae oil from pupae powder:

During the biological development, pupae synthesize oil which can be extracted from dried pupae-powder by two techniques as described by Bose and Majumder (1990). The first technique is by solvent extraction method, while second one is by applying pressure. The process of oil extraction is simple and comparable to extraction of oil from many other products. As such, to extract oil, the dried and cleaned pupae are first soaked in solvent like hexane, benzene, alcohol, chloroform, ether, petroleum ether, etc. in a soxhlet apparatus, followed by filtering and evaporating the solvent. The solvent vapours are condensed into liquid state and are reused in the process. There is hardly any loss of the solvent in the entire process. Extraction of oil can be done with solvent under hot / cold condition. The percentage of oil extracted by different solvents is presented in Table IV. It is evident that the hot extraction method gives more percentage of oil than that obtained by cold extraction. Chloroform is the best extracting solvent among the solvents. The oil can be refined by steam distillation or by filtering through activated charcoal. Therefore, removal of the odour from the oil is not the problem. It is the problem related to the economics of the whole process i.e. the cost-effectiveness.

Physical properties of pupae oil:

Freshly extracted oil has a brownish tinge colour and fishy odour. It is transparent, slightly acidic (pH around 6.0) in nature. It is not emulsified by water but possible with sodium carbonate solution, however, the oil separates out after keeping for sometimes. The oil is soluble in ether, petroleum ether (b.p.) (40-60° C), acetone, isopropanol, xylene, carbon tetrachloride, absolute alcohol, glacial acetic acid, ethylacetate, n-propanol and partially soluble in rectified spirit, formic acid and dihexane. The experimental studies have established that the iodine number and saponification number of *Bombyx mori* pupae oil are 110 and 210, respectively, which are comparable to that of sunflower oil. The saponification value, acid value and ester value of *Antheraea assamensis* pupae oil are 190.2, 131.2 and 59.0 respectively.

Commercial values of pupal oil and powder:

Pupae-waste, which includes the pupae oil and powder, is of great importance and can be utilized in a number of ways. Italy is the second largest producer of pupae oil following Japan (Bose and Majumder, 1990). Linseed oil (75%) mixed with pupae oil (25%) can be used for the preparation of paints and varnishes. Sterol can be isolated from the oil which is a very good hair tonic. It can be utilized for the manufacture of soap. The problem with the pupae oil is its bad smell which restricts its usage. If its odour can be improved and can be refined to obtain white oil (odourless and colourless), it can be utilized in the skinhide tanning process. Pupa oil can also be used for burning purpose. The oil can be hydrogenated to form white fat (Stearic acid, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$) which can be utilized in the preparation of high grade soap and candle (Bose and Majumder, 1990). Pupa oil is also employed in manufacturing a compound "Ganmaile", which is used in liver and blood diseases (Sugun and Kumar, 1996). Pupa powder can be used as moulding material in the bakelite industry. Pupa powder (after extraction of oil) is generally used as feed for fowl, fish and swine as it is rich in protein. The extracted meal from pupae is mixed with poultry feed. Hens improve their egg laying capacity when feeds are supplemented with this product and seem to have an impact on the colour of the egg yolk. In fact, the protein of pupae is better than the protein of soyabean, fish or beef. Trehalose is another product which can be obtained from larval or pupal stages. Chavan *et al.*, (1999) found a change in bio-chemical constituents of oiled and decoiled pupal powder of different silkworm races reared on different mulberry varieties. Higher N, P, K and protein contents were recorded in decoiled pupae than in oiled pupae of bivoltine breeds (NB4D2). Baruah *et al.*, (1999) calculated the higher

net returns (Rs. 65.80) and benefit cost ratio (0.54) in the production of oyster mushroom, *Pleurotus sajorajju*, raised under the strata of eri silkworm waste as compared to paddy straw as the conventional strata which can be exploited in India where huge wastes are generated from the eri sericulture industry.

Table IV. Oil content of pupae powder.

Tableau IV. Teneur en huile de la poudre de chrysalide.

Solvent / Solvant	Extracted oil (%) / Huile extraite (%)	
	Hot extraction Extraction à chaud	Cold extraction Extraction à froid
Alcohol / Alcool	26.7	26.5
Benzene / Benzène	26.3	24.3
Chloroform / Chloroforme	29.0	26.7
Ether	26.3	25.7
Hexane	25.8	23.0
Petroleum ether / Ether de pétrole	25.1	24.7

Bose and Majumder (1990)

Silkworm pupae as food source for human nutrition:

Silkworm pupae is a nutritious food for human diet as it contains a balanced amount of moisture, chitin, water-soluble proteins, carbohydrates, amino acids and vitamin C, besides crude protein as the major constituent (Majumder, 1992; Majumder *et al.*, 1994) (Table V). In addition, it contains a fairly large amount of nutritiously important minerals like Na, K, Ca and P. Moreover, it is a food which also contains vitamins, especially vitamin B₂, nicotinic acid, folic acid and vitamin B₁ (Bose and Majumder, 1990). It is suggested as an ideal supplement to prevent malnutrition. Pupae waste has a well balanced amino acid composition (Table VI). The nutritionally important amino acids of silkworm pupae is comparable to the FAO reference pattern for protein in essential amino acids like lysine, isoleucine, leucine, valine, methionine and threonine but richer in non-essential amino acids like glycine, serine and alanine (Bose *et al.*, 1989). In addition, pupae is rich in proline but moderate in tyrosine, arginine and histidine and poor in glutamic acid. Yokoyama (1962) reported that silkworm pupae's nutritive value is even superior to that of fish meal and not inferior to beef. Krishnaswami *et al.*, (1972) opined that pupae can be made fit for human consumption. Several workers have suggested that the food value of insects, including the lepidoptera is more or less equivalent to that of chicken feed (Bose, 1992). In the Assam region of this country, eri pupae are fried in oil, spices are added and eaten as a delicious dish. The ancient Greeks and Romans used the pupal powder in the preparation of bread and cakes. In China, children prefer pupae as food to chocolate. Native American Indians use the dried pupae in flour and chicklets (Bose, 1992). Even it has been observed that people from Vietnam eat silkworm larvae as it is.

Table V. Nutritional composition of silkworm pupae.**Tableau V. Composition nutritionnelle de la chrysalide de ver à soie.**

Constituent	Dry weight (%)
<i>Constituant</i>	<i>Poids sec (%)</i>
Moisture / Humidité	9.88
Chitin / Chitine	4.30
Crude protein / Protéine brute	71.75
Water soluble proteins/ Protéines solubles à l'eau	26.10
Carbohydrates / Hydrates de carbone	6.85
Amino acids / Acides aminés	27.35
Minerals / Minéraux	7.13
Potassium	1.86
Sodium	0.07
Calcium	4.44
Phosphorus / Phosphore	0.68
Vitamin C / Vitamine C	187.70*

* µg / g

Majumder *et al.* (1994)**Pupal waste as an alternate source for isolation of lecithin:**

Lecithin, a phospholipid is distributed in animal and plant tissues and is a primary constituent of cells (Kunze, 1941). It is widely used in various food and pharmaceutical products (Ghatak and Krishnamurthy, 1955). It is used as an antioxidant for vegetable oils and fish liver oils (Calkin, 1947) because of its high solubility in fats and oils with properties of edibility and absence of deleterious effects on products. In pharmaceutical products, it was earlier used in anti-malarial therapy (Jerace, 1935), syphilis (Liebrecht, 1930), pyelitis (Narat, 1938), etc. Majumder *et al.* (1996) reported that more than 200 tonnes of lecithin are imported annually to India. To obtain lecithin, egg yolk, soyabean, mustard seeds, pulses and mustard cakes have been used traditionally as raw materials for commercial production (Ghatak and Krishnamurthy, 1955; Talwalkar *et al.*, 1965, 1966, 1969; Garg *et al.*, 1975). Due to high cost and other prioritised utilities of these raw materials, an alternate cheaper source of lecithin is a must. Majumder *et al.* (1996) detected large quantities of lecithin in silkworm pupa waste, which can be exploited as a natural indigenous resource for isolation of lecithin.

Table VI. Amino acids composition of silkworm pupae and FAO reference for protein.

Tableau VI. Composition en acides aminés de la chrysalide de ver à soie et référence de la FAO pour les protéines.

Protein source	Silkworm pupae	FAO reference
<i>Source de protéine</i>	<i>Chrysalide de ver à soie</i>	<i>Référence de la FAO</i>
Lysine	2.60	4.30
Leucine + isoleucine	6.73	9.30
Valine + methionine	4.95	6.60
Threonine	1.46	2.90
Cystine	0.21	2.10
Tyrosine	1.53	
Histidine	1.46	
Arginine	2.47	
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	0.25	
Glycine	4.60	
Serine	2.33	
Alanine	4.90	
Proline	4.40	
Cysteic acid / <i>Acide cystéique</i>	0.28	

Values are expressed in g per 16 g N / *Les valeurs sont exprimées en g pour 16 gN.*
Majumder *et al.* (1994).

Pupa skin:

Pupa skin is available in the reeling and grainage industries and is being thrown as a waste causing pollution. In reeling industry, it is available as pupa and in grainage as pupa skin. It is made up of chitin, which is a polysaccharide and its structure is similar to that of cellulose.

Chitin is the second most abundant material available on earth. It is found on the exoskeletons of arthropods, such as, insects and spiders, some fungi and in crustaceans, such as crabs and shrimps. It is a long unbranched polysaccharide [N-acetyl-2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranose] and can be regarded as a derivative of cellulose, in which the hydroxyl group on the C-2 position has been

replaced by the acetylamino group— NHCOCH_3 . Chitin can be converted into various useful products like chitosan, chitin sulphate, chitin nitrate, chitin xanthate, sodium carboxymethyl chitin, etc. It can be hydrolysed by enzymes and acids. Chitin has been prepared from the cuticle of silkworms (Haga and Zhang, 1988).

APPLICATIONS OF CHITIN AND ITS DERIVATIVES

Chitin has very limited applications because of its strong association with protein and its extreme insolubility. However, its derivatives find an use in various fields.

Chitin:

It finds an use as an additive to increase the loaf volume of wheat flour bread from about 4.9 to 6.0 cm^3/gm . It has more water binding capacity than micro-cellulose which in turn has slightly more fat binding capacity than micro-crystalline chitin (Knorr, 1982). The use of chitin preparations for the post-operative treatment of the intranasal operations such as, conchotomy, deviatomy, polypectomy, etc. has showed that it is easier to use and hastens healing of wounds (Sagar *et al.*, 1991).

Chitosan:

It shows potent antimicrobial activities against various bacteria and fungi (Machida, 1992). Chitopoly is a polynosic fibre blended with chitosan. It has antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, etc. (Katti *et al.*, 1996). Chitopoly is widely used as blended spun yarn and mixed with cotton, polyester, acryl and rayon, while chitosunny, blend of chitopoly and cotton shows antifungal activity against *Trichophyton equinum* (Katti *et al.*, 1996). Therefore, chitosunny finds use in socks for treatment of athlete's foot. Low molecular chitosan [LMCS] exhibits inhibiting activity of colonization of *Streptococcus mutans* on tooth surface of rats and buffering activity against acids produced by plaque bacteria, thereby, inhibiting dental caries increment in rats (Machida, 1992). Chitosan in its bioactivity, performs the functions of immunoadjuvant as an antiviral agent and also stimulates lymphokine, and works as antiviral and antitumor agent (Katti *et al.*, 1996). They have further mentioned that as an anti-sordes agent it prevents carcinogenic bacteria from teeth (Katti *et al.*, 1996). Due to low toxicity, the regenerated chitosan membrane has an excellent wound curing effects (Sagar *et al.*, 1991). With the treatment of chitosan, the colour fastness of silk fabrics dyed with various dyes increases (Kako and Katayama, 1989, 1991). With chitosan treatment, air permeability and heating resistance of silk fabrics also increases (Kako *et al.*, 1996).

Silk yarn of fabrics treated with chitosan have reported to be resistant to yellowness by light. Katti *et al.*, (1996) mentioned that chitosan is useful as a bio-compatible membrane to check bleeding in major surgeries. Chitin and Chitosan, both, have applications in wound dressings and contact lenses. They are also useful for enhancement of dissolution properties of poorly soluble drugs such as, griseofulvin, phenytoin, phenobarbital, predni-solone, flufenamic acid and indomethacin.

MEDICINAL WINES FROM SILK MOTHS

After obtaining the raw silk from the cocoons, the silk moths are usually destroyed. Now the efforts are being made by the Chinese scientists to prepare the medicinal wines by the moth waste. The best known wine has been prepared by the male silkworm moth at Shaanxi Sericultural Technology Station, China (Mandel, 1991; Rajiv and Kumar, 1996). The product popularly called as a "moth wine" can be used to treat impotence, abnormal menstruation and in menopausal symptoms.

COCOON PELADE IN HUMAN NUTRITION

The inner layer of the silkworm cocoon shell, generally called "pelade" has now become a valuable ingredient of human food in China and Japan. Pelade can be obtained from the reeled cocoons after removing the pupae. Chemically, it has the same properties as silk. One kg. of pelade is obtained from about 10 kgs of reeled cocoons. This product is used in protein and amino acid extraction. Commercially known as "Shinki fibroin" in Japan, this protein is hydrolyzed from the waste silk fibre by enzyme treatment and refined chemically for use in preparation of food items. These hydrolysates, rich in bi and tri-peptides, are now available as weaning foods and are highly nutritious. Being proteinacious in nature, it is found quite effective in overall development of human body. The amino acids composition of pelade is presented in Table VII. It is water soluble, light yellowish with an acceptable light taste. It is easily digested and assimilated with having property to reduce cholesterol and blood sugar with providing additional energy (Ramakanth and Ananthraman, 1997). For its use, 1 to 5% of "Shinki fibroin" can be added to the food material. Generally, 5 g per day is consumed (2 g / cup) with milk or coffee. The product has to be stored in a airtight container because of its hygroscopic nature.

SILKWORM PUPAE WASTE AS A POTENTIAL RESOURCE FOR PROTEASE ENZYME PRODUCTION

A technology has been made by Chinya *et al.* (2000) for production of commercially important enzyme-protease, utilising the bacterial culture isolated from decomposed pupa waste as inoculum in the fermenting media. They have advocated that the technology developed can be exploited industrially in order to earn more profit.

SILKWORM PUPAE WASTE AS A POTENTIAL INGREDIENT IN FERMENTING MEDIA FOR LYSINE PRODUCTION

Ashok Kumar *et al.* (2000) have found pupae waste as a potential substrate in fermenting media for micro-biological production of Lysine-the most important essential amino acid for pharmaceutical industry.

COMMERCIAL PRODUCTS OF SILK BASED BY-PRODUCTS

Silk produced by the silkworm is not only a very high quality textile fibre but also a bio-polymer possessing outstanding mechanical properties (Freddy, 1999). It is used to make sutures due to its excellent mechanical properties and strength. Silk can be added to the medical textiles in the form of fibres. Tendons, artificial ligaments, blood vessels and skin grafts find use of silk fibre due to its high mechanical strength. It can be used in contact lenses or drug rehabilitation system involving tissue regeneration or even in the treatment of burn victims. Research is under way to develop silk based materials for more bio-technological uses.

Table VII. Amino acid content in Pelade.*Tableau VII. Teneur en acides aminés dans la pelette.*

Amino acid	Amino acid (in 100 g)
<i>Acide aminé</i>	<i>Acide aminé (dans 100 g)</i>
Glycine	36.73
Alanine	30.15
Leucine	0.94
Isoleucine	1.10
Valine	3.31
Arginine	0.76
Histidine	0.48
Lysine	0.74
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	2.54
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	2.55
Serine	13.46
Threonine	1.81
Phenyl alanine	0.76
Tyrosine	4.44
Methionine	0.24

Ramakanth & Anantharaman (1997)

COMMERCIAL PRODUCTS OF SILK WASTE

It is an important by-product of silk industry. It comprises unreelable cocoons, pierced, double or bad cocoons and waste collected during reeling, re-reeling and winding operations. Silk waste forms about 20 to 30% of the total cost of silk production. Silk waste obtained at various stages of sericulture activities can be re-utilized most effectively.

Table VIII. Industrial utilities of mulberry silk waste.

Tableau VIII. Usages industriels des déchets de soie mûrier.

Source of waste	Utilities
<i>Source du déchet</i>	<i>Usages</i>
Double cocoons <i>Cocons doubles</i>	Production of dupion silk <i>Production de soie duppion</i>
Cocoon waste including boiled-off cocoons <i>Déchets de cocons y compris les cocons bouillis</i>	Production of hand spun yarn <i>Production de fil filé à la main</i>
Pierced and cut cocoons <i>Cocons percés et coupés</i>	Production of hand spun yarn (matka yarn) <i>Production de fil filé à la main (fil matka)</i>
Cookers and reelers re-reeling and winding twisting, weaving and knitting waste <i>Déchets de cuisson et de dévidage de re-dévidage et de moulinage, de tissage et de tricotage</i>	Spun silk mills for production of finer count yarns <i>Usines de soie filée pour la production de fils plus fins</i>
Basin refuse <i>Bassinés</i>	To be mixed in small proportion with good quality waste for the production of yarn <i>A mélanger en petite proportions avec des déchets de bonne qualité pour la production de fil</i>
Filature waste <i>Déchet de filature</i>	To be mixed in different proportions for the production of spun silk yarn <i>A mélanger en différentes proportions pour la production de fil de soie filé</i>
Waste extracted during processing of silk waste into spun silk yarn <i>Déchet extraits pendant la transformation de déchets de soie en fil de soie filé</i>	To make more coarse yarns known as "Noil yarns" <i>Pour faire des fils plus grossiers connus sous le nom de "fils Noil"</i>

Regeneration of silk fibroin from silk waste:

Formic acid and calcium chloride method:

50 g of degummed silk filament is dissolved in a solution containing 500 ml of formic acid (85%) and 50 g anhydrous calcium chloride. Thus, the ratio of silk: calcium chloride: formic acid is taken as 1 : 1 : 10. The filament is added slowly to the solution with constant stirring and the resultant solution is then reprecipitated from this solution using water. Initially water is added slowly with constant stirring till a white precipitate is obtained. This precipitate is allowed to stand for overnight to gel. The precipitate is then filtered using glass crucible and washed with water till no traces of formic acid are detected. The silk fibroin powder thus regenerated is dried in the oven at 65 °C and finally ground to fine granulated powder and stored for further application.

Table IX. Nutrient status of vermicompost and farmyard manure.*Tableau IX. Etat des nutriments du vermicompost à base de vers et de la fumure.*

Nutrient	Vermicompost	Farmyard manure
<i>Nutriment</i>		<i>Fumure de ferme</i>
N	1.87 – 2.00%	0.3 – 0.5 %
P	0.60 – 0.90%	0.2 – 0.4%
K	1.00 – 1.50%	0.3 – 0.6%
Cu	61.50 ppm	2.8 ppm
Fe	1247.00 ppm	Not available / <i>Non disponible</i>
Mn	509.70 ppm	69.0 ppm
Zn	84.60 ppm	14.5 ppm

Dandin *et al.*, (2000)

Lithium bromide method:

Degummed silk waste (7.5 g) is dissolved in freshly prepared 9.3 M Lithium bromide solution with constant stirring. The resulting solution of silk waste is allowed to stand for 2 h. Acetone is then added slowly with constant stirring to precipitate the silk fibroin. The precipitate is then filtered using sintered glass crucible and washed with acetone and excess Lithium bromide is slowly replaced by methanol and then washed with water. The precipitate is finally dried in oven at 65° C and ground to fine granulated powder and stored.

Application of regenerated fibroin powder:

This solution of fibroin powder is used for padding 100% polyester fabric. The fabric is padded using a one dipone nip process using the Pneumatic Padding Mangle with a pressure of 4 bar. The padded samples are rinsed with cold water and airdried.

Thus, 100% polyester sample is padded with the solution of either formic acid or lithium bromide regenerated fibroin powders prepared in 33% formic acid.

Silk fibroin finds tremendous application in textile industry for making polyester fabric with better moisture absorption without significantly affecting the inherent properties of polyester (Raje *et al.*, 1998).

SILK WASTE AS RAW MATERIAL FOR SPUN SILK INDUSTRY

Two varieties of yarns are manufactured from natural silk fibre i.e. filament silk (raw silk) and spun silk. The filament silk is reeled from cocoons, whereas, spun silk is spun from the silk waste. In the reeled silk, several filaments are gathered from the cocoons and made into a single yarn, whereas, in the spun silk, the fibres are spun and converted into yarn. Therefore, the spun silk yarn is readymade twisted yarn for use in weaving.

Silk waste that gets generated at the reeling, forms the raw material in the manufacture of spun silk yarn. Silk waste is the unreelable part of the cocoon. Silk waste obtained during reeling is in the range of 28 to 35% of the weight of silk reeled (excluding cocoon waste) which is quite high as compared to other textile fibre processing. Apart from this silk waste, another type of cocoon waste such as pierced and cut cocoons in rearing or grainage houses are available to a small extent. Some

quantity of inferior / defective cocoons which are unsuitable for economic reeling process is also available. The industrial utilization of silk waste is summarized in Table VIII.

Spun silk utilization:

Spun silk can be utilized just like pure silk due to its attractive appearance. The hand spun finds extensive usages in the manufacture of wide range of products such as dress materials and furnishings, which also have huge demand for export. It is widely used for carpets and for insulating electric wires and cables and also in the manufacture of industrial beltings. Even it is used for suitings, shirtings, sarees, ties, curtain cloth, sewing thread, etc. (Naik *et al.*, 1992). Therefore, spun silk industry plays a vital role in the economics of sericulture industry and especially in silk reeling industry.

COCOON IN HANDI-CRAFT INDUSTRY

Mr Ronald Currie, Secretary general of the International Silk Association., France opined that cocoon craft is a very interesting by-product of sericulture. It is especially for the weaker society, who have some skills, spare time and of course an urge to do something special. It is estimated that there could be a value addition of 10 to 25% in various sectors of post-cocoon with effective management and utilization of the by-products. Utilisation of cut and pierced cocoons in handicrafts is steadily increasing and gaining popularity. For this purpose pierced cocoons are cut, cleaned and dyed to make beautiful garlands, flower vases, wreath, pen stands, dolls, jewellery, wall hangings, wall plates, craft clocks, greeting cards, bouquets and many more (Uma *et al.*, 1993; Vathsala, 1997). These handicrafts are generally sold at handi-craft emporiums with net profit of about 50%. Such handicrafts are the beauty of drawing rooms in houses. Now, it has become an income source for many rural families for their livelihood. In this regard, government of Karnataka in India has opened a sericulture training school at Channapatna in Karnataka. In recent time, silk carpet has emerged as a major foreign exchange earner. The carpets manufactured in Kashmir, Iran, Turkey, etc. are very popular throughout the world (Dhar, 1997). The export of silk carpets from India alone has recorded the foreign exchange earning of more than 900 million rupees (about 19.17 million US \$). The major markets are West Germany, Switzerland, Italy, France, U.K. and U.S.A.

SILKWORM FAECES RESOURCES FOR COMMERCIAL PRODUCTS

Generally, by eating 10 kg of mulberry leaves, silkworms discharges about 1kg of faeces which can be exploited by various industrial processes to achieve valuable returns for the manufacture of various products of human consumption like medicines, cosmetics and edibles as well as certain biological preparations.

In factories, faeces after processing in alcohol, acetone and gasoline, chlorophyll can be extracted. The chlorophyll in silkworm faeces can easily be dissolved in these solvents. However, the chlorophyll so extracted can not be dissolved in water and thus its application becomes limited. Hence, it has to be converted into copper chlorophyll sodium. Thus, the faeces is extracted with organic solvent and the solution is saponified by adding sodium hydroxide. After saponification the above solution gets differentiated into lower (saponified) green layer and upper (non-saponified) yellow layer. To the green layer, copper sulphate and hydrochloric acid are added to obtain copper chlorophyll. This solution on treatment with sodium hydroxide provides copper-chlorophyll-sodium (chlorophyll). To the other yellow layer (non-saponified), solvent is isolated and then by column chromatography and fractional distillation some organic compounds like carotene, phytol and triacontanol are formed. The paste chlorophyll is utilized as raw material in pharmaceutical industry for the treatment of gastric disease like ulcer, liver hepatitis and some of the blood diseases. It is also used in the preparation of quality tooth paste and cosmetics. Copper-chlorophyll-sodium can be used for the treatment of stomach diseases, hepatitis, acute pancreatitis and chronic nephritis. In US, there are more than 30

kinds of medicines containing copper-chlorophyll-sodium. Paste chlorophyll has been extracted from the faeces of bivoltine Kalimpong – A (KA) race of silkworm by Revensiddaiah and Yashoda Bai (1999). The carotene is used for the manufacture of medicines used for the treatment of alimentary canal and respiratory organ diseases. Phytol is the medical raw material for vitamin E and vitamin K. Triacntanol is used extensively as a wonderful plant growth regulator and thus silkworm faeces can be exploited to manufacture natural triacntanol.

After extraction of carotene, leftover residue (about 16.8% of the total) is identified as “Degreen faeces”. This degreen faeces yields about 10% of Pectin after extraction in HCl and then by isolating water. It is then concentrated with alcohol and sediment is taken. Such solid mass obtained is washed with 60, 75 and 90% alcohol, dried and then ground fully. The resultant end product is the pectin. As thickener, the pectin is used in candy, jelly, jam, concentrated fruit juice and as stabilizer which is used in ice-cream. It can reduce blood triglyceride and blood cholesterol and has bacteriostasis and detoxification activity (Majumdar, 1992).

Table X. Effect of vermicompost and farmyard manure on quality of mulberry leaf.

Tableau X. Effet du vermicompost et de la fumure sur la qualité de la feuille de mûrier.

Type of compost applied	Major elements status (%)		
	N	P	K
<i>Type de compost appliqué</i>	<i>Etat des éléments majeurs (%)</i>		
	N	P	K
Vermicompost @ 5.6 t/ha/yr <i>Vermicompost à raison de 5.6 t / ha / année</i>	3.83	0.29	2.10
FYM @ 20 Mt / ha / yr <i>Fumure à raison de 20 t / ha / année</i>	3.61	0.29	2.02
Chemical fertilizers @ 300 : 120 : 120 kg NPK / ha / yr. <i>Engrais chimiques à raison de 300 : 120 : 120 kg NPK / ha / année</i>			

Dandin *et al.* (2000)

RECYCLING OF SERICULTURAL WASTE FOR COMMERCIAL PRODUCTS

Even after industrial exploitations for by-products of mulberry, silkworm, pupa, cocoons, silk and faecal matter wastes, there may be still sufficient quantity of waste from all the sericulture components. These waste can easily be recycled into good organic manure through composting. Organic matters thus obtained can help in soil management for sustainable sericulture. The fresh organic matter obtained contains simple carbohydrates like sugars and starch, protein, cellulose, lignin, waxes and resins, which undergoes into remarkable changes through various physical, chemical and microbial decomposition and finally the end product is known as “humus”. Organic manure contributes to a great deal to the humus content of soil and is an essential input for soil management. In some of the sericulture farms, the left-over mulberry leaves from rearing bed and

field are fed to the cattle and the silkworm litter is directly broadcasted into the fields. This leads to pollution and spreads lot of diseases including pebrine from infected silkworm larvae, which may lead to severe silkworm crop failure. Therefore, this waste can be utilized for the preparation of compost of high nutrient value, as leftover mulberry leaf contains N, P, K of 3.2, 0.5, 1.5% respectively while silkworm litter nutrient status is 1.4% N, 0.4% P and 0.8% K (Choudhary *et al.*, 1993). The waste gets decomposed in about 4-5 months and resulting compost contains 1.6% N, 0.7% P and 0.3% K, in addition to micro-nutrients.

In another case, a good quality vermi-compost can be prepared which can be supplemented with FYM (Dandin *et al.*, 2000). For this purpose, fortification is first made to sericulture waste by blending with microbial inoculum like *Azotobacter*, phosphate solubilizing micro-organisms and single super phosphate. The process of vermicomposting of sericulture waste is carried out by introducing a mixed culture of juvenile earthworms *Eudrilus euginae*, *Eisenia fetida* and *Perionyx excavatus* @ 1.5 kg / Mt of wastes in each trench. Vermicompost thus obtained can play a significant role in mulberry production as well as can also be used in other agricultural crops for enriching the soil with micro-nutrients. In mulberry, the vermi-compost application has increased photosynthetic rate and leaf yield significantly (Singhal *et al.*, 2000). It contains high level of N, P, K, Zn, Fe, Mn and Cu than FYM (Table IX). The mulberry leaf quality is almost at par when vermi-compost thus prepared is applied @ 5.6 MT/ha/yr than the application of 20 MT of FYM/ha/yr (Table X) which is quite costly.

CONCLUSION

Economic benefits of sericultural resources as waste utilization are remarkable. Since, sericulture includes the preharvest systems of moriculture and also innovations in sericultural technologies, the improvement of pre and post harvest technologies needs to be converted into industrial and market oriented systems. Sericulture industry should not only be dependent on the silk but total utilization is a must for the waste generated from mulberry plants, silkworm rearing, grainages and silk reeling for different marketable products having great commercial values. Exploratory investigations in this direction will open up vistas of industrial exploitation in view of the advances in micro-biology, biotechnology, genetic-engineering, phyto-technology and industrial entomology. Such an integrated exploitation of the total sericulture resources will definitely bring down the cost of silk also. Today, in India alone, the silk export earning of about 9,000 million rupees can be increased manifold rapidly, if an integrated approach for utilization of all sericulture waste resources are exploited for sustainable sericulture and to make sericulture as a complete lifescience industry in this millennium.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Mr Ajay Mallhotra of this station for typing the manuscript. The assistance provided in various ways by Mr Ajay Sharma is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ASANO N., TOMIOKA E., KIZU H., MATSUI K. (1994) Carbohydrate Res., 253, 243-245.
- ASHOKKUMAR K., CHINYA P. K., CHOWDARY N. B., DATTA R. K. (2000) Silkworm pupa powder – a potential ingredient in fermenting media for production of lysine. Abst. seminar on sericulture technology: an appraisal, p. 52.
- BARUAH A. M., REDDY D. N. R., MALLESH B. C. (1999) Potentiality of eri silkworm wastes on oyster mushroom culture. Proc. national seminar on tropical sericulture. 28-30 Dec., p. 57.
- BHATTARI N. K. (1992) Int. J. Pharmacol., 30, 145-150.
- BOSE A. N. (1992) Protein from insect. Ananda Bazar Patrika, Calcutta Publication, daily newspaper, 21st June, p. 16.

- BOSE P. C. (1987) Mulberry is the medicine. *Indian Silk*, 26: 53-54.
- BOSE P. C., MAJUMDER S. K. (1990) Biochemical composition of pupae waste and its utilization. *Indian Silk*, 29, 45-46.
- BOSE P. C., MAJUMDER S. K., SENGUPTA K. (1989) Role of amino acids in silkworm, *Bombyx mori* L. nutrition and their occurrence in haemolymph, silk gland and silk cocoons – a review. *Indian J. Seric.* 28, 17-31.
- CALKIN V. P. (1947) *J. Amer. Chem. Soc.* 169, 384. In: Lecithin and its importance. *J. Sci. Ind. Res.*, 1995, 14 A, 290.
- CHANG-YONG Z., XIANG-GUO L. (1989) *J. Trad. Chin. Med. Chin., Mat. Med. Jilin*, 3, 17.
- CHAVAN S., CHINNASWAMY K. P., CHANGALERAYAPPA (1999) Influence of mulberry varieties and silkworm breeds on bio-chemical constituents of oiled and deoiled pupal powder. *Proc. National Seminar on Tropical Sericulture*, 28-30 Dec., p. 57.
- CHENG-XIANG Z., XIAN-PING T., BAOHAI G. (1989) *J. Trad. Chin. Med.*, 30, 101-102.
- CHINNASWAMY K. P., HARIPRASAD K. B. (1998) Utilization of mulberry crop residue as fuel wood. *Indian Silk*, 37: 17-18.
- CHINYA P. K., GOPAL N., ASHOKKUMAR K., ASWANIKUMAR C. (2000) Silkworm pupa waste – a potential resource for production of protease enzyme. *Abst. seminar on sericulture technology: an appraisal*, p. 51.
- CHOUDHARY P. C., DAS P. K., GHOSH A., MISHRA R. K., DATTA R. K. (1993) Recycling technology of sericultural waste as compost. *Indian Silk* 32: 28-30.
- DATTA R. K., CHATTERJEE S. N. (1991) Sericultural research and its impact in India. *Sericologia*, 31, 605-615.
- DANDIN S. B., JAYASWAL J., GIRIDHAR K. (2000) *Handbook of sericulture technologies*. Central Silk Board, India, pp. 55-60.
- DANDIN S. B., RAMESH S. R. (1987) A Kalpa Vruksha called mulberry. *Indian silk* 26: 49-53.
- DHAR A. K. (1997) Silk carpets of Kashmir. *Indian Silk*, 36: 33-35.
- FREDDY G. (1999) Emerging researches and innovations. *Express Textiles*, January.
- GAO-NIAN D. (1988) *Shaanxi J. Trad. Chin. Med.*, 4, 13.
- GARG N. K., BOSE S. K., GHATAK S. (1975) Lecithin from oil cakes. *Res. & Ind.*, New Delhi, 20, 58-60.
- GHATAK S., KRISHNAMURTHY C. R. (1995) Lecithin and its importance. *J. Scient. Ind. Res.*, 14A, 285-292.
- HAGA A., ZHANG M. (1988) Preparation of chitin from cuticle of silkworm and beetle. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67, 17-21.
- HONGULU J., SHANGGUAN Z., ZHUJING D. (1997) *Acta Sericologia Sinica*, 22, 4.
- HUI-RENG W. (1987) *Chin. J. Int. Trad. West Med.*, 7, 80-82.
- HUI S., SHAN-GUANG F., ZHE (1987) *J. Trad. Chin. Med.*, 22, 196.
- IIZUKA T., KOIKE S., MIZUTANI J. (1976) Isolation and identification of caffeic acid and 3-hydroxyanthranilic acid from faeces of silkworm larvae reared on the artificial diet. *J. Sericult. Sci. Japan*, 45, 321-327.
- IYENGAR M. N. S. (1998) Antibacterial peptides from silkworm to fight leukemia cells. *Indian Silk*, 37, 10.
- IYENGAR M. N. S. (2000) Research brief-Anti-fungal fraction from silkworm haemolymph. *Indian Silk*, 39, 12.
- JAIN S. K., DE FILIPPS A. (1991) *Medicinal plants in India*. Reference publications, Inc., Algonac, Michigan, Vol. II., 438.
- JAWAD A. M., JAFFER H. J., NAIB A. A., SABER H., RAZZAK A. A. W. (1988) *Fitoterapia*, 59, 130.
- JEFFERY B., BAXTER H.H., MOSS G. P. (1999) *Phyto-chemical Dictionary – A hand book of bio-active compounds for plants*, 2nd edition, Taylor & Francis Ltd., London, pp. 376.
- JERACE F. (1935) *Rass. Clin. Terap.*, 34, 88. In: Lecithin and its importance. *J. Sci. Ind. Res.*, 1995, 14 A, 289.
- JING-GUANG L., LIN H. (1989) *New J. trad. chin. med.*, 21, 37-38.

- JUN W., DE-SHAN Z., GUI-SHAN W., FU-NAN Y., YU-QING Y., JI M. (1987) Chin. J. Int. trad. west med., 7, 731-733.
- KAKO T., KATAYAMA A. (1989) Chitosan treatment of dyed silk fabrics. J. Seric. Jpn., 58, 374-379.
- KAKO T., KATAYAMA A. (1991) Effects of chitosan treatment on colour fastness properties of silk fabrics dyed with various dyes in a neutral dye bath. J. Seric. Sci. Jpn., 60, 66-68.
- KAKO T., KOMURASAKI K., KATAYAMA A. (1996) Effect of chitosan treatment on the air permeability and heating resistance of silk fabrics. J. Seric. Sci. Jpn., 65, 128-130.
- KATTI M. R., KAUR R., GOWRI S. (1996) Pupa skin - a useful waste, Indian Silk 35: 5-8.
- KE L., HUI-REN C., HUBEI (1988) J. trad. chin. med., 6, 19.
- KNORR D. (1982) Functional properties of chitin and chitosan. J. Food Sci., 47, 593-595.
- KRISHNASWAMI S., MADHAVARAO N. R., SURYANARAYAN S. K. (1972) Sericulture manual 3, Silk Reeling. FAO, Rome. Agricultural services bulletin, 15/3, p. 57.
- KUMAR V., NATARAJU B., DATTA R. K. (2000) Potential of wood ash from mulberry and coconut as disinfectant for sericulture. Indian Silk. 39, 11.
- KUNZE R. (1941) Lecithin, Verlag Rosenmeir & Saenger K. G. Berlin
- LIEBREEHT A. (1930) U. S. Pat. 1, 777, 173; Chem. Abstr., 25, 5554.
- MACHIDA Y. (1992) Application of chitin and chitosan to drugs. Pharm. Tech. Jpn., 8, 15-20.
- MACHII H. (1990) On gamma-aminobutyric acid contained in mulberry leaves. J. Sericult. Sci. Japan, 59, 381-382.
- MAJUMDAR S. K. (1992) Industrial Entomology - Integrated production and utilization of by-products through biotechnology of silkworm. National conference on mulberry sericulture research, CSR&TI, Mysore.
- MAJUMDER S. K. (1997) Scope for new commercial products from sericulture. Indian Silk 36 : 13-18.
- MAJUMDER S. K., DUTTA R. N., KAR R. (1994) The silkworm chrysalis may be a food source for human nutrition. Sericologia. 34, 739-742.
- MAJUMDER S. K., DUTTA R. N., KAR R., PAVAN KUMAR T. (1996) Pupa waste, an alternative resource for isolation of lecithin. Sericologia. 36, 555-557.
- MANDEL P. K. (1991) Sericulture waste utilization in China. Indian Silk 30 : 32.
- MING-HAN W., ZHU C. (1988) J. Trad. Chin. Med., 29, 840.
- NAGARAJAN P., RADHA N. V. (1990) Supplementation of amino acids through mulberry leaf for increased silk production. Indian Silk. 29: 21-22.
- NAIK S. V., HARIRAJ G., LAKSHMIPATHIAH B. N., NADIGER G. S. (1992) The silk waste - raw material for spun silk industry. Indian Silk. Dec., 15-17.
- NARAT J. K. (1938) J. Urol., 39, 75. In: Lecithin and its importance. J. Sci. Ind. Res., 1995, 14 A, 289.
- NOMURA T. (1988) Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. In: Progress in the chemistry of organic natural products. Eds. W. Herg, H. Grisebach, G. W. Kirby and Ch. Tamm, Springer-verlag, New York, 53, 88-201.
- OMORI M., YANO T., OKAMOTO J., TSUSHIDA T., MURAI T., HIGUCHI M. (1987) Effect of anaerobically treated tea (*Gabaron tea*) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61, 1449-1451.
- PHILIP T. (1989) Mulberry fruit - an ideal food. Indian Silk. 28 : 13-14.
- QI-ZHONG A., JIAN-HUA Y., YUE-MEI C., SHU-MEI Z., SHIHAO X., GONGZE Z., ZI-GONG (1989) J. Trad. Clin. Med., 30, 600-601.
- RAJIV S., KUMAR V. (1996) Sericulture by-products of China. Indian Silk. 35: 19.
- RAMAKANTH, ANANTHARAMAN K. V. (1997) Cocoon pelode for better health. Indian Silk. Dec.-Jan., 35.
- RASTOGI R. P., MEHROTRA B. N. (1995) Compendium of Indian Medicinal Plants., Vol. 5, PID, New Delhi, p. 484.
- RASTOGI R. P., MEHROTRA B. N. (1998) Compendium of Indian Medicinal Plants., Vol. 4, PID, New Delhi, p. 552-553.

- REVENASIDDIAIAH H. M., YASHODA BAI S. (1999) Extraction of paste chlorophyll from faeces of different larval of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Proc. national seminar on tropical sericulture, 28-30 Dec., p. 56.
- SAGAR B., HAMLYN P., WALES D. (1991) Manufacture of wound dressings from micro-fungal fibres. Eur. Pat. Appl., 460, 774.
- SENER B., BINJOL F. (1988) Int. J. crude drug res., 26, 197.
- SHIMIZU T., YAZAWA M., TAKEDA N. (1992) Aromatic amino acids in the leaves of *Morus alba* and their possible medicinal value. Sericologia. 32, 633-636.
- SHIVAKUMAR G. R., ANANTHA RAMAN K. V., MAGADUM S. B., DATTA R. K. (1995) Medicinal values of mulberry. Indian Silk. 34 : 15-16.
- SHUTANG Y., YU-FANG Z., SHU-ZHENG Y., ZHONG-QIN H., SHU-FENG Y. (1987) Shaanxi J. chin. trad. med., 8, 11.
- SINGH K. P., GHOSH P. L. (1992) Indian Silk, 31, 16-18.
- SINGHAL B. K., MALA V. R., KUMAR V. (1998) Indian mulberry sericulture – Problems & Prospects. Modern Textile Journal. 4: 27-35.
- SINGHAL B. K., CHAKRABORTI S., MALA V. R., SARKAR A., DATTA R. K. (2000) Photosynthesis for crop improvement in mulberry (*Morus* spp.) – a review. Sericologia. 40, 27-55.
- SINGHAL B. K., DHAR A., TRIPATHI P. M., QADRI S. M. H., BINDROO B. B., AHSAN M. M. (2001) Medicinal utilities of mulberry and non-mulberry food plants of the silkworms. Recent progress in medicinal plants. Research periodicals & book publishing house, Texas, USA (in press).
- SONWALKAR T. N. (1998) Utilization of by-products in silk industry. Indian Silk 37 : 24–27.
- SUGUN R., KUMAR V. (1996) Indian Silk. 34, 19.
- TALWALKAR R. T., GARG N. K., KRISHNAMURTHY C. R. (1965) Effect of fat free diet on the *in vitro* formation of lipid peroxides in rat tissues and succinate dehydrogenase activity and lipid composition of liver mitochondria. J. Fd. Technol., 2, 117.
- TALWALKAR R. T., GARG N. K., KRISHNAMURTHY C. R. (1966) Properties of phosphatides prepared from rice bran, *Cicer arietinum* and *Phaseolus aureus*. Ind. J. Biochem., 3, 124-127.
- TALWALKAR R. T., GARG N. K., KRISHNAMURTHY C. R. (1969) Production of lecithin from bengal gram and nutritional evaluation of the extracted flour. Res. & Ind., New Delhi, 14, 163.
- TSUSHIDA T., MURAI T., OMORI M., OKAMOTO J. (1987) Production of a new type tea containing a high level of gamma-aminobutyric acid. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61, 817-822.
- UMA H. P., GOURAMMA V., BAJPAI A. K., SINHA A. K. (1993) Resham Ke Hastshilp : Labhkari Aya Ke Shroth. Indian Silk, 32 : 53-56.
- VATHSALA T. V. (1997) Creativity in cocoon crafts. Indian Silk 36: 17-22.
- WEALTH OF INDIA : RAW MATERIALS (1962) CSIR, New Delhi, India. Vol. VI, p. 429.
- WEI-PING C., SHI-ZUO B., ZHE (1989) J. Trad. Chin. Med., 24, 98.
- WIE-XIN J., GUANG-VEN L., SHAO-XIA S., ZHEN-YING J., YIN-ZHEN C. (1988) J. Trad. Chin. Med., 29, 363-365.
- YA-RO C., DE YING Z., YUE-FANG X. (1989) J. Beizing College Trad. Chin. Med. 12, 24.
- YAN-YUAN H., JI-HUA P. (1991) Shaanxi Trad. Chin. Med., 12, 344-345.
- YAO-REN D., CHON-MING G., QING-LAI T., YING Y. (1987) Chin. J. Int. Trad. West Med., 7, 224-225.
- YI-BAO H. (1989) Shaanxi Trad. Chin. Med., 10, 441-442.
- YOKOYAMA T. (1962) Synthesized Science of Sericulture. Central Silk Board, India, pp. 242-253.
- YONG-CHANG S., ZHE (1987) J. Trad. Chin. Med., 22, 150.
- YOU X., JAIN-MIN W. (1994) Shaanxi Trad. Chin. Med., 15, 301.
- YOU-KUI W. (1991) Res. Trad. Chin. Med., 6, 48-49.
- ZU-YIN Y. (1989) Shaanxi Trad. Chin. Med., 10, 488.

EMERGENCE D'UNE BIO-INDUSTRIE DES PRODUITS DERIVES DE LA SERICICULTURE

B. K. SINGHAL, ANIL DHAR, ARADHANA SHARMA*, S. M. H. QADRI &
M. M. AHSAN**

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu-181101, Inde.

INTRODUCTION

La sériciculture en Inde fait partie de la culture indienne depuis des lustres. Selon la légende indienne, la sériciculture a été introduite il y a environ 2000 ans et le papillon qui produisait une fibre de soie jaune était très populaire à l'époque ancienne, bien que, selon les érudits européens, la soie chinoise bivoltine soit introduite en Inde en l'an 140 avant J. C. Même pendant l'occupation britannique, l'Inde produisait une bonne quantité de fil de soie local qui était exporté au Royaume Uni et en France et principalement utilisé dans l'industrie du parachute (Datta et Chatterjee, 1991). L'Inde a subi un revers pendant la période suivant la 2^{ème} guerre mondiale lorsque le fil de soie pour les parachutes a été remplacé par du fil de Nylon et la demande en soie a considérablement baissé. Cependant, la sériciculture en Inde a repris de manière importante surtout à la fin des années 1970 et 1980 et a atteint un niveau de production de plus de 14 000 tonnes en 1999-2000, ce qui place l'Inde au deuxième rang parmi les pays produisant de la soie après la République Populaire de Chine. Comme la soie est enracinée dans la tradition sociale indienne, le marché domestique est fort et la plus grande partie de la production de soie grège est consommée à l'intérieur du pays. L'Inde se distingue car elle est le seul pays dans le monde qui produit toutes les variétés de soie commerciales à savoir la soie mûrier, tasar, eri et muga.

En Inde, la sériciculture est une industrie artisanale pratiquée dans environ 59 000 villages. C'est une industrie qui utilise beaucoup de main d'œuvre et fournit des emplois à plein temps et à mi-temps à environ 6 millions de personnes (ce qui leur donne un revenu et en fait un des secteurs les plus importants de l'économie) grâce à la culture de la plante hôte et aux activités de production avant et après le cocon, (Singhal et coll., 1998). En 1999-2000, l'Inde a gagné plus de 9 milliards de roupies en devises en exportant plus de 40 millions de mètres carrés de produits en soie. La soie est agréable et saine pour l'environnement en raison de son caractère hygroscopique qui fait qu'elle absorbe l'humidité jusqu'à 30 % de son poids, ce qui rend son port plus confortable. Des efforts en recherche et en développement ont été entrepris afin d'augmenter les profits de cette industrie et ont permis d'augmenter la production de soie grâce à l'amélioration de la productivité des races de vers à soie et de leurs plantes hôtes, mais la soie n'est pas encore devenu un textile de l'homme de la rue. De plus, la tendance actuelle en matière de production de soie n'est pas très encourageante en raison des précipitations irrégulières, des importantes fluctuations de température, de l'usure des terres agricoles, du coût élevé des intrants et du prix comparativement bas des cocons sur le marché. Il est probable que la situation va s'aggraver encore plus avec l'application des normes de l'OMC et la mondialisation

* Regional Research Laboratory, Council of Scientific & Industrial Research, Jammu - 180 001, Inde.

** CSR&TI, Pampore, Cachemire, Inde.

qui fait que les importations de cocons et de fil bon marché vont rentrer en concurrence avec les produits indigènes. De plus, la génération actuelle des sériciculteurs passe progressivement à d'autres secteurs industriels plus profitables. L'augmentation du niveau d'éducation entraîne aussi un passage de l'industrie séricicole artisanale traditionnelle à des emplois urbains qui ne présentent pas de risques liés aux catastrophes naturelles, qui sont courantes dans un secteur comme la sériciculture.

Pour faire face à cette situation alarmante et aux défis du jour, il faut impérativement structurer, concevoir et approcher la diversification de la sériciculture d'une nouvelle manière et la mettre en application. Cela pourrait avoir lieu si notre Recherche et Développement comprend les besoins du jour, identifie et met au point des technologies qui peuvent pleinement utiliser les déchets de mûrier et de vers à soie pour créer des produits dérivés de valeur. Cela apportera des profits supplémentaires à la sériciculture et rendra cette industrie économiquement viable. Dans ce contexte, cet article traite des exploitations possibles de chaque élément de la sériciculture pour mettre au point des produits industriels à valeur élevée et faire de la sériciculture une industrie de bioressource scientifique naturelle de valeur.

EXPLOITATIONS INDUSTRIELLES

Bien que 1000 larves consomment 42 kg de feuilles, seuls 22,5 kg sont ingérés dans le corps de la larve et le reste part comme déchets. De plus sur la nourriture ingérée, environ 13 kg ne sont pas utilisés et sont évacués comme déchets par le ver à soie. Ainsi, pendant tout le cycle, une quantité substantielle de feuilles de mûrier résiduelles, de déchets de vers à soie, de nymphes, de papillons et de soie sont disponibles pour la mise au point de produits dérivés. Les œufs de vers à soie non utilisés, les coquilles d'œufs, les vers à soie malades, les excréments, les papillons qui ne sont pas utilisés dans l'alimentation peuvent arrondir le revenu du cultivateur de mûrier, du graineur, de l'éleveur, du dévideur et d'autres professions de manières variées. Les industriels peuvent convertir ces déchets en divers produits commerciaux de valeur. Nous présentons ici les exploitations viables sur le plan industriel et possibles de chaque composant séricicole pour faire de la sériciculture une industrie durable.

UTILISATION DU MÛRIER POUR OBTENIR DES PRODUITS INDUSTRIELS

Le mûrier, *Morus* sp., est principalement cultivé pour la production de sa feuille, et est la seule plante hôte du ver à soie, *Bombyx mori*. Il est surprenant que cette plante, le principal associé de l'industrie de la production séricicole soit aussi une bio-ressource importante pour plusieurs produits industriels comme on peut le voir dans le résumé ci-dessous.

Utilisation des tiges de mûrier pour fabriquer des produits commerciaux :

Les tiges sont une source de charbon de qualité et sont aussi utilisées pour l'extraction de produits chimiques à valeur ajoutée et pour les médicaments (Majumder, 1997). Les copeaux de mûrier sont transformés pour conditionner l'action de l'enzyme *in situ*, ils sont desquamés, séchés, coupés et réduits en pâte, collés et mélangés, servent à faire des nattes et sont pressés pour préparer des planches. On peut produire des fibres ressemblant à du coton à partir du phloème des pousses. Les fibres sont utilisées pour le filage tandis que l'on peut aussi préparer des fibres ressemblant à de la jute pour faire des cordes, des filets, etc. Les substances extraites des tiges sont efficaces pour améliorer la croissance des poils chez des animaux comme les lapins et les moutons, tandis que les polyphénols ou leurs dérivés, des polysaccharides comprenant de la pectine et du glueose forment un matériau visqueux utilisé pour assouplir la peau et les cheveux.

De plus, les brindilles de mûrier sont une ressource très utile pour la vannerie, pour laquelle il y a une forte demande surtout pour les travaux de construction civile. On estime qu'en moyenne on

peut fabriquer 2500 à 3000 paniers de taille moyenne à partir des brindilles disponibles sur un hectare de murai par an, ce qui donne un revenu d'environ 15 000 roupies (environ 319,56 US \$) / ha / an dans la région du nord de l'Inde.

La feuille de mûrier permet la fabrication du " thé kuwacha " :

Au Japon, on prépare du thé à partir de la poudre de feuilles de mûrier, et il est consommé par certaines personnes dans le cadre d'un régime traditionnel sain (Nomura, 1988). Tsushida et coll., (1987) et Machii (1990) ont mesuré l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans le thé et les feuilles de mûrier et mis au point " le thé gabaron " qui utilise le gaz N₂. Ce " thé gabaron " permet de lutter contre une tension élevée (Omori et coll., 1987). A présent le thé dérivé de la feuille de mûrier " Kuwacha-R " est commercialisé et est disponible chez Hoshina co. Ltd, Saitama, Japon. Pour explorer les fonctions biologiques de ce thé Shimizu et coll. (1992) ont analysé les feuilles de mûrier afin de trouver des quantités traces en acides aminés aromatiques. Un grand nombre d'amines biogéniques, comme la dopamine (DA), l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC), l'acide hydroxyphénylacétique (HPAC-4), le dopa (L-DOPA), le norepinéphrine (NE) et la tyramine (TYRA) sont détectées dans les feuilles (Tableau I). En tant qu'acides aminés, la kynurénine (KYN), le tryptophan (TRP) et la tyrosine (TYR-4) sont détectés dans les feuilles (Tableau I). On trouve aussi des mécanismes d'action métaboliques tels que $HPAC-4 \leftarrow TYRA \leftarrow TYR-4 \rightarrow L-DOPA \rightarrow DA \rightarrow NE/DOPAC$ pour la catécholamine. Il a été observé que la teneur élevée en L-DOPA pourrait agir comme un antiappétant sur les insectes. Shimizu et coll., (1992) ont observé que chez le mûrier, la teneur en DOPA se produit à une concentration bien moindre et pourrait ne pas avoir d'effets anti-appétents sur les insectes. La présence de gamma-GABA dans la feuille de mûrier pourrait réduire la tension artérielle élevée chez les êtres humains. Comme l'acide caféique a une activité anti-bactérienne très élevée (Iizuka et coll., 1976) Shimizu et coll. (1992) ont pensé que la présence de L-DOPA dans la feuille de mûrier pourrait agir comme un précurseur de l'acide caféique chez les mammifères. On a ainsi observé que comme les amines biogéniques et leurs précurseurs sont présents en quantités traces, le " thé Kuwacha " du mûrier peut être pris régulièrement sans effets pharmacologiques ou toxiques. Cependant, il faut éviter de trop consommer du " Kuwacha " à cause de la présence de gamma-GABA.

Le fruit du mûrier :

Les fruits du mûrier sont des syncarpes formés par le regroupement des épis des fleurs. Chaque fleur produit un fruit ressemblant à une noix entouré par des parties florales charnues. La forme et la taille des fruits varie d'une variété à l'autre. En général, ils sont ovoïdes ou globuleux ou de forme ellipsoïde à cylindrique. La couleur varie de blanc à blanc rosé, de violet à violet foncé jusqu'à noir. Dans le nord de l'Inde, le mûrier est en général cultivé comme un arbre dans la cour des maisons surtout pour ses fruits sucrés, goûteux, doux et parfumés. On récolte les fruits murs en secouant doucement les arbres, et ils sont mangés tels quels ou bien ils sont transformés en confiture, en gelée ou en sorbet. En Europe, on prépare aussi un vin qui est très populaire chez les femmes en faisant fermenter les fruits. Le jus de fruit est utilisé pour soigner les maux de gorge, la fièvre, la dyspepsie et la mélancolie (Philip, 1989).

Le mûrier comme fourrage :

La feuille de mûrier est aussi utilisée comme aliment pour le bétail, la volaille et les poissons. Les lapins aiment beaucoup les feuilles de mûrier. Les moutons de montagne se nourrissent avec ses feuilles qui leur permettent d'augmenter leur rendement en lait. En Chine et en Inde, les restes de feuilles et les détritiques de vers à soie sont donnés en nourriture aux vaches à lait (Dandin et Ramesh, 1987). Dans la partie vallonnée de la région de Kumaon (Uttar Pradesh, Inde) *Morus serrata* pousse dans les jachères et est très utilisé comme fourrage. En Chine, les déchets de la litière sont jetés dans les marres à poissons comme aliment nutritif.

Le bois de mûrier:

Le bois de mûrier est à la fois solide et souple et est utilisé pour produire des articles de sport et de luxe. Jallunder (Punjab) et Merrut (Uttar Pradesh) en Inde sont connus pour produire et vendre des articles de sport et de luxe faits à partir de bois de mûrier. Il existe environ 80 petites industries dans ces villes travaillant dans ce domaine. Le jeune bois de mûrier est blanc jaunâtre tandis que l'intérieur du bois est marron jaunâtre. Le bois jeune est aussi dur que le teck. Comme il est très résistant aux chocs, ne se casse pas, on l'utilise de préférence pour fabriquer des articles de sport comme les crosses de hockey, les bâtes de cricket et les piques de cricket. Le bois est très élastique, flexible et peut être plié à la vapeur et est donc utilisé pour fabriquer des raquettes de tennis. Le bois est facile à scier et s'écorce bien dans les ateliers de tournage et peut donc être utilisé pour produire des bobines, des manches d'outils et des jouets. Les meubles faits à partir de bois de mûrier ont une finition très lisse.

Le mûrier comme combustible :

Les muraies peuvent facilement être conçues de manière à répondre au besoin en combustibles des familles dans les zones rurales. Cet usage pourrait être popularisé particulièrement dans les ghats de l'ouest et dans la région himalayenne de l'Inde où de grandes parties de terres non arables sont disponibles pour la culture dans le cadre des programmes forestiers sociaux qui permettent aussi de promouvoir la sériciculture dans ces zones. De plus, le mûrier est l'une des plantes qui a la plus grande capacité de régénération après le bambou.

Chinnaswamy et Hariprasad (1998) ont trouvé que la valeur du mûrier comme combustible est bien supérieure à celle de la plupart des résidus agricoles et est proche de la valeur du maïs (Tableau II) recommandé pour l'agriculture forestière mais est moins proche de celles des espèces de bois de chauffe sélectionnées (Tableau III). Ainsi, la culture du mûrier, qui fait partie du secteur des combustibles non commercial pourrait définitivement appartenir au secteur commercial des combustibles et résoudre la crise énergétique des zones rurales où le mûrier peut facilement être cultivé et où on ne pratique pas la sériciculture.

Le bois de mûrier comme désinfectant potentiel en sériciculture :

Après avoir utilisé le bois de mûrier comme combustible, la cendre peut être utilisée comme viricide jusqu'à 80-90 % contre des virus du ver à soie comme la polyédrose nucléaire, la flacherie et la densonucléose (Kumar et coll., 2000). Ce type de propriété est dû à une alcalinité élevée et stable (pH 10,7 – 11,5) de la cendre de bois.

Le mûrier dans l'industrie du papier :

En Chine et en Europe, on enlève l'écorce des déchets et des branches de mûrier taillées dans l'industrie du papier (Dandin et Ramesh, 1987). La pulpe est obtenue par digestion à la soude caustique et le blanchiment au chlore. De plus, les jeunes pousses sèches, qui contiennent beaucoup de cellulose sont aussi utilisées pour fabriquer du papier. Le bois contient 32 % de tanin et convient pour tanner et colorer.

Le mûrier comme plante ornementale :

Il existe de nombreuses variétés de mûrier qui sont utilisées comme plantes d'ornement. Une des variétés de mûrier russe avec des tiges qui retombent, quand on les greffe à une certaine hauteur sur un porte-greffe adapté est un des meilleurs arbres pleureurs de pelouse. Ce type d'arbre est populaire en Amérique et connu sous le nom de mûrier pleureur " thé ". On dit que la variété *Venulosa* de *M. alba* avec des feuilles lobées attirantes est l'un des meilleurs mûriers ornementaux. Le mûrier n'est pas populaire en Inde comme plante ornementale bien qu'il soit couramment planté comme arbre faisant de l'ombre dans les zones du nord ouest de l'Inde.

Le mûrier dans l'industrie pharmaceutique :

Le mûrier occupe aussi une place importante dans le domaine de la médecine (Bosc, 1987 ; Shiva Kumar et coll., 1995 ; Dandin et Ramesh, 1987 ; Singhal et coll., 2001). Il contient des substances chimiques complexes comme d'autres plantes médicinales et a des propriétés médicales importantes dans des parties comme la racine, la feuille, la tige, le fruit et l'écorce.

On sait que la racine possède des propriétés anthelminthique et astringente (Bhattari, 1992). Les racines du mûrier noir, *Morus nigra*, ont un effet spécial sur le pancréas et sur la glycogénolyse. On donne ainsi du jus de racine aux diabétiques en décoction car il permet de réduire le taux de sucre dans le sang (Wealth of India, 1962). Le jus de la racine de mûrier a la propriété d'agglutiner le sang. Le médicament préparé à partir de la racine de *M. alba* s'appelle Glucosidae et peut être administré aux patients souffrant de tension artérielle élevée (Hui-reng, 1987 ; Singhal et coll., 2001). L'extrait méthanolique des racines a des propriétés anti-inflammatoire, exudative, proliférative et antipyrétique (Sener et Binjol, 1988 ; Jawad et coll., 1988). Comme le mûrier produit du latex, la blessure de la tige produit du latex qui coule librement et qui a la propriété de cicatriser les blessures et les plaies (Shivakumar et coll., 1995). Il peut être utilisé comme pommade dermique. L'écorce de la racine est utilisée comme purgatif et vermifuge (Singh et Ghosh, 1992). Les feuilles sont diaphorétiques et émollientes (Shivakumar et coll., 1995 ; Singhal et coll., 2001). Les feuilles peuvent être utilisées en décoction pour se gargariser afin de calmer une inflammation de la gorge (Shivakumar et coll., 1995). Une infusion de feuilles entraîne une baisse du sucre dans le sang, peut être diurétique et fait baisser la tension artérielle. Elle n'a pas d'effet sur la glucosurie. Les feuilles sont aussi utilisées pour la préparation du sirop de mûrier qui possède des propriétés réfrigérantes et laxatives. Le jus qui est réfrigérant peut être utilisé comme boisson dans les maladies à fièvre. Il laisse la peau lisse et en bonne santé. Les feuilles de mûrier agissent aussi comme un stimulant de la lactation chez le bétail (Singhal et coll., 2001). La feuille de *M. bombycis* contient du N-méthyl-1-deoxynojirimycine qui est utilisé comme un agent antidiabétique et inhibe l'infection due au virus humain HIV (Asano et coll., 1994). Le fruit après fermentation peut être utilisé comme boisson alcoolisée. Le fruit de *M. alba* a un effet rafraîchissant et laxatif. Il est utilisé pour les maux de gorge, la dyspepsie et la mélancolie (Jain et De Filippis, 1991). Le jus de fruit est aussi couramment utilisé pour réduire les fièvres importantes en tant que fébrifuge. C'est le premier traitement normalement donné à n'importe quel patient avec des symptômes de fièvre pendant une endémie de malaria (Shivakumar et coll., 1995). Il est aussi utilisé pour donner de la force et résister à une fièvre élevée. Il a la propriété de prévenir la diarrhée et le froid. Cependant, il faut l'éviter quand les patients ont une amibiase. Les sirops et les recettes préparés à partir des fruits de *M. alba* sont utilisés contre l'hyperlipémie (Shu-tang et coll., 1987), la constipation et l'insomnie (Ming-han et Zhu, 1988), le vieillissement (Yao-ren et coll., 1987) la diarrhée et l'apoplexie (Cheng-xiang et coll., 1989). Les décoctions préparées à partir des fruits sont utilisées contre l'athérosclérose cérébrale (Yong-chang, 1987), la néphrite chronique (Jun et coll., 1987), l'asthénie du foie (Wic-xin et coll., 1988), Alopecia areata (Ke et coll., 1988), la rétinite (Gao-nina, 1988) et le cancer nasopharyngien (Jing-guang et Lin, 1989). L'écorce de la racine a un goût amer est quelque peu âcre et possède des propriétés cathartique et anthelminthique. Son jus aide à tuer les vers ronds (*Ascaris* sp.), les vers du *Taenia* sp. et les vers à crochets (*Ancylostoma* sp.) dans le système digestif (Shivakumar et coll., 1995). Plusieurs décoctions préparées à partir de l'écorce de racine sont utilisées contre la néphrite aiguë (Hui et coll., 1987), l'asthme des bronches (You-kui, 1991), la pneumonie (Yan-yuan et Ji-hua, 1991), la cirrhose (You et Jain-min, 1994), l'aéné (Ya-ru et coll., 1989), la pertusis (Qi-zhon et coll., 1989), la coqueluche (Yi-bao, 1989), la pneumonie sénile (Zu-yin, 1989) et l'hémoptysie (Wei-ping et coll., 1989). L'écorce de la racine de *M. nigra* contient du deoxyjirimycine (DNJ), un alcaloïde que l'on sait être efficace contre le virus du SIDA (Singh et Ghosh, 1992).

De plus, un bon nombre de composés biochimiques sont isolés à partir du mûrier. Une substance biochimique appelée Moranoline isolée à partir du mûrier, contenant 5 atomes de carbone et un atome d'azote est à l'étude par un groupe de chercheurs japonais pour son usage possible dans l'industrie

pharmaceutique (Jeffery et coll., 1999). L'alba furan A ($C_{24}H_{26}O_4$) est localisé dans l'épiderme de la pousse de *Morus alba* avec l'alba furan B, un isomère ayant une activité antifongique (Jeffery et coll., 1999). Rastogi et Mehrotra (1995, 1998) ont indiqué que l'Albanol A ($C_{34}H_{26}O_8$) et le Mulberrofuran G que l'on trouve dans l'écorce de la racine de *Morus alba* et chez d'autres espèces ont une activité hypotensive. La morusine isolée chez le mûrier peut inhiber l'activation de la protéine kinase C par la télécidine *in vitro*. Ils ont de plus affirmé que le pré-traitement des peaux de souris avec de la morusine pendant 10 minutes inhibe l'induction de l'ornithine décarboxylase par la télécidine. A cet égard, trois composés supplémentaires médicinaux ont été isolés du tissu du cal du mûrier : le Mulberrofuran-T, le Kuwanol-E, le calystegin-Ci et (I) – l'hydroxymoracine-N (Rastogi & Mehrotra, 1995). On a trouvé que la morusine, la 4-glycoside morusine et le Kuwanon H isolés à partir de la racine ont un effet contre le HIV (Singh et Ghosh, 1992).

LES DECHETS DE VERS A SOIE UTILISES POUR FABRIQUER DES PRODUITS INDUSTRIELS COMMERCIAUX

La quantité de nymphes sèches du ver à soie du mûrier disponible en Inde est environ égale à la production de soie grège, soit environ 14 000 tonnes (Sonwalkar, 1998). A présent, les nymphes ne sont pas efficacement exploitées pour être utilisées dans des produits industriels utiles. Cela serait nécessaire non seulement pour rendre le secteur du dévidage de la soie plus viable et stable mais aussi pour créer plus d'emplois. Les produits industriels dans ces domaines peuvent être les suivants :

Peptides anti-bactériens pour lutter contre les cellules de la leucémie :

Selon des chercheurs chinois, les peptides anti-bactériens présents dans le ver à soie du mûrier sont actifs contre certaines maladies chez les êtres humains (Iyengar, 1998). Hongulu et coll. (1997) ont observé que les peptides anti-bactériens de *Bombyx mori* tuent les cellules K562, *Myelogenous leukemia*. Ils ont signalé que le composant B du peptide anti-bactérien purifié à partir de l'hémolymphe de la nymphe de ver à soie induit par *E. coli* pouvait tuer les cellules de K562, *Myelogenous leukemia* cultivées *in vitro* mais n'ont pas d'effet sur les leucocytes B humains normaux. L'ultra-structure des cellules K562 et des leucocytes B traitées avec des peptides anti-bactériens présentent des changements pathologiques, c'est à dire que la membrane se casse, les mitochondries enflent et des substances intracellulaires s'échappent et les cellules meurent rapidement. Mais des rapports indiquent que les leucocytes B traités demeurent pareils à ceux du témoin non traité. Mandel (1991) a rapporté que la Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine a mis au point "le ganxuebae" à partir des excréments du ver à soie, qui a un taux d'efficacité de 95,6 % chez le patient du cancer.

Fraction antifongique dans l'hémolymphe du ver à soie :

Iyenger (2000) a fait remarquer que l'équipe japonaise de chercheurs de la Station Séricicole Expérimentale de la Préfecture de Miyagi et de la Faculté d'Agriculture de l'Université d'Iwate a préparé une fraction antifongique à partir de l'hémolymphe du ver à soie par extraction au méthanol acide et HPLC. Elle a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae*, de *Fusarium oxysporum*, *F. cucurmerinum*, *Glomerella cingulata* et d'*Alternaria porri*.

Le mûrier utilisé comme produit alimentaire commercial :

Dans les pays comme Hong-Kong, la Chine, la Corée et le Japon, les larves de ver à soie en bonne santé sont stérilisées et séchées à l'air et vendues comme produit alimentaire commercial. Elles sont utilisées sous forme de poudre, comme une source ordinaire de protéines animales dans les soupes et les sauces préparées. Elles sont utilisées dans les régimes spéciaux pour les malades cardiaques et diabétiques en raison de leur faible teneur en cholestérol.

Produits commerciaux à partir des déchets de chrysalides :

Bose et Majumder (1990) ont observé que la poudre de chrysalides contient de l'eau (7,18 %), des graisses (29,57 %), des protéines (49,98 %), du glycogène (4,65 %), de la chitine (3,37 %), des cendres (2,19 %) et d'autres substances comme les vitamines, etc... (3,7 %), ce qui prouve que les nymphes sont une bonne source de graisses et de protéines.

Extraction de l'huile à partir de la poudre de chrysalides :

Pendant leur développement biologique, les nymphes synthétisent de l'huile qui peut être extraite de la poudre de chrysalides selon deux techniques, décrites par Bose et Majumder (1990). La première technique est la méthode d'extraction avec un solvant, tandis que la deuxième se fait en les pressant. Le processus d'extraction de l'huile est simple et comparable à l'extraction d'huile dans de nombreux autres produits. Pour extraire l'huile, les nymphes sèches et propres sont dans un premier temps trempées dans un solvant comme de l'hexane, du benzène, de l'alcool, du chloroforme, de l'éther, de l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet, puis elles sont filtrées et on fait évaporer le solvant. Les vapeurs du solvant sont condensées à l'état liquide et réutilisées dans le procédé. Il n'y a presque aucune perte de solvant pendant toute l'opération. L'extraction de l'huile peut être faite avec le solvant à froid ou à chaud. Les pourcentages d'huile extraite avec différents solvants sont présentés dans le Tableau IV. Il est évident que la méthode d'extraction à chaud donne un pourcentage plus important d'huile que l'extraction à froid. Parmi tous les solvants, le chloroforme est le meilleur solvant d'extraction. L'huile peut être raffinée par distillation ou par filtrage avec du charbon actif. Il n'y a donc pas de problème d'odeur avec l'huile. Le problème qui se pose est celui du coût de l'ensemble du procédé, c'est à dire de la rentabilité.

Propriétés physiques de l'huile de chrysalides :

L'huile fraîchement extraite a une couleur marron et une odeur de poisson. Elle est transparente et légèrement acide (pH autour de 6). Elle ne s'émulsionne pas dans l'eau mais dans une solution de carbonate de sodium, cependant, l'huile se sépare au bout d'un certain temps de conservation. L'huile est soluble dans l'éther, l'éther de pétrole (40 à 60° C), l'acétone, l'isopropanol, le xylène, le tétrachlorure de carbone, l'alcool absolu, l'acide acétique glacial, l'éthylacétate, le n-propanol et partiellement soluble dans de l'alcool rectifié, de l'acide formique et du dihexane. Les études expérimentales ont montré que l'indice d'iode et l'indice de saponification de l'huile de nymphe de *Bombyx mori* sont de respectivement 110 et 210, et sont comparables à ceux de l'huile de tournesol. La valeur de saponification, la valeur acide et la valeur d'estérification de l'huile de nymphe d'*Antheraea assamensis* sont de respectivement de 190,2 ; 131,2 et 59.

Valeur commerciale de l'huile et de la poudre de chrysalides :

Les déchets de nymphes, qui incluent l'huile et la poudre, ont une grande importance et peuvent être utilisés de manières variées. L'Italie est le deuxième producteur d'huile de chrysalides après le Japon (Bose et Majumder, 1990). L'huile de lin (75 %) mélangé avec de l'huile de chrysalide (25 %) peut être utilisée pour la préparation de peintures et de vernis. On peut isoler du stérol de l'huile qui est un très bon tonique pour les cheveux. Il peut être utilisé pour la fabrication de savon. Le problème de l'huile de nymphe est qu'il sent mauvais, ce qui restreint son usage. Si on peut améliorer son odeur et on peut le raffiner pour obtenir de l'huile blanche (sans odeur et sans couleur), elle peut être utilisée pour l'opération de tannage des peaux. On peut aussi utiliser l'huile de chrysalide pour la faire brûler. L'huile peut être hydrogénée pour former une graisse blanche (acide stéarique, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$) qui peut être utilisée dans la préparation de savons et de bougies de qualité supérieure (Bose et Majumder, 1990). L'huile de chrysalides est aussi utilisée pour fabriquer un composant le "Ganmail", qui est utilisé dans les maladies du foie et du sang (Sugun et Kumar, 1996). L'huile de nymphe peut être utilisée comme un matériau de moulage dans l'industrie de la Bakelite. La poudre de nymphe (après extraction de l'huile) est généralement utilisée comme nourriture pour les volailles,

les poissons et les pores parce qu'elle est riche en protéines. L'aliment extrait des nymphes est mélangé avec la nourriture pour la volaille. Les poules voient leur capacité de ponte améliorée quand leur nourriture est complétée avec ce produit et cela semble avoir un effet sur la couleur du jaune d'œuf. En fait, la protéine de la nymphe est meilleure que la protéine du soja, du poisson ou du bœuf. Le tréhalose est un autre produit qui peut être obtenu à partir des larves ou des nymphes. Chavan et coll., (1999) ont observé un changement des composants biochimiques dans la poudre de nymphe contenant de l'huile et dans celle dont l'huile a été extraite chez différentes races de vers à soie élevés sur différentes variétés de mûrier. On enregistre une plus grande teneur en N, P, K et en protéines chez les nymphes dont l'huile a été extraite que chez les nymphes contenant de l'huile chez les lignées bivoltines (NB₄D₂). Baruah et coll., (1999) ont évalué les profits nets (65,80 roupies) et le rapport coût-bénéfice (0,54) pour la production de champignons noirs *Pleurotus sajorajaju*, élevés sur des couches de déchets de vers à soie eri, par comparaison à la paille de riz, qui est la couche traditionnellement utilisée ; ceci pourrait être exploité en Inde où il y a énormément de déchets provenant de l'industrie séricicole eri.

Les chrysalides de vers à soie comme source de nourriture pour l'alimentation humaine :

Les nymphes de vers à soie constituent une nourriture nutritive pour l'alimentation humaine car elles contiennent une quantité équilibrée d'humidité, de chitine, de protéines solubles, d'hydrates de carbone, d'acides aminés et de vitamine C, en plus des protéines brutes qui en sont le composant principal (Majumder, 1992 ; Majumder et coll., 1994) (Tableau V). De plus, elles contiennent une grande quantité de produits minéraux importants sur le plan nutritionnel comme le Na, K, Ca et P. Par ailleurs, elles constituent un aliment qui contient aussi des vitamines, surtout de la vitamine B₂, de l'acide nicotinique, de l'acide folique et de la vitamine B₁ (Bose et Majumder, 1990). Elles sont recommandées comme un supplément idéal pour prévenir la malnutrition. Les déchets de nymphes ont une composition bien équilibrée en acides aminés (Tableau VI). Les acides aminés importants sur le plan nutritionnel chez les nymphes de vers à soie sont similaires à ceux du tableau de référence de la FAO pour les acides aminés essentiels des protéines comme la lysine, l'isoleucine, la leucine, la valine, la méthionine et la thréonine mais sont plus riches en acides aminés non essentiels comme la glycine, la serine et l'alanine (Bose et coll., 1989). De plus, la nymphe est riche en proline, elle contient de la tyrosine, de l'arginine et de l'histidine en quantité modérée et peu d'acide glutamique. Yokoyama (1962) a signalé que la valeur nutritive de la nymphe est même supérieure à celle du poisson et n'est pas inférieure à celle du bœuf. Selon Krishnaswami et coll., (1972) les nymphes sont favorables dans la consommation humaine. Plusieurs chercheurs ont suggéré que la valeur alimentaire des insectes, y compris celle des lépidoptères est plus ou moins équivalente à celle de la nourriture à base de poulet (Bose, 1992). Dans la région de l'Assam en Inde, les nymphes eri sont frites dans de l'huile, avec des épices et elles constituent un plat succulent. Les anciens grecs et romains utilisaient la poudre de nymphe pour la préparation du pain et des gâteaux. En Chine, les enfants préfèrent les nymphes au chocolat. Les Indiens d'Amérique utilisent les nymphes sèches dans la farine et les galettes (Bose, 1992). Il a même été observé que les vietnamiens mangent les larves de vers à soie telles qu'elles.

Utilisation des déchets de chrysalides pour isoler la lécithine :

La lécithine, un phospholipide distribué dans les tissus des animaux et des plantes est un constituant primaire des cellules (Kunze, 1941). Elle est largement utilisée dans plusieurs produits alimentaires et pharmaceutiques (Ghatak et Krisnamurthy, 1955). Elle est utilisée comme un antioxydant dans les huiles végétales et les huiles de foie de poisson (Calkin, 1947) en raison de sa solubilité élevée dans les graisses et dans les huiles, de sa comestibilité et de l'absence d'effets nocifs sur les produits. Elle était auparavant utilisée dans les produits pharmaceutiques, dans la thérapie anti-malaria (Jerace, 1935), contre la syphilis (Liebrecht, 1930) la pyélite (Narat, 1938), etc... Majumder et coll., (1996) ont signalé que plus de 200 tonnes de lécithine sont importées annuellement en Inde. Pour obtenir de la lécithine, on utilise le jaune d'œuf, le soja, les graines de moutarde, les

légumineuses et les tourteaux de moutarde comme matières premières pour la production commerciale (Ghatak et Krishnamurthy, 1955 ; Talwalkar et coll., 1965, 1966, 1969 ; Garg et coll., 1975). En raison du coût élevé et des autres usages plus importants de ces matières premières, il faudrait absolument trouver une autre source meilleur marché de lécithine. Majumder et coll., (1996) ont détecté de grandes quantités de lécithine dans les déchets de nymphes de vers à soie, qui peuvent être exploitées comme une ressource indigène naturelle pour isoler la lécithine.

Le tégument de chrysalides :

Les peaux de nymphes sont disponibles dans les industries de dévidage et de grainage et sont jetées comme des déchets, ce qui entraîne de la pollution. Dans l'industrie du dévidage, elles sont disponibles en tant que nymphes et dans les centres de grainage en tant que peaux. Elles sont composées de chitine qui est un polysaccharide dont la structure est similaire à celle de la cellulose.

La chitine est le deuxième matériau le plus abondamment disponible sur terre. On la trouve sur les exosquelettes des arthropodes, tels que les insectes et les araignées, chez certains champignons et chez les crustacés tels que les crabes et les crevettes. C'est un long polysaccharide sans chaînes latérales [N-acétyl-2-amino-2-deoxy-beta-D-glycopyranose] et il peut être considéré comme un dérivé de la cellulose, dans lequel le groupe hydroxyl en position C-2 a été remplacé par le groupe acétylamino – NHCOCH_3 . La chitine peut être transformée en divers produits utiles comme le chitosan, le sulfate de chitine, le nitrate de chitine, le xanthate de chitine, la chitine de carboxyméthyl de sodium, etc... Elle peut être hydrolysée avec des enzymes et des acides. La chitine est préparée à partir de l'épiderme des vers à soie (Haga et Zhang, 1988).

APPLICATIONS DE LA CHITINE ET DE SES DERIVES

La chitine a des applications très limitées à cause de son association très étroite avec les protéines et de son insolubilité extrême. Cependant, ses dérivés trouvent un usage dans des domaines variés.

La chitine :

Elle trouve son usage comme additif pour augmenter le volume du pain à base de farine de blé d'environ $4,9$ à $6 \text{ cm}^3 / \text{g}$. Elle a une plus grande capacité de liaison de l'eau que la micro-cellulose qui à son tour a une plus grande capacité de liaison des graisses que la chitine micro-cristalline (Knorr, 1982). L'utilisation de préparations à base de chitine pour le traitement post-opératoire des opérations intranasales telles que la conchotomie, la déviatomic, la polypectomie montre qu'elle est facile à utiliser et qu'elle hâte la guérison des plaies (Sagar et coll., 1991).

Le chitosan :

Le chitosan a une forte activité anti-microbienne contre des bactéries et des champignons variés (Machida, 1992). Le Chitopoly est une fibre polynosique mélangée au chitosan. Il a une action antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, etc.. (Katti et coll., 1996). Le Chitopoly est largement utilisé comme fil tissé mélangé avec du coton, du polyester, de l'acrylique et de la rayonne, tandis que le Chitosunny, un mélange de Chitopoly et de coton a une activité antifongique contre *Trichophyton equinum* (Katti et coll., 1996). Ainsi, le Chitosunny est utilisé pour faire des chaussettes pour le traitement du pied des athlètes. Le chitosan de poids moléculaire faible [LMCS] a une activité inhibitrice de la colonisation de *Streptococcus mutans* sur la surface des dents des rats et une activité tampon contre les acides produits par les bactéries de la plaque, ce qui inhibe l'augmentation des caries dentaires chez les rats (Machida, 1992). Le chitosan a un rôle d'immuno-adjuvant comme agent antiviral et stimule aussi la lymphokine et agit comme un agent antiviral et anti-tumeur (Katti et coll., 1996). Ces auteurs ont de plus mentionné qu'en tant qu'agent anti-fuligineux, il empêche les bactéries carcinogènes dans les dents (Katti et coll., 1996).

En raison de sa faible toxicité, la membrane du chitosan régénérée a des effets excellents sur la guérison des blessures (Sagar et coll., 1991). Avec le traitement au chitosan, la résistance des couleurs des tissus de soie teints augmente (Kako et Katayama, 1989, 1991). Le traitement au chitosan permet aussi d'augmenter la perméabilité à l'air et la résistance à la chaleur des tissus de soie (Kako et coll., 1996).

Le fil de soie des tissus traités au chitosan s'avère résister au jaunissement dû à la lumière. Katti et coll., (1996) ont mentionné que le chitosan est utile comme membrane bio-compatible pour contrôler le saignement dans les grandes opérations. La chitine et le chitosan ont tous les deux des applications pour le pansage des plaies et pour les lentilles de contact. Ils sont aussi utiles pour le renforcement des propriétés de dissolution des médicaments qui ne se solubilisent pas facilement tels que la griséofulvine, la phénytoïne, le phénobarbital, le predni-solone, l'acide flufénamique et l'indométhacine.

VINS MEDICAMENTEUX A PARTIR DES PAPILLONS DU VER A SOIE

On détruit en général les papillons après avoir obtenu la soie grège des cocons. Maintenant, les chercheurs chinois font des efforts pour préparer des vins médicamenteux à partir des déchets de papillons. Le vin le plus connu a été préparé à partir de papillons mâles à la Shaanxi Sericultural Technology Station en Chine (Mandel, 1991, Rajiv et Kumar, 1996). Le produit appelé de manière populaire " vin de papillon " peut être utilisé pour guérir l'impuissance, les menstruations anormales et les symptômes de la ménopause.

LA PELETTE DE COCON DANS L'ALIMENTATION HUMAINE

La couche interne de la coque du ver à soie, appelée en général " pellette " est maintenant devenu un ingrédient de valeur dans la nourriture humaine en Chine et au Japon. On peut obtenir la pellette à partir des cocons dévidés après avoir enlevé les nymphes. Chimiquement, elle a les mêmes propriétés que la soie. On obtient un kilo de pellette à partir d'environ 10 kg de cocons dévidés. Ce produit est utilisé comme source de protéines et d'acides aminés. Commercialement connu sous le nom de " Fibroïne Shinki " au Japon, cette protéine est hydrolysée à partir des déchets de fibres de soie par traitement enzymatique et raffinée chimiquement pour être utilisée dans la préparation d'articles alimentaires. Ces hydrolysats riches en bi et tri-peptides sont maintenant disponibles comme des nourritures de sevrage et sont très nutritifs. Etant de nature protéique, elle est relativement efficace pour le développement général du corps humain. La composition en acides aminés de la pellette est présentée dans le Tableau VII. Elle est soluble à l'eau, jaune clair avec un goût léger acceptable. Elle est facilement digérée et assimilée et a la propriété de faire baisser le cholestérol et le sucre dans le sang tout en fournissant une énergie supplémentaire (Ramakanth et Ananthraman, 1997). On peut l'utiliser en ajoutant 1 à 5 % de " fibroïne Shinki " au produit alimentaire. En général, on en consomme 5 g par jour (2 g / par tasse) dans le lait ou le café. Ce produit doit être stocké dans un récipient hermétique en raison de sa nature hygroscopique.

LES RESTES DE CHRYSALIDES DE VERS A SOIE COMME RESSOURCE POTENTIELLE POUR LA PRODUCTION DE PROTEASE

Chinya et coll., (2000) ont mis au point une technologie pour la production de protéase, une enzyme importante sur le plan commercial, en utilisant une culture bactérienne isolée à partir des restes de nymphes décomposées comme agent d'inoculation dans le milieu en fermentation. Ils

pensent que la technologie mise au point devrait être exploitée industriellement de manière à générer plus de profits.

LES DECHETS DE CHRYSALIDES DE VERS A SOIE COMME INGREDIENT POTENTIEL PERMETTANT D'OBTENIR UN MILIEU DE FERMENTATION POUR LA PRODUCTION DE LYSINE

Ashok Kumar et coll., (2000) ont trouvé que les déchets de nymphes sont un substrat potentiel pour obtenir un milieu de fermentation permettant de produire de la lysine d'une manière microbiologique, l'acide aminé le plus important pour l'industrie pharmaceutique.

USAGES COMMERCIAUX DES PRODUITS DERIVES DE LA SOIE

La soie produite par le ver à soie est non seulement une fibre de qualité supérieure mais aussi un biopolymère possédant des propriétés mécaniques exceptionnelles (Freddy, 1999). Elle est utilisée pour faire des sutures en raison de ses propriétés mécaniques excellentes et de sa résistance. La soie peut être ajoutée aux textiles médicaux sous la forme de fibres. En raison de sa résistance mécanique on peut utiliser la fibre de soie pour les tendons, les ligaments artificiels, dans les vaisseaux sanguins et pour les greffes de la peau. Elle peut être utilisée dans les lentilles de contact ou dans un système de réhabilitation avec des drogues impliquant une régénération des tissus ou même pour le traitement des brûlés. Des recherches sont en cours pour mettre au point des matériaux avec d'autres usages bio-technologiques.

PRODUITS COMMERCIAUX OBTENUS A PARTIR DES DECHETS DE SOIE

Ces produits dérivés de l'industrie séricicole sont importants. Ils comprennent les cocons non dévidables, percés, doubles ou défectueux et les déchets de dévidage, de redévidage et de torsion. Les déchets de soie représentent environ 20 à 30 % du coût total de la production de soie. Les déchets de soie obtenus pendant les différentes étapes des activités séricicoles peuvent être réutilisés très efficacement.

Régénération de la fibroïne de soie à partir des déchets de soie :

Méthode avec de l'acide formique et du chlorure de calcium :

50 g de filament de soie décreusé sont dissous dans une solution contenant 500 ml d'acide formique (85 %) et 50 g de chlorure de calcium anhydride. Le ratio de soie : chlorure de calcium : acide formique est le suivant 1 : 1 : 10. Le filament est ajouté lentement à la solution en mélangeant constamment et la solution est ensuite reprécipitée en utilisant de l'eau. Au début, on ajoute lentement de l'eau en remuant constamment jusqu'à ce qu'on obtienne un précipité blanc. On laisse ce précipité reposer pendant la nuit pour qu'il forme un gel. Puis le précipité est filtré en utilisant un creuset en verre et lavé avec de l'eau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de traces d'acide formique. La fibroïne de soie ainsi régénérée est séchée au four à 65° C et finalement moulue en poudre fine granulée et stockée pour des applications ultérieures.

Méthode avec le bromure de lithium :

Les déchets de soie décreusée (7,5 g) sont dissous dans une solution de bromure de lithium à 9,3 M fraîchement préparée en mélangeant constamment. On laisse la solution de déchets de soie qui en résulte reposer pendant 2 h. On ajoute de l'acétone lentement en mélangeant constamment pour

précipiter la fibroïne de soie. Le précipité est ensuite filtré en utilisant un creuset de soie fritté et lavé avec de l'acétone puis l'excès de bromure de lithium est lentement remplacé par du méthanol et lavé avec de l'eau. Finalement le précipité est séché au four à 65° C et moulu en une fine poudre granulée puis stocké.

Utilité de la poudre de fibroïne régénérée :

Cette solution de poudre de fibroïne est utilisée pour le rembourrage à 100 % des tissus polyester. Le tissu est rembourré en utilisant un procédé nip à un dipone à l'aide d'un appareil de rembourrage pneumatique avec une pression de 4 bars. Les échantillons rembourrés sont rincés avec de l'eau froide et séchés à l'air.

Ainsi, 100 % de l'échantillon de polyester est rembourré avec une solution à base de poudre de fibroïne régénérée soit avec de l'acide formique soit avec du bromure de lithium préparées dans 33 % d'acide formique.

La fibroïne de soie a de nombreuses applications dans l'industrie textile pour faire du tissu polyester présentant une meilleure absorption de l'humidité sans avoir un effet significatif sur les propriétés inhérentes du polyester (Raje et coll., 1998).

LES DECHETS DE SOIE EN TANT QUE MATIERE PREMIERE POUR L'INDUSTRIE DE LA SOIE FILEE

Deux variétés de fils sont fabriquées à partir de la fibre de soie naturelle : le filament de soie (soie grège) et la soie filée. Le filament de soie est dévidé à partir des cocons, tandis que la soie filée est obtenue à partir des déchets de soie. Dans la soie dévidée, plusieurs filaments sont rassemblés à partir des cocons et transformés en un fil unique, tandis que pour la soie filée, les fibres sont filées et sont transformées en fil. Ainsi, le fil de soie filée est du fil de soie mouliné tout prêt pour être utilisé dans le tissage.

Les déchets de soie qui sont générés par le dévidage forment une matière première pour la fabrication de fil de soie filée. Les déchets de soie sont la partie non dévidable du cocon. Les déchets de soie obtenus pendant le dévidage représentent 28 à 35 % du poids de la soie dévidée (en excluant les déchets de cocons) ce qui est assez élevé par rapport aux transformations d'autres fibres textiles. En dehors de ces déchets de soie, un autre type de déchets de cocons est disponible en petite quantité, ce sont les cocons percés et coupés provenant des magnaneries et des centres de grainage.

Les cocons inférieurs / défectueux qui ne conviennent pas pour le dévidage commercial existent aussi. L'utilisation industrielle des déchets de soie est résumée dans le Tableau VIII.

Utilisation de la soie filée :

La soie filée peut être utilisée comme la soie pure car elle a un bel aspect. La soie filée à la main trouve de nombreuses utilisations pour la production d'une gamme étendue de produits tels que les tissus pour les vêtements et l'ameublement, qui sont très demandés pour les exportations. Elle est très utilisée pour les tapis et pour isoler les fils et les câbles électriques et aussi pour la production de courroies industrielles. Elle est même utilisée pour les complets, les chemises, les sarrees, les cravates, les tissus pour les rideaux, le fil de couture, etc.. (Naik et coll., 1992). Ainsi, l'industrie de la soie filée joue un rôle vital dans l'économie de l'industrie séricicole et surtout pour l'industrie de la soie du dévidage.

COCONS POUR L'ARTISANAT

M. Ronald Currie, Secrétaire général de l'Association Internationale de la Soie, en France pense que l'artisanat du cocon est un produit dérivé très intéressant pour la sériciculture. Il convient surtout aux personnes les plus déshéritées, qui ont des aptitudes, du temps libre et bien sûr le besoin de faire quelque chose de spécial. On estime qu'il pourrait y avoir un gain de l'ordre de 10 à 25 % dans des secteurs variés avec une gestion et une utilisation efficaces des produits dérivés. L'utilisation de cocons coupés et percés dans l'artisanat augmente régulièrement et gagne en popularité. Dans ce but, les cocons percés sont coupés, lavés et teints pour faire de magnifiques guirlandes, vases de fleurs, couronnes, porte-crayons, poupées, bijoux, tableaux, assiettes décoratives, pendules, cartes de vœux, bouquets et bien plus encore (Uma et coll., 1993 ; Vathsala, 1997). Ces différents types d'artisanat sont en général vendus dans des bazars avec un profit net d'environ 50 %. De tels produits artisanaux embellissent les salons dans les maisons. Ils sont maintenant devenus une source de revenus pour de nombreuses familles dans les campagnes. A cet égard, le gouvernement du Karnataka en Inde a ouvert une école de formation en sériciculture à Channapatna dans le Karnataka. Depuis peu, les tapis de soie émergent comme un secteur qui permet de faire rentrer des devises. Les tapis fabriqués dans le Cachemire, en Iran, en Turquie sont très populaires dans le monde entier (Dhar, 1997). Les exportations de tapis de soie en Inde rapportent plus de 900 millions de roupies en devises (environ 19 millions de dollars US). Les principaux marchés sont l'Allemagne de l'Ouest, la Suisse, l'Italie, la France, le Royaume Uni et les U.S.A.

LES EXCREMENTS DE VERS A SOIE : UNE RESSOURCE PERMETTANT D'OBTENIR DES PRODUITS COMMERCIAUX

En général, en mangeant 10 kg de feuilles de mûrier, les vers à soie rejettent environ 1 kg d'excréments qui peuvent être exploités pour diverses opérations industrielles, permettant d'obtenir des profits intéressants pour la fabrication de produits divers pour la consommation humaine comme les médicaments, les produits de beauté et les produits comestibles ainsi que pour certaines préparations biologiques.

Dans les usines, après avoir traité les excréments dans de l'alcool, de l'acétone et de l'essence, on peut en extraire de la chlorophylle. La chlorophylle contenue dans les excréments de vers à soie peut être facilement dissoute dans ces solvants. Cependant, la chlorophylle ainsi extraite ne peut pas être dissoute dans l'eau et son application est donc limitée. Elle doit donc être convertie en sodium de chlorophylle de cuivre. On extrait donc les excréments avec un solvant organique et la solution est saponifiée en ajoutant de l'hydroxyde de sodium. Après saponification, la solution se différencie en une couche verte inférieure (saponifiée) et une couche jaune supérieure (non-saponifiée). On ajoute du sulfate de cuivre et de l'acide chlorhydrique à la couche verte pour obtenir de la chlorophylle de cuivre. Cette solution quand on la traite avec de l'hydroxyde de sodium donne du sodium - chlorophylle - cuivre (chlorophylle). On isole le solvant de l'autre couche jaune (non-saponifiée), et après avec une chromatographie sur colonne et une distillation fractionnelle, des composés organiques comme le carotène, le phytol et le triacontanol se forment. La pâte de chlorophylle est utilisée comme matière première dans l'industrie pharmaceutique pour le traitement des maladies gastriques comme les ulcères, l'hépatite et certaines maladies du sang. Elle est aussi utilisée pour la préparation de dentifrice et de produits de beauté de qualité. Le sodium - chlorophylle - cuivre peut être utilisé pour le traitement des maladies de l'estomac, l'hépatite, la pancréatite aiguë et la néphrite chronique. Aux Etats Unis, il y a plus de 30 types de médicaments contenant du sodium - chlorophylle - cuivre. La pâte de chlorophylle a été extraite des excréments de la race bivoltine Kalimpong - A (KA) par Revensiddaiah et Yashoda Bai (1999). Le carotène est utilisé pour la fabrication de médicaments pour le traitement des maladies des organes respiratoires et du tube digestif. Le phytol est la matière

première médicale permettant d'obtenir la vitamine E et la vitamine K. Le triacontanol est largement utilisé comme un merveilleux régulateur de la croissance des plantes et les excréments de vers à soie peuvent donc être exploités pour la fabrication de triacontanol naturel.

Après l'extraction du carotène, le résidu (environ 16,8 % du total) est identifié en tant qu'excrément Degreen". Cet excrément Degreen donne environ 10 % de pectine après extraction dans l'HCl. Il est ensuite concentré dans de l'alcool et on recueille le sédiment. Une telle masse solide obtenue est lavée dans 60, 75 et 90 % d'alcool, séchée et puis finement moulue. Le produit final qui en résulte est de la pectine. En tant qu'épaississant, la pectine est utilisée dans les bonbons, la gelée, la confiture, les jus de fruit concentrés et en tant que stabilisateur dans les glaces. Elle peut diminuer les triglycérides du sang et le cholestérol du sang et a une action bactériostatique et de détoxification (Majumdar, 1992).

RECYCLAGE DES DECHETS SERICICOLES POUR OBTENIR DES PRODUITS COMMERCIAUX

Même après les exploitations industrielles permettant d'obtenir des produits dérivés à partir du mûrier, du ver à soie, de la nymphe, des cocons, des déchets de soie et des matières fécales, il peut toujours y avoir une quantité suffisante de déchets provenant de tous les produits séricicoles. Ces restes peuvent facilement être recyclés en bon fumier organique pour faire du compost. Les matières organiques ainsi obtenues peuvent permettre de gérer le sol pour une sériciculture durable. La matière fraîche organique obtenue contient des hydrates de carbone simples comme les sucres et l'amidon, des protéines, de la cellulose, de la lignine, des cires et des résines, qui subissent des changements remarquables grâce à des décompositions physique, chimique et microbienne variées et le produit final s'appelle de l'humus. L'engrais organique contribue énormément à la teneur en humus du sol et est un apport essentiel pour la gestion du sol. Dans certaines fermes séricicoles, les feuilles de mûrier qui restent des litières et des champs sont données en nourriture au bétail et les détritiques de vers à soie sont directement transférés dans les champs. Cela entraîne de la pollution et répand de nombreuses maladies telles que la pébrine à partir des larves de vers à soie infestées, ce qui peut entraîner de sérieux échecs de récolte de vers à soie. Ces déchets peuvent donc être utilisés pour la préparation de compost à la valeur nutritive élevée, puisque les restes des feuilles de mûrier contiennent respectivement 3,2 ; 0,5 et 1,5 % de N, P et K tandis que l'état nutritif des détritiques de vers à soie est respectivement de 1,4 % de N, 0,4 % de P et 0,8 % de K (Choudhary et coll., 1993). Les déchets se décomposent en environ 4-5 mois et le compost qui en résulte contient 1,6 % de N, 0,7 % de P et 0,3 % de K en plus des micro-nutriments.

On peut aussi préparer un bon vermi-compost qui peut être complété avec du fumier de ferme (Dandin et coll., 2000). Dans ce but on fortifie d'abord des restes séricicoles en les mélangeant avec un inoculum microbien comme les *Azotobacters*, des micro-organismes qui solubilisent le phosphate et du super phosphate. Le processus de vermicompostage des déchets séricicoles se fait en introduisant une culture mélangée de vers de terre juvéniles *Eudrilus euginae*, *Eisenia fetida* et *Perionyx excavatus* à raison de 1,5 kg / t de déchets dans chaque tranchée. Le vermicompost ainsi obtenu peut avoir un rôle significatif dans la production de mûriers et peut aussi être utilisé chez d'autres cultures pour enrichir le sol avec des micro-nutriments. Chez le mûrier, l'application de vermi-compost augmente le taux de photosynthèse et le rendement en feuilles de manière significative (Singhal et coll., 2000). Il contient un niveau élevé de N, P, K, Zn, Fe, Mn et Cu, plus que le fumier de ferme (Tableau IX). La qualité de la feuille de mûrier est presque égale lorsqu'on applique du vermi-compost préparé de cette manière à raison de 5,6 t / ha / année à celle obtenue avec l'application de 20 t de fumier de ferme / ha / année (Tableau X) qui est assez coûteux.

CONCLUSION

Les profits économiques tirés des ressources séricicoles en utilisant les déchets sont remarquables. Puisque la sériciculture comprend les opérations précédant les récoltes pour la moriculture et aussi les innovations technologiques séricicoles, l'amélioration des technologies précédant et suivant la récolte doit être convertie en des systèmes orientés vers les marchés et les industries. L'industrie séricicole doit non seulement dépendre de la soie mais il faut aussi absolument qu'elle utilise totalement les produits dérivés générés par les plants de mûrier, l'élevage des vers à soie, les centres de grainage et de dévidage de la soie afin de donner différents produits pouvant être vendus et dont la valeur commerciale est importante. Les études exploratoires dans cette direction ouvriront des perspectives pour l'exploitation industrielle des avancées en microbiologie, en biotechnologies, en génie génétique, en phyto-technologie et en entomologie industrielle. Une telle exploitation intégrée de toutes les ressources séricicoles fera aussi sans aucun doute baisser le coût de la soie. Aujourd'hui en Inde seule, les exportations de soie rapportent 9000 millions de roupies, et ces revenus pourraient être rapidement multipliés, si une approche intégrée de l'utilisation de toutes les ressources provenant des déchets séricicoles était mise au point, ce qui ferait de la sériciculture une bio-industrie complète et durable de ce millénaire.

STUDIES ON RAPD MARKERS LINKED TO THE DENSONUCLEOSIS REFRACTORINESS GENE, *NSD-Z*, IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI**

LI MUWANG¹, YAO QIN¹, HOU CHENGXIANG¹, LU CHENG² & CHEN KEPING**

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

2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

*In the silkworm, **Bombyx mori**, non-susceptibility to **B. mori** densonucleosis virus of the Zhejiang (China) strain (DNV-Z) is controlled by a recessive gene, *nsdZ* (nonsusceptible to DNV-Z) located on the 15th chromosome. We constructed the near-isogenic line, *Csd-nsd-Z* (*nsd-Z*/*nsd-Z*) which is congenic to *D₁* (*nsd-Z*/*nsd-Z*) for the 15th chromosome and congenic to *C108* for other chromosomes, starting with a female of *C108* (+^{*nsd-Z*}/*+*^{*nsd-Z*}) and a male of *D₁*. For the crossing over experiment, a female of *C108* was crossed with a male (*nsd-Z*/*+*) of *Csd-1*. Individuals in the B6 generation were selfed, and their progeny were fed with DNV-Z to select the individuals which were nonsusceptible to the virus, and producing the *Csd-nsd-Z* and *Csd-+*^{*nsd-Z*} lines. Using *Csd-nsd-Z*, *Csd-+*^{*nsd-Z*}, *C108*, *D₁* and (*C108* × *D₁*) as materials, 150 random primers were used to select the RAPD markers linked to the *nsd-Z* locus. *OPH-07* was demonstrated to be linked to the *nsd-Z* allele, and *OPM-20* was shown to be linked to the +^{*nsd-Z*} allele.*

Keywords: RAPD markers; densonucleosis; refractoriness gene; silkworm (*Bombyx mori*).

INTRODUCTION

Bombyx mori densonucleosis viruses (BmDNVs) belong to the genus Iteavirus of the family Parvoviridae (Lu, 1998). BmDNVs, which cause serious economic damage to sericulture, were discovered in 1976. They comprise several strains, such as Ina virus, Saku virus, Yamanashi virus and Zhengjiang (China) virus (DNV-Z). As distinguished by Watanabe *et al.*, (1986), Ina virus belongs to the DNV-1 type, and Saku virus and Yamanashi virus belong to the DNV-2 type. Iwashita *et al.*, (1983) discussed the chemical characteristics of DNV-Z, and Qian *et al.*, (1985) demonstrated that it is similar to Saku virus. BmDNVs multiply only in the nuclei of the columnar cells of the larval midgut epithelium (Guo *et al.*, 1985; Seki *et al.*, 1983). Certain silkworm strains are highly susceptible, while other strains are non-susceptible (completely resistant) to DNV-1, DNV-2 or DNV-Z even though they are fed a high concentration of virus inocula. It was reported that a recessive gene, *nsd-1*, which is located at 8.3 cM on chromosome 21, controls the non-susceptibility to DNV-1 (Watanabe *et al.*, 1981; Eguchi *et al.*, 1991). Another gene, *Nid-1*, which also controls the non-susceptibility to DNV-1 is dominant, and has been shown not to be located on chromosome Z, 2, 12 or 17 (Eguchi *et al.*, 1986). *nsd-2*, a recessive gene conferring resistance to DNV-2, was shown to be different from *nsd-1* (Abe

* Supported by the Key of National Nature Science Foundation of China (No. 39730370).

** Corresponding author, email: cjoyz17@public.zj.js.cn

et al., 1987, 1993). Hu *et al.*, (1984) demonstrated that a third recessive gene, *nsd-Z*, controls the nonsusceptibility to DNV-Z. This gene is located on chromosome 15 (Qin *et al.*, 1996).

Rearing of silkworm strains that are homozygous for *nsd-Z* is the best way to avoid economic damage by DNV-Z in sericulture in China. Therefore, for production of commercial silkworm strains, it is desirable to incorporate the *nsd-Z* gene and eliminate the susceptibility gene in breeding programs. But this is difficult to accomplish using standard breeding methods. Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) have been used as genetic markers because their generation through the polymerase chain reaction (PCR) makes them more rapidly and easily detected compared to RFLPs (Williams *et al.*, 1990). In the silkworm, many molecular markers have been selected by means of the RAPD method, and several silkworm RAPD molecular linkage maps were constructed (Promboon *et al.*, 1995; Yasukochi, 1998; Xia *et al.*, 1996; Chen, 2000; Li *et al.*, 2000). Abe *et al.*, (1995, 1996, 1998, 2000) identified and mapped several RAPD markers linked to the +^{*nsd-1*} or +^{*nsd-2*} allele successively. Now, we have constructed the near-isogenic lines *Csd-nsd-Z* and *Csd*+^{*nsd-Z*}, and used 150 random primers to select RAPD markers linked to the +^{*nsd-Z*} allele gene as a step in developing tools for marker assisted selection and positional cloning of the gene. Here we report the results of our research.

MATERIALS AND METHODS

1. 1. Silkworm strains:

The D1 strain (*nsd-Z/nsd-Z*), nonsusceptible to DNV-Z, and the C108 strains (+^{*nsd-Z*}/+^{*nsd-Z*}), susceptible to DNV-1, were maintained by single pair mating in SRI-CAAS.

1. 2. Virus inoculum and serological diagnosis:

Dried silkworm midgut containing DNV-Z was ground with distilled water until it turned into a dense solution. The solution was filtered with gauze, and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes. After adding an equal volume of 7% acetic acid to the supernatant, the solution was incubated at 25° C for 40 minutes, followed by adjustment to pH 7.0 and progressive dilution to 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001% solutions of tissue. Bioassays were conducted at 25° C. Newly hatched larvae were fed for 24 hours with mulberry leaves which had been smeared with a DNV-Z suspension, followed by rearing on uncontaminated fresh mulberry leaves. Normally, the silkworms that were susceptible to DNV-Z developed very slowly and could not survive through the third instar. All unhealthy silkworms were checked for densovirus by immunoperoxidase-staining methods (Qian *et al.*, 1989).

1. 3. Construction of near allele lines – *Csd-nsd-Z* and *Csd*+^{*nsd-Z*}:

To construct a near allele line homozygous for the *Csd-nsd-Z* and *Csd*+^{*nsd-Z*} in a C108 background, for the crossing over experiments, a female of C108 was crossed with a male of D1, then females of C108 were mated to (C108 × D1) F₁ males or other backcross generation (6 in all) to eliminate the chromosomes of D1 except the region close to the *nsd-Z* locus on the 15th chromosome. Because of its being recessive, the *nsd-Z* allele would be lost if the methods of selection were not efficient during the backcrossing. Therefore, in order to ensure that the *nsd-z* allele would not be lost, we used a single male moth, which carried the *nsd-Z* allele, to mate successively with two females of different races from the B₁ generation. In other words, the male moth was first mated to a female moth of C108, and then successively mated to another female moth of D1. The eggs from the two females were reared separately, and the offspring of backcrossing to D1 were fed with DNV-Z to test for the presence of *nsd-Z*. If all of those individuals died, all of its offspring (including those crossed to C108) were discarded except for the B6 generation, which was preserved to construct the near allelic line – *Csd*+^{*nsd-Z*}. On the contrary, if 50% of the offspring obtained from the backcross to D1 survived, the offspring obtained from the same male moth crossed to C108 were reared. Selfing was adopted in the B6 generation for 2 generations. But at each generation, the offspring were fed with DNV-Z in the 4th instar to identify non-susceptible individuals. To verify infection, after the larvae had fed on the

leaves for 24 hr, they were reinoculated with DNV-Z. On the seventh day after the second virus inoculation, the larvae were dissected, and their midguts and posterior silk glands were extracted for serological diagnosis and DNA extraction, respectively. We judged larvae infected with DNV-Z as having an $nsd-Z^{+nsd-Z}$ or $+^{nsd-Z}/+^{nsd-Z}$ genotype and those not infected as an $nsd-Z/nsd-Z$ genotype.

1. 4. DNA extraction, primers and PCR:

Genomic DNA was extracted from individual larval posterior silk glands by the method of Xia *et al.*, (1996). It was further purified by extraction with phenol/chloroform, precipitated by ethanol and resuspended in $0.1 \times$ TE buffer (1 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA).

Arbitrary 10-mer primers were purchased from (Shanghai) Sangon. For the PCR, each reaction was 25 μ l in volume and contained 20 ng template DNA, 0.2mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1.5mM Mg^{2+} , 1 μ M of 10-mer primer, and 1 unit Taq polymerase (Sangon) using an MJ Research INC. PTC-100TM machine (USA). The PCR consisted of 38 cycles performed as follows: 94°C for 45 sec, 38°C for 1 min, 72°C for 1.5 min, and a final extension of 10 min at 72° C. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and photographed using a GelDoc-2000 Supfem (Bio-Rad).

RESULTS AND DISCUSSION

2. 1. RAPD analysis:

150 arbitrary 10-mer primers were used in the RAPD analysis of D1, C108 and *Csd-nsd-Z*, a near isogenic line homozygous for *nsd-Z* constructed by 6 generations of backcrossing of heterozygous males with C108 females and 2 subsequent generations of intercrossing between refractory progeny. 148 primers produced the same results with these 3 lines. However, the products of two primers—OPH-07 (5'-CTGCATCGTG-3') and OPM-20 (5'-AGGTCCTTGGG-3')—showed polymorphism. The results of the primer OPH-07 are shown in Fig. 1. A specific band of about 1400 bp was present in D1 and *Csd-nsd-Z*, but absent from C108, showing that this band originated from the resistant parent, D1, and could be linked to the *nsd-Z* allele. The results of amplification with the primer OPM-20 are showing in Fig. 2. A specific 500bp band was present in C108, but absent in D1 and *Csd-nsd-Z*, showing that it was from the susceptible parent, C108, and possibly linked to the $+^{nsd-Z}$ allele. These two strain specific bands were named OPH-07₁₄₀₀ and OPM-20₅₀₀, respectively.

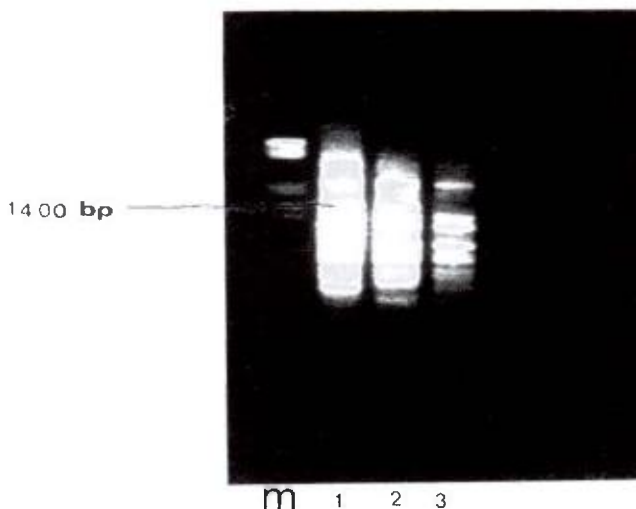


Fig. 1. Amplification patterns of D1, *Csd-nsd-Z* and C108 using primer OPH-07.

M is marker (λ DNA/EcoRI+HindIII), Lane 1, D1; Lane 2, *Csd-nsd-Z*; Lane 3, C108.

Fig. 1. Schémas d'amplification de D1, *Csd-nsd-Z* et C108 en utilisant l'amorce OPH-07.

M est le marqueur (λ ADN/EcoRI+HindIII), Trajet 1, D1 ; Trajet 2, *Csd-nsd-Z* ; Trajet 3, C108.

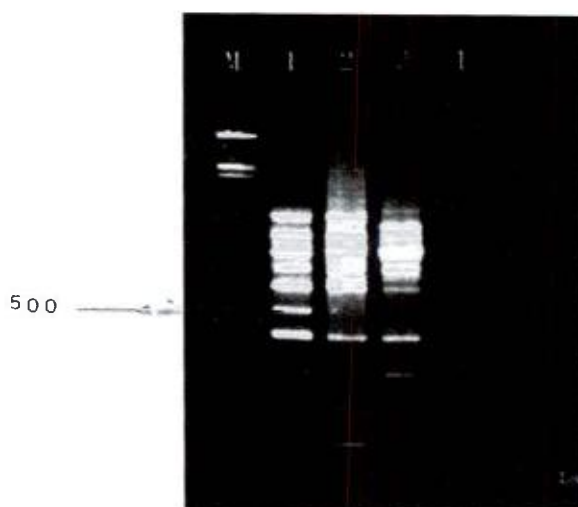


Fig. 2. Amplification patterns of D1, Csd-nsd-Z and C108 using primer OPM-20.

M is marker (λ DNA/EcoRI+HindIII). Lane 1, C108; Lane 2, Csd-nsd-Z; Lane 3, D1.

Fig. 2. Schémas d'amplification de D1, Csd-nsd-Z et C108 utilisant l'amorce OPM-20.

M est le marqueur (λ ADN / EcoRI + HindIII). Trajet 1, C108 ; Trajet 2, Csd-nsd-Z ; Trajet 3, D1.

2. 2. Verification of the linked *nsd-Z* marker:

D1, C108, Csd-*nsd-Z*, (C108 $\times$ D1) F_1 , and Csd-+^{*nsd-Z*} (offspring of a backcrossed silkworm batch that was shown to lack the *nsd-Z* allele by the susceptibility of their half-sibs produced by mating the same male parent to a homozygous *nsd-Z* female) were amplified by the same primers, OPH-07 and OPM-20. The specific OPH-07₁₄₀₀ band was found only in D1 and Csd-*nsd-Z* (Fig. 3), proving its validity as a marker linked to the *nsd-Z* locus. At the same time, OPM-20₅₀₀ was also proved to be a valid marker for the susceptible allele, +^{*nsd-Z*}, as it was found in (C108 $\times$ D1) F_1 , C108 and Csd-+^{*nsd-Z*}, but was absent from D1 and Csd-*nsd-Z* (Fig. 4).

2. 3. Resistance to DNV-Z is a very important economic character. It is controlled by a recessive gene, *nsd-Z* as analysed by classical genetics. Using susceptible race and resistant races as parents, a near isogenic line was obtained after 6 generations of backcrossing and 2 generations of self-crossing. The characters of the near-isogenic line were similar to the susceptible race, C108 except for the major recessive gene for resistance to DNV-Z. The validity of the markers reported here has been demonstrated by detecting them in the F_1 and Csd-+^{*nsd-Z*} lines. The system of using molecular markers to assist in breeding of DNV-Z resistant silkworm races is now feasible.

2. 4. Although the silkworm's susceptibility to virus, except DNVs, varies greatly depending upon developmental stage and rearing condition such as temperature and food quality, fundamental silkworm resistance is controlled genetically by polygenes. Nevertheless, several reports indicate that the major factor in insect resistance to virus disease including infectious flacherie virus, cytoplasmic polyhedrosis virus and nuclear polyhedrosis virus, is due to a single major gene. However, in these cases, the term "resistance" to invasive or infectious disease is used to describe a generally lower degree of susceptibility and reduced severity of symptoms. This usage is distinct from "refractoriness", meaning complete lack of susceptibility. In contrast, the resistance to DNVs in *B. mori* is actually "refractoriness" and appears to be a unique case in the silkworm, and is seldom in other animals and plants.

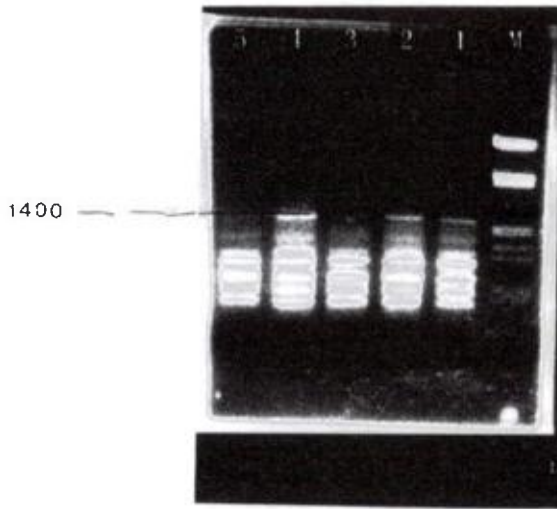


Fig. 3. Amplification patterns of D1, Csd-nsd-Z, C108 and Csd-^{nsd-Z} and (D1 x C108) F1 using primer OPH-07.

M is marker (λ DNA / EcoRI + HindIII); Lane 1, D1; Lane 2, Csd-nsd-Z; Lane 3, C108; Lane 4, (D1 x C108) F1; Lane 5, Csd-^{nsd-Z}.

Fig. 3. Schémas d'amplification de D1, Csd-nsd-Z, C108 et Csd-^{nsd-Z} et F1(D1 x C108) en utilisant l'amorce OPH-07.

M est le marqueur (λ ADN / EcoRI + Hind III), Trajet 1, D1; Trajet 2, Csd-nsd-Z; Trajet 3, C108; Trajet 4, F1(D1 x C108); Trajet 5, Csd-^{nsd-Z}.

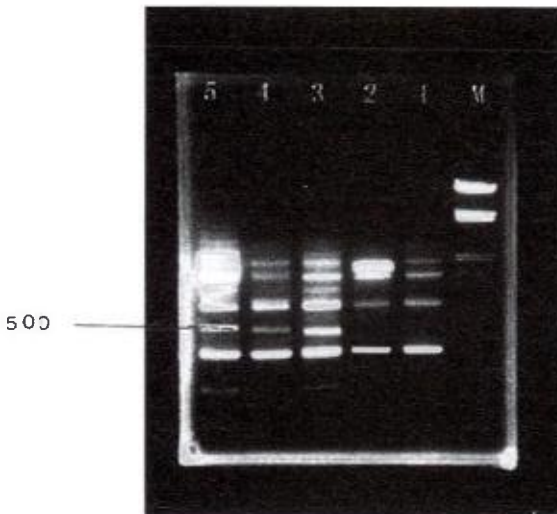


Fig. 4. Amplification patterns of D1, Csd-nsd-Z, C108 and Csd-^{nsd-Z} and (D1 x C108) F1 using primer OPM-20.

M is marker (λ DNA / EcoRI + HindIII) Lane 1, D1; Lane 2, Csd-nsd-Z; Lane 3, C108; Lane 4, (D1 x C108) F1; Lane 5, Csd-^{nsd-Z}.

Fig. 4. Schémas d'amplification de D1, Csd-nsd-Z, C108 et Csd-^{nsd-Z} et F1(D1 x C108) en utilisant l'amorce OPM-20.

M est le marqueur (λ ADN / EcoRI + Hind III), Trajet 1, D1; Trajet 2, Csd-nsd-Z; Trajet 3, C108; Trajet 4, F1(D1 x C108); Trajet 5, Csd-^{nsd-Z}.

The biochemical mechanism by which the *nsd-Z* gene cause DNV-Z resistance in *B. mori* is not yet known. If this gene is cloned or the gene product identified, because it controls absolute refractoriness rather than an increase in the level of resistance, it is likely that the mechanism of nonsusceptibility will be relatively simple, and will be understood clearly. If we can realise this goal, perhaps it will be useful for controlling related diseases in other animals and plants, even in human.

REFERENCES

- ABE H., WATANABE H. & EGUCHI R. (1987) Genetical relationship between non-susceptibilities of the silkworm, *Bombyx mori*, to two densovirus viruses. 56(3) 443-444.
- ABE H., YOKOYARUA T., OSHIKI T. & KOBAYASHI M. (1993) Analysis of the mechanism of non-susceptibility to the densovirus virus (densovirus) type-2 in the silkworm *Bombyx mori* using a genetic mosaic, J. Seric. Sci. Jpn. 62(1): 38-44.
- ABE H., SHIMADA T., YOKOYAMA T. *et al.*, (1995) Identification of the random amplified polymorphic DNA linked to the densovirus virus type-1 susceptible gene of the silkworm, *Bombyx mori*, J. Seric. Sci. Jpn 64(3): 262-264.
- ABE H., OBAYASHI F., HARADA T. *et al.* (1996) An application of DNA diagnosis method for stock preservation of the silkworm, *Bombyx mori*: a case of preservation of the susceptible strain to densovirus virus type-1. J. Seric. Sci. Jpn. 65(3): 196-200.
- ABE H., HARADA T., KANEHARA M. *et al.*, (1998) Genetic mapping of RAPD markers linked to the densovirus refractoriness gene, *nsd-1*, in the silkworm, *Bombyx mori*. Genes Genet. Syst. 73(4): 237-242.
- ABE H., SUGASAKI T., KANEHARA M. *et al.* (2000) Identification and genetic mapping of RAPD markers linked to the densovirus refractoriness gene, *nsd-2*, in the silkworm, *Bombyx mori*. Genes Genet. Syst. 75(2): 93-96.
- CHEN KEPING (2000) Studies on the resistance resources in *Bombyx mori* – Selection the silkworm resources which were resistant to BmNPV, BmDNV and fluoride-endurance and using molecular markers as assistants in breeding silkworm races. Ph. D. paper for Southwest agricultural university, Chongqing, China.
- EGUCHI R., FURUTA Y. & NINAKI O. (1986) Dominant nonsusceptibility to densovirus virus in the silkworm, *Bombyx mori* J. Seric. Sci. Jpn. 55(2): 177-178.
- EGUCHI R., NINAKI O. & NARA W. (1991) Genetical analysis on the non-susceptibility to densovirus virus in the silkworm, *Bombyx mori* J. Seric. Sci. Jpn 60(5) 384-389.
- GUO X. J., QIAN Y. J., HU X. F. *et al.*, (1985) Studies on their infection site by the densovirus virus in the diseased silkworm (*Bombyx mori*) in China. Acta Sericologica Sinica, 11(2): 93-98.
- HU X. F., QIAN Y. J. & WANG H. L. (1984) Studies on infectivity of silkworm densovirus virus to some silkworm races. Acta Sericologica Sinica, 10(2): 87-90.
- IWASHITA Y., CHAO Y. S., (1983) The development of a densovirus virus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori* of China, Acta Sericologica Sinica, 9(4): 219-222.
- LI B., LU C., ZHOU Z. Y. *et al.*, (2000) Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. Acta genetica sinica, 27(2): 127-132.
- LU H. S. (1998) Molecular biology of insect viruses. Beijing: China agricultural sciencetech press.
- PROMBOON A., SHIMADA T., FUJIWARA H. *et al.*, (1995) Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori* Genetical Research (Cambridge) 66(1): 1-7.
- QIAN Y. J., GUO X. J., HU X. F., WATANABE H. (1985) The serological relationship of *Bombyx mori* densovirus virus from China and Japan. Acta Sericologica Sinica, 11(4): 241-242.
- QIAN Y. J., HU X. F., WANG Y. X. *et al.*, (1989) Serological diagnosis of the densovirus disease of *Bombyx mori*. Acta Sericologica Sinica, 15(4): 217-222.
- QIN J., YI W. Z. (1996) Genetic linkage analysis of *nsd-Z*, the nonsusceptibility gene of *Bombyx mori* to the Zhenjiang (China) strain densovirus virus. Sericologia, 36(2): 241-248.

- SEKI H. & IWASHITA Y. (1983) Histopathological features and pathogenicity of a densovirus of the silkworm, *Bombyx mori*, isolated from sericultural farms in Yamanashi prefecture. J. Seric. Sci. Jpn. 52(3), 400-405.
- WATANABE H., MAEDA S. (1981) Genetically determined nonsusceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* to infection with a densovirus. J. Invertebr. pathol, 38: 370-373.
- WATANABE H., KAWASE S., SHIMIZU T. & SEKI H. (1986) Difference in serological characteristics of densovirus in the silkworm *Bombyx mori* J. Seric. Jpn 55(1): 75-76.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., KIVAK K. J. *et al.*, (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531-6535.
- XIA Q. Y., ZHOU Z. Y., LU C. *et al.*, (1996) A study on conditions and repeatability and inheritance pattern of random amplification polymorphic DNA (RAPD) in F1 of silkworm (*Bombyx mori*). Acta Sericologica sinica, 22(1): 20-25.
- YASUKOCHI Y. (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all the chromosomes based on 1018 molecular markers. Genetics, 150: 1513-1525.

ETUDES SUR LES MARQUEURS RAPD LIÉS AU GÈNE DE NON SENSIBILITÉ À LA DENSONUCLEOSE, *nsd-z*, CHEZ LE VER À SOIE, *BOMBYX MORI**

LI MUWANG¹, YAO QIN¹, HOU CHENGXIANG¹, LU CHENG² & CHEN KEPING**

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

2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, Chine.

Chez le ver à soie, *Bombyx mori*, la non sensibilité au virus de la densonucleose de *B. mori* de souche Zhejiang (Chine) (DNV-Z) est contrôlée par un gène récessif, *nsdZ* (non sensible à DNV-Z) situé sur le 15^{ème} chromosome. Nous avons mis au point une lignée presque isogénique, *Csd-nsd-Z* (*nsd-Z / nsd-Z*) qui est congénique à D1 (*nsd-Z/nsd-Z*) pour le 15^{ème} chromosome et congénique à C108 pour les autres chromosomes, en commençant avec une femelle C108 (+^{*nsd-Z*}/+^{*nsd-Z*}) et un mâle D1. Pour l'expérience de crossing-over, une femelle C108 est croisée avec un mâle (*nsd-Z/+*) *Csd-1*. Les individus de la génération B6 sont isolés et leur descendance est nourrie avec du DNV-Z pour sélectionner les individus qui ne sont pas sensibles au virus, et produire les lignées *Csd-nsd-Z* et *Csd-+^{*nsd-Z*}*.

En utilisant *Csd-nsd-Z*, *Csd-+^{*nsd-Z*}*, C108, D1 et (C108 × D1) comme matériaux, 150 amorces aléatoires ont été utilisées pour sélectionner les marqueurs RAPD liés au locus *nsd-Z*. Il s'avère que OPH-07 est lié à l'allèle *nsd-Z* et OPM-20 à l'allèle +^{*nsd-Z*}.

INTRODUCTION

Les virus de la densonucleose de *Bombyx mori* (BmDNVs) appartiennent au genre Iteravirus de la famille des Parvoviridae (Lu, 1998). Les BmDNVs qui causent de sérieuses pertes économiques pour la sériciculture ont été découverts en 1976. Ils comprennent plusieurs souches, telles que le virus Ina, le virus Saku, le virus Yamanashi et le virus Zhengjiang (Chine) (DNV-Z). Comme l'ont distingué Watanabe et coll., (1986) le virus Ina appartient au type DNV-1 et le virus Saku et le virus Yamanashi appartiennent au type DNV-2. Iwashita et coll., (1983) ont présenté les caractéristiques de DNV-Z et Qian et coll., (1985) ont prouvé qu'il est semblable au virus Saku. Les BmDNV ne se multiplient que dans les noyaux des cellules colonnaires de l'épithélium de l'intestin moyen larvaire (Guo et coll., 1985 ; Seki et coll., 1983). Certaines souches de vers à soie sont très sensibles, tandis que d'autres souches ne sont pas sensibles (complètement résistantes) à DNV-1, DNV-2 ou DNV-Z même lorsqu'on leur administre une concentration élevée de l'inoculum du virus. Il a été signalé qu'un gène récessif, *nsd-1*, qui est situé à 8,3 cM sur le chromosome 21, contrôle la non-sensibilité à DNV-1 (Watanabe et coll., 1981 ; Eguchi et coll., 1991). Un autre gène, *Nid-1*, qui contrôle aussi la non-sensibilité à DNV-1 est dominant et s'avère ne pas être situé sur le chromosome Z, 2, 12 ou 17

* Avec le concours du Key of National Nature Science Foundation of China (No. 39730370).

** Auteur auquel adresser la correspondance, email : cjoyz17@public.zj.js.cn

(Eguchi et coll., 1986). *nsd-2*, un gène récessif conférant la résistance à DNV2, s'avère être différent de *nsd-1*. (Abe et coll., 1987, 1993). Hu et coll., (1984) ont prouvé qu'un troisième gène récessif, *nsd-Z*, contrôle la non-sensibilité à DNV-Z. Ce gène est situé sur le chromosome 15 (Qin et coll., 1996).

L'élevage de souches de vers à soie qui sont homozygotes pour *nsd-Z* est la meilleure façon d'éviter les pertes économiques dues à DNV-Z pour la sériciculture en Chine. Il est donc désirable d'incorporer le gène *nsd-Z* et d'éliminer le gène de la sensibilité dans les programmes de lignage pour la production de lignées de vers à soie commerciales. Mais cela est difficile à réaliser en utilisant les méthodes de lignage ordinaires. Les ADN polymorphiques amplifiées de manière aléatoire (RAPDs) ont été utilisées comme des marqueurs génétiques parce que leur génération par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) les rend plus facilement et rapidement détectables par rapport aux RFLPs (Williams et coll., 1990). Chez le ver à soie, de nombreux marqueurs moléculaires ont été sélectionnés au moyen de la méthode RAPD, et plusieurs cartes de liaisons moléculaires RAPD du ver à soie ont été construites (Promboon et coll., 1995 ; Yasukochi, 1998 ; Xia et coll., 1996 ; Chen, 2000 ; Li et coll., 2000). Abe et coll., (1995, 1996, 1998, 2000) ont identifié et fait la carte de plusieurs marqueurs RAPD liés successivement à l'allèle $+^{nsd-1}$ ou $+^{nsd-2}$. Ici, nous avons construit les lignées presque isogéniques *Csd-nsd-Z* et *Csd-+^{nsd-Z}* et utilisé 150 amorces aléatoires pour sélectionner les marqueurs RAPD liés au gène de l'allèle $+^{nsd-Z}$ ce qui constitue une étape pour mettre au point des outils de sélection assistée par marqueurs et le clonage de position du gène. Nous rapportons ici les résultats de notre recherche.

MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches de ver à soie :

La souche D1 (*nsd-Z/nsd-Z*), non sensible à DNV-Z et les souches C108 ($+^{nsd-Z} / +^{nsd-Z}$), sensibles à DNV-1 sont maintenues par accouplements en couples simples au SRI-CAAS.

1.2. Inoculum du virus et diagnostic sérologique :

De l'intestin de ver à soie séché contenant du DNV-Z est broyé avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'il devienne une solution dense. La solution est filtrée au travers d'une gaze et centrifugée à 3500 rpm pendant 20 minutes. Après avoir ajouté un volume égal d'acide acétique à 7 % au surnageant, la solution est incubée à 25° C pendant 40 minutes, suivi par un ajustement du pH à 7 et une dilution progressive à 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 % des solutions des tissus. Des évaluations biologiques sont réalisées à 25° C. Les larves nouvellement écloses sont nourries pendant 24 heures avec des feuilles de mûrier enduites avec une suspension de DNV-Z et ensuite élevées sur des feuilles de mûrier fraîches non contaminées. Normalement, les vers à soie qui sont sensibles à DNV-Z se développent très lentement et ne survivent pas au-delà du troisième âge. Les vers à soie malades sont analysés par rapport à la présence du virus de la densovirus avec les méthodes de coloration à l'immunopéroxydase (Qian et coll., 1989).

1.3. Construction des lignées aux allèles – *Csd-nsd-Z* et *Csd-+^{nsd-Z}* :

Pour construire une lignée d'allèles presque homozygotes pour *Csd-nsd-z* et *Csd-+^{nsd-Z}* à partir de la base C108 pour les expériences de crossing-over, une femelle C108 est croisée avec un mâle D1, puis les femelles C108 sont accouplées aux mâles F1 (C108 × D1) ou à une autre génération de croisement de retour (6 en tout) pour éliminer les chromosomes de D1 sauf la zone proche du locus *nsd-Z* sur le 15^{ème} chromosome. Parce qu'il est récessif, l'allèle *nsd-Z* serait perdu si les méthodes de sélection n'étaient pas efficaces pendant le croisement de retour. Donc, pour s'assurer que l'allèle *nsd-z* n'est pas perdu, nous avons utilisé un papillon mâle unique, qui porte l'allèle *nsd-Z* pour l'accoupler successivement avec deux femelles de races différentes de la génération B1. En d'autres mots, le papillon mâle est en premier accouplé avec un papillon femelle C108, et puis successivement

accouplé à un autre papillon femelle D1. Les œufs des deux femelles sont élevés séparément et la descendance du croisement de retour avec D1 est nourrie avec du DNV-Z pour tester la présence de *nsd-Z*. Si tous les individus meurent, toute la descendance (y compris ceux croisés avec C108) est jetée, sauf la génération B6, qui a été préservée pour construire la lignée presque allélique—Csd-+^{nsd-Z}. Au contraire, si 50 % de la descendance obtenue à partir du croisement de retour à D1 survit, la descendance obtenue à partir du même papillon mâle croisé avec C108 est élevée. La fécondation frère-sœur est adoptée à la génération B6 pendant 2 générations. Mais à chaque génération, la descendance est nourrie avec du DNV-Z au 4^{ème} âge pour identifier les individus non-sensibles. Pour vérifier l'infection, après que les larves se sont nourries sur des feuilles pendant 24 h, on les réinocule avec du DNV-Z. Le septième jour, après la deuxième inoculation du virus les larves sont disséquées, et leurs intestins et leurs glandes séricigènes postérieures sont extraites pour faire respectivement le diagnostic sérologique et l'extraction de l'ADN. Nous avons observé que les larves infestées avec DNV-Z ont un génotype $nsd-Z +^{nsd-Z}$ ou $+^{nsd-Z} / +^{nsd-Z}$ et celles qui ne sont pas infestées ont le génotype $nsd-Z / nsd-Z$.

1. 4. Extraction de l'ADN, des amorces et PCR :

L'ADN génomique est extrait des glandes séricigènes postérieures larvaires individuelles d'après la méthode de Xia et coll., (1996). Il est à nouveau purifié par extraction avec du phénol / chloroforme, précipité avec de l'éthanol et resuspendu dans un tampon 0,1 × TE (1 mM Tris-HCL, pH 8.0 ; 0,1 mM EDTA).

Des amorces 10-mer arbitraires ont été achetées à Sangon (Shanghai). Pour la PCR, chaque réaction fait 25 µl de volume et contient 20 ng de matrice d'ADN, 0,2 mM de dATP, de dCTP, de dGTP, de dTTP, 1,5 mM Mg^{2+} , 1 µM d'amorce 10-mer et 1 unité de polymérase Taq (Sangon) et l'on utilise une machine MJ Research INC. PTC-100TM (USA). La PCR consiste en 38 cycles réalisés comme suit : 94° C pendant 45 sec., 38° C pendant 1 minute, 72° C pendant 1,5 minute, et une dernière étape de 10 minutes à 72° C. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur des gels d'agarose à 1,5 %, colorés avec du bromure d'éthidium et photographiés en utilisant un GelDoc-2000 Supfem (Bio-Rad).

RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Analyse RAPD :

150 amorces 10-mer arbitraires sont utilisées pour l'analyse RAPD de D1, de C108 et de Csd-*nsd-Z*, une lignée presque homozygote pour *nsd-Z* construite avec 6 générations de croisement de retour entre des mâles hétérozygotes et des femelles C108 et 2 générations suivantes d'inter-croisement entre la descendance réfractaire. 148 amorces donnent les mêmes résultats avec ces 3 lignées. Cependant, les produits de deux amorces, OPH-07 (5'-CTGCATCGTG-3') et OPM-20 (5'-AGGTCTTGGG-3') présentent un polymorphisme. Les résultats de l'amorce OPH-07 sont présentés dans la Fig 1. Une bande spécifique d'environ 1400 pb est présente dans D1 et Csd-*nsd-Z*, mais absente de C108, ce qui montre que cette bande provient du parent résistant, D1 et peut être liée à l'allèle *nsd-Z*. Les résultats de l'amplification avec l'amorce OPM-20 sont présentés dans la Fig. 2. Une bande spécifique de 500 bp est présente dans C108 mais absente chez D1 et Csd-*nsd-Z*, ce qui montre qu'elle vient du parent sensible, C108, et est sûrement liée à l'allèle +^{nsd-Z}. Ces deux bandes spécifiques aux souches sont nommées OPH-07₁₄₀₀ et OPM-20₅₀₀, respectivement.

2.2. Vérification du marqueur lié à *nsd-Z* :

D1, C108, Csd-*nsd-Z*, F1 (C108 × D1) et Csd-+^{nsd-Z} (descendance d'un lot de vers à soie croisé par retour, qui s'avère ne pas avoir l'allèle *nsd-Z* d'après la sensibilité de leurs demi-frères produits par l'accouplement du même parent mâle à une femelle homozygote *nsd-Z*) sont amplifiés par les mêmes amorces, OPH-07 et OPM-20. On ne trouve la bande spécifique OPH-07₁₄₀₀ que dans D1 et

Csd-*nsd-Z* (Fig. 3), ce qui prouve sa validité comme marqueur lié au locus *nsd-Z*. Au même moment, OPM-20500 s'avère aussi être un marqueur valide pour l'allèle sensible, +^{*nsd-Z*}, comme chez F1 (C108 × D1), C108 et Csd-+^{*nsd-Z*}, mais il est absent de D1 et de Csd-*nsd-Z* (Fig. 4).

2.3. La résistance à DNV-Z est un caractère économique très important d'après l'analyse de la génétique classique. Elle est contrôlée par un gène récessif, *nsd-Z*. En utilisant une race sensible et des races résistantes comme parents, on obtient une lignée presque isogénique après 6 générations de croisement de retour et 2 générations d'autofécondation. Les caractères de la lignée presque isogénique sont similaires à ceux de la race sensible, C108, sauf pour le gène récessif majeur de résistance à DNV-Z. La validité des marqueurs rapportée ici a été prouvée en les détectant dans les lignées F1 et Csd-+^{*nsd-Z*}. On peut aussi utiliser des marqueurs moléculaires pour permettre le lignage de races de vers à soie résistantes à DNV-Z.

2.4. Bien que la sensibilité du ver à soie aux virus, sauf à DNV, varie grandement selon le stade de développement et les conditions d'élevage comme la température et la qualité de la nourriture, la résistance fondamentale du ver à soie est contrôlée par les polygènes. Néanmoins, plusieurs rapports indiquent que le facteur principal de la résistance d'un insecte à une maladie virale y compris au virus infectieux de la flacherie, au virus de la polyédrose cytoplasmique et au virus de la polyédrose nucléaire est dû à un gène principal unique. Cependant, dans ces cas, le terme "résistance" à la maladie généralisée ou infectieuse est utilisé pour décrire un degré de sensibilité généralement plus faible et une diminution de la sévérité des symptômes. Cela est différent de "l'état réfractaire", qui signifie un manque complet de sensibilité. La résistance à DNV chez *B. mori*, est en fait "un état réfractaire" et semble être un cas unique chez le ver à soie, qui est rare chez d'autres animaux et plantes. On ne connaît pas encore le mécanisme biochimique par lequel le gène *nsd-Z* provoque la résistance à DNV-Z chez *B. mori*. Si ce gène est cloné ou le produit du gène identifié, parce qu'il contrôle un état réfractaire plutôt qu'une augmentation du niveau de résistance, il est probable qu'on comprendra clairement le mécanisme de non-sensibilité. Si nous pouvons atteindre ce but, cela sera peut-être utile pour contrôler les maladies associées chez d'autres animaux et plantes et même chez les humains.

STUDIES ON THE RELATIONSHIP OF FEEDING HABIT, ECONOMIC CHARACTERS AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. FED ON MULBERRY LEAF AND ARTIFICIAL DIET

CUI W.-Z, SHANG J.-Y. & WANG Y.-W.

Department of Sericulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.

The individuals of good feeding habit and poor ones were chosen out from the same silkworm variety fed on artificial diet, and the relationships between the individual differences of feeding habit and other characters were investigated. The results showed that the silkworm's feeding habit concerning artificial diet had close relations to olfactory sense, sex, egg age, diapause and starvation levels. However, when they were fed on mulberry leaves, individuals from the same batch of larvae that showed different feeding habits with regard to artificial diet had no obvious differences in physiological aspects and economic characters, such as growth and development, ingestion and digestion, cocoon quality, dietary efficiency and so on.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., feeding habit, individual differences, artificial diet.

INTRODUCTION

It is the direction towards which sericulture will develop in the future to feed silkworm on artificial diet. However, usually there are some problems arising from this technique such as bad developmental uniformity, delayed growth and weaker health, which finally result in poor cocoon production, and therefore these become the main technical obstacles to apply this technique to production. It has been found that the silkworm's feeding habit with regard to artificial diet is related to the silkworm variety and its developmental stage (Mizuzawa, 1980; Hamano *et al.*, 1986; Nihmura, 1972; Tsai, 1978). In our study, we found that even in the same batch of one silkworm variety, the individuals presented significant difference in feeding habit and sensitivity of gustation to artificial diet, and this should be considered as one of the major factors to cause bad developmental uniformity (Cui *et al.*, 1998, 2001).

The relationship between feeding habit and other physiological and economic characters to reveal the physiological mechanism of feeding habit, could help us to get a good understanding about the silkworm's feeding habit, but also has a practical significance in improving the larval developmental uniformity and rearing results, as well as future extension of this technique in large-scale production. In this experiment, we investigated the relationship between larval feeding habit and olfactory sense, sex, diapause, growth and development and other characters.

MATERIALS AND METHODS

1. Recipe and preparation of artificial diet:

The artificial diet used in this experiment consisted of 31.3% mulberry powder, 31.3% soybean powder, 31.3% corn powder, 2.5% citric acid, 0.5% gallic acid, 0.3% antiseptic, 1.3% vitamin mixture and 1.5% inorganic salt mixture, the proportion of dry matter to water was 1:2. Raw materials were

put in the petri dish according to the recipe and they were made into plate shape diet. The diet was kept in steam bath for 50 minutes at the temperature of 100° C and then was cooled and used for the experiment.

2. Silkworms for the test:

Three silkworm varieties, Jingsong, Haoyue and 791 were used for this experiment. Except for special annotations, the variety Jingsong was used. Newly-hatched larvae were collected from moth batches separately. After 24 hours rearing with the above-mentioned artificial diet, individuals that did not take food and develop were selected out as one group of low feeding habit and then reared with mulberry leaf. Meanwhile, individuals that took the diet and developed well were selected out as another group of high feeding habit and then starved for 24 hours (to eliminate the difference among the two groups, as in the group of low feeding habit the larvae did not take food during the first 24 hours), and afterwards they were also reared with mulberry leaf. The 5th instar newly moulted males and females were separated to investigate the sex rate. Finally, in each group 15 male and 15 female larvae were used as samples and were reared with fixed quantity of mulberry leaves twice a day until cocooning. Three moth batches were used in the same variety.

3. Test of olfactory responses:

Investigation on relationship between olfactory responses of newly hatched silkworm and feeding habit:

Two parallel lines of 10 cm in length at a distance of 1 cm were drawn on the bottom of a culture dish. Several hundred newly-hatched larvae were put in the shape of line outside of one line. Outside of the other line, a strip of mulberry leaf or diet wrapped in cotton paper were put as lure. A cover was put on and the dish was placed in the dark at 28°C for 30 minutes, the newly-hatched larvae which arrived at the mulberry leaf or diet were considered as sensitive individuals in olfactory responses, and the worms that did not crawl were considered as slow-witted individuals, while the worms that crawled to an opposite direction were considered as avoidance individuals. The sensitive individuals and the slow-witted ones were collected with artificial diet respectively. After 24 hours rearing in the dark at 30°C, the rate of setae dispersion (refers to the ratio of setae-dispersed individuals to the total individuals investigated) were investigated (Wu X.-f, et al., 1996). The treatment was replicated 3 times, and 100 newly-hatched larvae were taken as one testing sample.

Testing of olfactory responses of silkworm of different feeding habit:

Individuals of high and low feeding habit selected out based on the above method were reared with mulberry leaf till the 2nd instar. After starvation for about 10 hrs, the larval olfactory response was investigated according to the method described above (the distance between the two parallel lines was changed to 4 cm). The percentage of silkworms arrived at the diet was used as an index to reflect the sensitivity of olfactory responses. The treatment was repeated 3 times and 50 silkworms were taken as one testing sample.

4. Effect of starvation treatment on feeding habit:

The newly-moulted 3rd instar larvae (Variety: Jingsong) were starved for different designed times at 25°C and then allowed to take artificial diet for 10 hours. The amount of faeces, the duration of the third instar and the larval body weight were investigated. The amount of faeces was taken as an indirect index to reflect the feeding habit. The experiments were done in triplicate and 30 silkworms were used in each testing.

5. Investigation of amount of ingested food, amount of digestion and dietary efficiency:

The 5th instar larvae of different feeding habit were reared with rationed feeding, and the amount of leaves used for feeding was recorded. Silkworm faeces and residual leaves were collected and the

dry weight was measured. The amount of ingested dry food, amount of digestion and digestibility were calculated according to the amount of supplied leaves. At last, the relevant indices of dietary efficiency were calculated according to the results of cocoon testing by the formulae as follows.

Production efficiency of cocoon weight (%) =

$$\frac{\text{Dry cocoon weight}}{\text{Amount of ingested dry food of 5th instar}} \times 100$$

Conversion efficiency of cocoon weight (%) = $\frac{\text{Dry cocoon weight}}{\text{Amount of ingested dry food of 5th instar}} \times 100$

Production efficiency of cocoon shell weight (%) =

$$\frac{\text{Dry cocoon shell weight}}{\text{Amount of ingested dry food of 5th instar}} \times 100$$

Conversion efficiency of cocoon shell weight (%)

$$\frac{\text{Dry cocoon shell weight}}{\text{Amount of digestion of dry food of 5th instar}} \times 100$$

RESULTS

1. Relationship between olfactory responses and feeding habit with regard to artificial diet:

The results showed that the silkworms showing a positive response to mulberry leaf and artificial diet had a good feeding habit with regard to artificial diet (Table I). On the other hand, as shown in Table II, same as the newly-hatched larvae, the 2nd newly moulted larvae with a good feeding habit with regard to artificial diet also showed a positive response to mulberry leaf and artificial diet. Especially to the artificial diet, this kind of difference was more significant.

2. Relationship between feeding habit with regard to artificial diet and sex of newly-hatched larvae:

As shown in Table III, larval feeding habit is closely related to larval sex. In the groups of good feeding habit, the females are much more than the males while in the groups of poor feeding habit the trend is opposite, i.e. the males are highly rated. The same tendency was found in the three tested varieties and the proportion of the females to males ranged from 1.68:1 to 3.78:1 indicating that regarding the feeding habit with regard to artificial diet, the females are better than that of the males.

3. Relationship between egg age in the same moth batch and feeding habit with regard to the artificial diet:

The eggs laid by one moth were divided into early oviposition, medium oviposition and late oviposition according to the deposition stage. Newly-hatched larvae were collected and reared with artificial diet, and the larval growth and development were investigated. The rate of larval setae dispersion after 24 hours and body weight of 2nd instar molting larvae had a better performance in the group of early oviposition than that of late oviposition (Table IV). From these results, it was suggested that the oviposition stage had effect on the larval feeding habit to some extent. However, it will not cause significant difference in respect of 3rd instar moulting rate and larval survival rate.

Table I. Feeding habit with regard to artificial diet of newly-hatched larvae showing different olfactory responses.*Tableau I. Comportements alimentaires sur le milieu artificiel de larves venant d'éclore montrant des réponses olfactives différentes.*

Food used in olfactory test	Mulberry leaf		Artificial diet		
Olfactory responses	Sensitive	Slow-witted	Sensitive	Slow-witted	Avoidance
<i>Nourriture utilisée dans le test olfactif</i>	<i>Feuille de mûrier</i>		<i>Milieu artificiel</i>		
<i>Réponses olfactives</i>	<i>Sensible</i>	<i>Lente</i>	<i>Sensible</i>	<i>Lente</i>	<i>Sans réponse</i>
Rate of setae dispersion after 24 hr (%) in larvae fed with artificial diet <i>Taux de dispersion des soies après 24 h chez les larves nourries avec un milieu artificiel</i>	64.6 ± 8.7	55.5 ± 9.1	66.7 ± 6.3	60.5 ± 8.4	48.0 ± 5.9

Table II. Olfactory responses of silkworms showing different feeding habit.*Tableau II. Réponses olfactives de vers à soie présentant des comportements alimentaires différents.*

Acceptance of artificial diet	High feeding habit		Low feeding habit	
Food used in olfactory responses	Mulberry leaf	Artificial diet	Mulberry leaf	Artificial diet
<i>Acceptation du milieu artificiel</i>	<i>Bon comportement alimentaire</i>		<i>Mauvais comportement alimentaire</i>	
<i>Nourriture utilisée pour les réponses olfactives</i>	<i>Feuille de mûrier</i>	<i>Milieu artificiel</i>	<i>Feuille de mûrier</i>	<i>Milieu artificiel</i>
Rate of silkworm reaching diet in 15 min. (%) <i>Taux de vers à soie atteignant l'aliment en 15 min (%)</i>	69 ± 12.7	40 ± 7.5	58 ± 10.3	13 ± 3.2
Rate of silkworms reaching diet in 30 min (%) <i>Taux de vers à soie atteignant l'aliment en 30 min. (%)</i>	87 ± 14.6	57 ± 10.8	82 ± 16.1	14 ± 2.7

Table III. Ratio between male and female silkworms of different feeding habit.

Tableau III. Ratio entre les vers à soie mâles et femelles avec différents comportements alimentaires.

Silkworm variety	Jingsong		Haoyue		791	
Feeding habit	High feeding habit	Low feeding habit	High feeding habit	Low feeding habit	High feeding habit	Low feeding habit
<i>Variété de ver à soie</i>	<i>Jingsong</i>		<i>Haoyue</i>		<i>791</i>	
<i>Comportement de nourissage</i>	<i>Bon comportement alimentaire</i>	<i>Mauvais comportement alimentaire</i>	<i>Bon comportement alimentaire</i>	<i>Mauvais comportement alimentaire</i>	<i>Bon comportement alimentaire</i>	<i>Mauvais comportement alimentaire</i>
Ratio between male and female <i>Ratio mâles femelles</i>	1.957 ± 0.214	0.725 ± 0.168	2.463 ± 0.323	0.651 ± 0.118	1.333 ± 0.324	0.739 ± 0.075

Table IV. Relationship between egg age in the same moth batch and larval feeding habit with regard to artificial diet, larval growth and development.

Tableau IV. Relation entre l'âge de l'œuf de la ponte d'un papillon et le comportement alimentaire larvaire sur l'aliment artificiel, la croissance larvaire et le développement.

Investigation item	Rate of setae dispersion after 24 hrs (%)	Weight of moulting larva of second instar (mg)	Moulting rate of 3 rd instar after 168 hrs (%)	Survival rate after 168 hrs (%)
<i>Trait étudié</i>	<i>Taux de disperston des soies après 24 h (%)</i>	<i>Poids des larves en mue du 2^{ème} âge (mg)</i>	<i>Taux de mue du 3^{ème} âge après 168 hrs (%)</i>	<i>Taux de survie après 168 hrs (%)</i>
Early oviposition / <i>Ponte précoce</i>	96.0 ± 3.4	27.8 ± 1.2	87.7 ± 9.7	97.7 ± 1.1
Medium oviposition / <i>Ponte médiane</i>	94.3 ± 2.6	26.9 ± 1.5	87.7 ± 11.2	99.3 ± 0.3
Late oviposition / <i>Ponte tardive</i>	92.7 ± 4.1	26.0 ± 1.3	87.3 ± 12.9	97.0 ± 0.6

Table V. Comparison of feeding habit with regard to artificial diet and development between hibernating eggs and common acid treatment eggs.

Tableau V. Comparaison entre le comportement alimentaire sur milieu artificiel et le développement chez les œufs qui hibernent et les œufs traités couramment à l'acide.

Investigation item	Rate of setae dispersion after 24 hrs (%)	Weight of moulted body of second instar (mg)	Moulting rate of 3 rd instar after 168 hrs (%)	Survival rate after 168 hrs (%)
<i>Trait observé</i>	<i>Taux de dispersion des soies après 24 hrs (%)</i>	<i>Poids du corps mué du 2^{ème} âge (mg)</i>	<i>Taux de mue du 3^{ème} âge après 168 hrs (%)</i>	<i>Taux de survie après 168 hrs (%)</i>
Diapause eggs / Œufs diapausants	82.0 ± 6.8	27.3 ± 2.2	83.0 ± 8.5	97.0 ± 1.2
Common acid treatment eggs Œufs traités couramment à l'acide	58.0 ± 7.1	28.8 ± 1.6	74.0 ± 6.9	97.3 ± 1.8

Table VI. Effect of starvation time in 3rd newly-moulted silkworms on feeding habit with regard to artificial diet, growth and development.

Tableau VI. Effet de la durée du jeûne chez des vers à soie du 3^{ème} âge venant d'éclore sur le comportement alimentaire par rapport au milieu artificiel, à la croissance et au développement.

Starvation time (hr)	0	12	24	36	48
<i>Durée du jeûne (hrs)</i>					
Amount of faeces after feeding for 10 hrs (granula per worm) <i>Quantité d'excréments après nourrissage pendant 10 hrs (pétoles / par ver)</i>	15.7 ± 3.2	17.9 ± 1.9	18.1 ± 2.6	17.3 ± 3.0	15.7 ± 1.7
3 rd instar duration (involving starvation time) (hr) <i>Durée du 3^{ème} âge (y compris de la période de diète) (hr)</i>	83	84	96	103	118
Developmental time of third instar after feeding (hr) <i>Durée de développement du 3^{ème} âge après le nourrissage (hrs)</i>	83	72	74	67	70
Body weight of 3 rd instar moulting larva (mg) <i>Poids d'une larve du 3^{ème} âge muant (mg)</i>	189.3 ± 23.1	210.6 ± 17.7	219.7 ± 21.8	207.8 ± 24.4	183.9 ± 16.5

Table VII. Duration (hr) of developmental stage of silkworm showing different feeding habit.

Tableau VII. Durée (heures) du stade de développement de vers à soie présentant différents comportements alimentaires.

Instar	1 st Instar	2 nd Instar	3 rd Instar	4 th Instar	5 th Instar	All instar
Age	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge	3 ^{ème} âge	4 ^{ème} âge	5 ^{ème} âge	Tous les âges
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	127	71	91	119	155	563
Low feeding habit <i>Mauvais comportement alimentaire</i>	127	71	91	119	159	567

Table VIII. Changes of body weight (mg / worm) of silkworms showing different feeding habits.

Tableau VIII. Changements du poids corporel (mg / ver) de vers à soie présentant différents comportements alimentaires.

Investigation item	Moulter body weight of 1 st instar	Moulter body weight of 2 nd instar	Moulter body weight of 3 rd instar	Moulter body weight of 4 th instar	Body weight of mature silkworm
Trait étudié	Poids du ver mué du 1 ^{er} âge	Poids du ver mué du 2 ^{ème} âge	Poids du ver mué du 3 ^{ème} âge	Poids du ver mué du 4 ^{ème} âge	Poids du ver à soie mature
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	6.2 ± 0.4	33.6 ± 2.8	160.4 ± 12.0	738.7 ± 26.2	3495.7 ± 85.7
Low feeding habit <i>Mauvais comportement alimentaire</i>	6.2 ± 0.3	35.9 ± 3.4	164.8 ± 12.6	740.2 ± 23.1	3648.0 ± 102.8

4. Differences in feeding habit with regard to artificial diet between larvae hatching from diapause eggs and common acid treatment eggs:

Results in table V indicated that setae dispersion rate and moulting rate of third instar larvae of diapause eggs were significantly higher than that of larvae hatched from common acid treatment eggs. But there was little difference in the body weight and survival rate. The results showed that the larval feeding habit and adaptability to artificial diet, from diapause eggs were better than that from acid-treated eggs.

Table IX. Cocoon character of silkworm showing different feeding habit.*Tableau IX. Caractère du cocon de vers à soie présentant différents comportements alimentaires.*

Investigation items	Cocoon weight (mg)	Cocoon shell weight (mg)	Cocoon shell ratio (%)
<i>Traits étudiés</i>	<i>Poids du cocon (mg)</i>	<i>Poids de la coque (mg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	1676 ± 92.3	360 ± 23.7	21.48 ± 0.25
Low feeding habit <i>Mauvais comportement alimentaire</i>	1751 ± 95.4	366 ± 31.5	20.90 ± 0.34

Table X. Viability (%) of silkworm showing different feeding habit.*Tableau X. Viabilité (%) du ver à soie présentant différents comportements alimentaires.*

Investigation items	Cocooning rate	Rate of dead worm cocoons	Survival rate of larvae-pupae
<i>Traits étudiés</i>	<i>Taux de filage du cocon</i>	<i>Taux de cocons avec des vers morts</i>	<i>Taux de survie larves / chrysalides</i>
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	98.3 ± 6.9	1.7 ± 0.4	96.6 ± 6.6
Low feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	96.7 ± 7.8	8.6 ± 3.2	88 ± 7.9

5. Effect of starvation level on feeding habit with regard to artificial diet:

As it is shown in table VI, keeping newly-moulted silkworms starvation to appropriate degree their feeding habit with regard to artificial diet could be improved. At 25° C, the optimum starvation time is 24 hours, while too long time of starvation caused a bad result. After starvation treatments, the larval duration was prolonged, but the prolonged time was shorter than the starvation time. Body weight of moulting larvae showed a rising tendency rather than decreasing within a starvation time of 12-36 hours but when starvation time was 48 hours, the weight of moulting larvae was decreased. It means that an appropriate starvation could not only ameliorate the larval feeding habit with regard to the artificial diet but also speed up the larval growth and development.

Table XI. Amount of ingested dry food, amount of digestion and digestibility of silkworm showing different feeding habit.

Tableau XI. Quantité de nourriture sèche ingérée, quantité de digestion et digestibilité du ver à soie présentant différents comportements alimentaires.

Investigation items	Amount of ingested food (mg / worm)	Amount of digestion (mg / worm)	Digestibility (%)
<i>Traits étudiés</i>	<i>Quantité de nourriture ingérée (mg / ver)</i>	<i>Quantité de digestion (mg / ver)</i>	<i>Digestibilité (%)</i>
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	3464 ± 312	1329 ± 106	38.37 ± 0.80
Low feeding habit <i>Mauvais comportement alimentaire</i>	3545 ± 267	1406 ± 87	39.66 ± 1.13

Table XII. Food efficiency (%) of silkworm showing different feeding habit.

Tableau XII. Efficacité de la nourriture (%) chez le ver à soie présentant différents comportements alimentaires.

Investigation items	Production efficiency of cocoon weight	Conversion efficiency of cocoon weight	Production efficiency of cocoon shell weight	Conversion efficiency of cocoon shell weight
<i>Traits étudiés</i>	<i>Efficacité de production par rapport au poids du cocon</i>	<i>Efficacité de conversion par rapport au poids du cocon</i>	<i>Efficacité de production du poids de la coque soyeuse</i>	<i>Efficacité de conversion par rapport au poids de la coque soyeuse</i>
High feeding habit <i>Bon comportement alimentaire</i>	48.38 ± 1.33	126.11 ± 8.82	10.39 ± 0.88	27.09 ± 2.11
Low feeding habit <i>Mauvais comportement alimentaire</i>	49.39 ± 1.36	124.54 ± 7.65	10.32 ± 0.76	26.03 ± 1.98

Furthermore, relationship between starvation treatment of newly hatched larvae and developmental uniformity of 1-2 instar was investigated. The newly-hatched larvae were treated with a different starvation time varying from 0-60 hours, and the 3rd instar newly-moulted larvae were investigated after 144 hrs with an interval of 12 hours. The results are presented in Fig. 1. Along with the starvation time which was prolonged, the peak of third newly-moulted silkworms was postponed but the delayed time of duration was shorter than the starvation time, and this phenomenon was clearly observed when the starvation time was over 36 hours. It indicated that the larval development became

faster after starvation treatment. Moreover, as the starvation time was prolonged, the peak of third newly-moulted silkworms centralised relatively. In the plots of 0-12 hours starvation, from 10% to 90% of newly-moulted larval appearance, about 36 hours was taken, while the starvation time was beyond 24 hours, it would take only about 24 hours to reach this rate. Therefore, an appropriate starvation of newly-hatched larvae could improve the larval developmental uniformity.

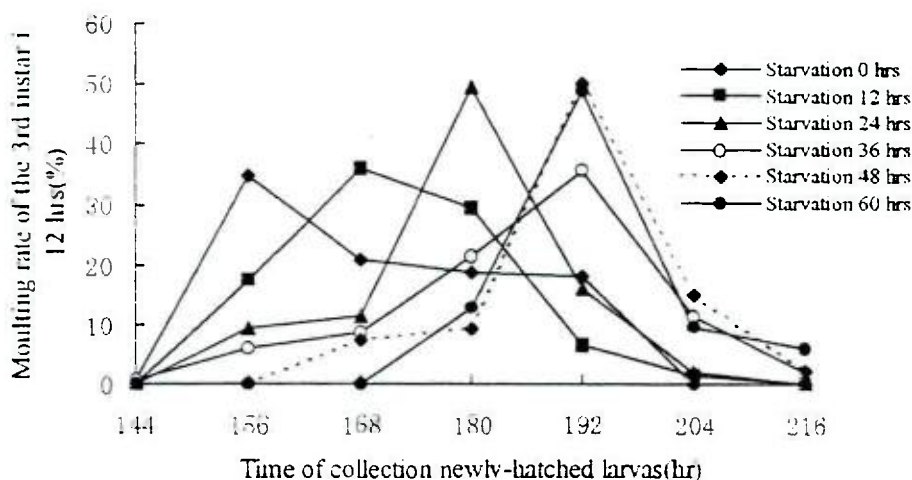


Fig. 1. Relationship between starvation time of newly-hatched larvae and moulting time in the 3rd instar.

Fig. 1. Relation entre la durée de jeûne chez les larves nouvellement écloses et la durée de la mue au 3ème âge.

6. Relationship between silkworm feeding habit with regard to artificial diet, growth development, cocoon quality and dietary efficiency:

The results in Table VII – XII showed that from the same moth batch, when reared with mulberry leaf, individuals of high feeding habit with regard to artificial diet showed no remarkable differences with individuals of low ones in 9 characters: growth, moult body weight, cocoon shell weight, cocoon shell rate and cocooning rate etc. The larvae with low feeding habit gave a slight better performance in some aspects such as: body weight of mature silkworm, cocoon weight, amount of ingested food, amount of digestion and digestibility. But ratio of life of larvae-pupa was decreased. The analysis of variance indicated that there were no significant differences in the indices above except the index of the rate of dead worm cocoons.

DISCUSSION

According to larval feeding responses, Hamano (1985) classified silkworm varieties in two types, i.e., feeding stimuli factor-depended type and feeding inhibiting factor-depended type. The former included some varieties which have a good adaptation to artificial diet, while the latter showed a poor

adaptation. Our research (Cui *et al.*, 1998, 2001) showed that in the same variety, those individuals showing a poor feeding habit were usually more sensitive in feeding response and gustatory receptions than those of good feeding habit.

The results from this experiment further indicated that in the same silkworm variety, the larval feeding habit was related to not only gustatory but also closely to olfactory sensitivity. These showed positive response to mulberry leaf and artificial diet and also showed better feeding habit to artificial diet. This demonstrated that olfactory sensitivity is also the major physiological reason for individual difference of feeding habit. This character can be used as a fast auxiliary index in selecting silkworm variety which can take artificial diet well and in feeding habit testing.

Furthermore, the individual difference in feeding habit with regard to artificial diet was related to sex, diapause and starvation. Oviposition stage also has an effect on the feeding habit of newly hatched larvae. So in the cocoon production with artificial diet, we should rear silkworm hatched from hibernated eggs and treat the varieties showing poor feeding habit with an appropriate starvation, which may be an effective measure to ameliorate feeding habit and developmental uniformity.

The results obtained from this study demonstrated that when fed on mulberry leaves, the larvae from the same moth batch of a variety, even they had different feeding habits to artificial diet, they had no clear difference on physiological aspects and economic characters such as: dietary efficiency, digestion and ingestion, cocoon quality, growth and development, etc. The results suggest that individuals with various feeding habits with regard to artificial diet had the same adaptation to mulberry leaf and thereby had little differences in the above mentioned economic characters. So in the cocoon production with artificial diet, through improving the recipe of artificial diet, regulating rearing environment and rearing treatment to improve feeding habit and developmental uniformity, silkworm with low feeding habit can also be expected to give better economic characters.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our great thanks are given to Professor Xu Junliang of Zhejiang University for his guidance. We also thank Professor Li Weiguo for providing the eggs of silkworms for the present investigation.

REFERENCES

- MIZUZAWA K. (1980) Artificial diet rearing of parent silkworm. *Seric. Sci. and Tech.* 19(2), 42-45.
- HAMANO K., MIYAZAWA K. & MUKAIYAMA F. (1986) Racial difference in the feeding habit of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn*, 55(1), 68-72.
- HAMANO K., YAMAMOTO T. & MUKAIYAMA F. (1985) Relationship between preference to artificial diet and feeding habit of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn* 54(6), 495-499.
- NIHMURA M. (1972) Rearing of the silkworm, *Bombyx mori*, on the artificial feed by adapting the changes in feeding palatability according to larval growth. *J. Seric. Sci. Jpn*, 41(5), 375-382.
- TSAI YOU-MING, WANG HUNG-LIN, HO CHIA-LUN (1978) Studies on the artificial diet of silkworm, *Bombyx mori* L.: The effects of dietary physico-chemical factors on the feeding and growth of the silkworm. *Acta Entomologica Sinica*, 21(4), 369-384.
- CUI WEI-ZHENG, XU JUN-LIANG, WU WIAO-Feng (1998) Studies on individual differences of silkworm in feeding responses. *Acta Sericologica Sinica*, 24(21), 75-80.
- CUI WEI-ZHENG, MU ZHI-MEI, WANG YAN-Wen (2001) Individual differences in gustatory electrophysiological responses of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica* (in press).
- WU X.f., XU J.-l & MIAO Y.-g (1996) Feeding adaptability of different silkworm varieties to an artificial diet varying in mulberry leaf powder content. *Sericologia*, 36(1), 167-169.

ETUDES SUR LA RELATION ENTRE LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE, LES CARACTERES ECONOMIQUES ET LES ASPECTS PHYSIOLOGIQUES CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L. NOURRI AVEC DE LA FEUILLE DE MURIER ET DE L'ALIMENT ARTIFICIEL

CUI W.-Z., SHANG J.-Y. & WANG Y.-W.

Department of Sericulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Chine.

Des individus de la même variété ont été triés en fonction de leur comportement alimentaire vis à vis de l'aliment artificiel (bon ou mauvais) et nous avons étudié les relations entre les différences individuelles d'habitude alimentaire et les autres caractères. Les résultats montrent que l'habitude alimentaire sur le milieu artificiel est en relation étroite avec le sens olfactif, le sexe, l'âge de l'œuf, la diapause et les niveaux de jeûne. Cependant, quand ils sont nourris avec des feuilles de mûrier, les individus du même lot de larves qui présentent des habitudes alimentaires différentes sur le milieu artificiel, ne présentent pas de différences évidentes pour les aspects physiologiques et les caractères économiques tels que la croissance et le développement, l'ingestion et la digestion, la qualité du cocon, l'efficacité du régime alimentaire etc.

INTRODUCTION

A l'avenir la sériciculture va s'orienter vers le nourrissage sur aliment artificiel. Cependant, cette technique pose en général des problèmes : mauvaise uniformité de développement, croissance retardée et moins bonne santé, qui donnent en fin de compte une mauvaise production de cocons. Il s'avère que l'habitude alimentaire du ver à soie sur le milieu artificiel est liée à la variété de ver à soie et à son stade de développement (Mizuzawa, 1980 ; Hamano et coll., 1986 ; Nihmura, 1972 ; Tsai, 1978). Dans notre étude, nous avons même trouvé que dans le même lot d'une variété de vers à soie, les individus présentent une différence significative de comportement alimentaire et de sensibilité gustative sur le milieu artificiel et cela devrait être considéré comme l'un des principaux facteurs entraînant une mauvaise uniformité de développement (Cui et coll., 1998, 2001).

La relation entre le comportement alimentaire et les autres caractères physiologiques et économiques pourrait nous permettre de mieux comprendre l'habitude alimentaire du ver à soie, en révélant le mécanisme physiologique du comportement alimentaire, mais elle est aussi intéressante sur le plan pratique pour améliorer l'uniformité de développement larvaire et les résultats d'élevage et permettre d'étendre cette technique à la production à grande échelle dans le futur. Dans cette expérience, nous avons étudié la relation entre l'habitude alimentaire larvaire et le sens olfactif, le sexe, la diapause, la croissance et le développement et les autres caractères.

MATERIELS ET METHODES

1. Recette et préparation de l'aliment artificiel :

Le milieu artificiel utilisé dans cette expérience comprend 31,3 % de poudre de feuilles de mûrier, 31,3 % de farine de soja, 31,3 % de poudre de maïs, 2,5 % d'acide citrique, 0,5 % d'acide gallique,

0,3 % d'antiseptique, 1,3 % de mélange de vitamines et 1,5 % de mélange de sels minéraux, la proportion de matière sèche par rapport à l'eau est de 1 : 2. Les matières premières sont mises dans une boîte de Petri selon la recette et sont étalées. Le milieu est passé dans un bain Marie pendant 50 minutes à 100° C puis est refroidi et utilisé pour l'expérience.

2. Vers à soie testés:

Trois variétés de vers à soie, Jingsong, Haoyue et 791 sont utilisées pour cette expérience. La variété Jingsong est utilisée sauf pour quelques cas particuliers. Les larves nouvellement écloses de chaque ponte sont recueillies séparément. Après 24 heures d'élevage sur le milieu présenté plus haut, les individus qui ne prennent pas de nourriture et ne se développent pas sont sélectionnés en tant que groupe au " mauvais comportement alimentaire " et sont élevés avec de la feuille de mûrier. Les individus qui mangent le milieu et se développent bien sont sélectionnés comme un groupe au " bon comportement alimentaire " que l'on fait jeûner pendant 24 heures (pour éliminer la différence entre les deux groupes, puisque chez le groupe à la mauvaise habitude alimentaire les larves ne prennent pas de nourriture pendant les premières 24 heures) et elles sont ensuite élevées avec de la feuille de mûrier. Les mâles et femelles du 5^{ème} âge venant de muer sont séparés pour étudier le sex ratio. Dans chaque groupe 15 larves mâles et 15 larves femelles sont utilisées comme échantillon et sont élevées avec une quantité fixe de feuilles de mûrier deux fois par jour jusqu'au coconage. Trois pontes sont utilisées pour la même variété.

3. Evaluation des réponses olfactives :

Etude de la relation entre les réponses olfactives des vers à soie nouvellement éclos et l'habitude alimentaire ;

Deux lignes parallèles de 10 cm de longueur avec 1 cm d'écart entre elles sont dessinées au fond d'une boîte de culture. Plusieurs centaines de larves nouvellement écloses sont disposées en ligne à l'extérieur d'une des lignes. A l'extérieur de l'autre ligne, un morceau de feuille de mûrier ou de milieu enveloppé dans du papier sont disposés comme piège. On pose un couvercle et le disque est placé dans l'obscurité à 28° C pendant 30 minutes. Les larves nouvellement écloses qui arrivent à la feuille de mûrier ou au milieu sont considérées comme des individus aux réponses olfactives sensibles et les vers qui ne rampent pas sont considérés comme des individus lents, tandis que les vers qui rampent dans une direction opposée sont considérés comme des individus évasifs. Les individus sensibles et lents sont recueillis respectivement sur le milieu artificiel. Après 24 heures d'élevage dans l'obscurité à 30° C en mesure, le taux de dispersion des soies (qui correspond au taux d'individus dont les soies sont dispersées par rapport au nombre total d'individus étudiés) est étudié (Wu X.-f, et coll., 1996). Le traitement est répété 3 fois et 100 larves nouvellement écloses sont prises comme échantillon.

Evaluation des réponses olfactives du ver à soie avec différentes habitudes alimentaires :

Les individus avec une bonne et une mauvaise habitude alimentaire sélectionnés sur la base de la méthode ci-dessus sont élevés avec de la feuille de mûrier jusqu'au 2^{ème} âge. Après un jeûne d'environ 10 heures, la réponse olfactive larvaire est étudiée selon la méthode décrite plus haut (la distance entre les deux lignes parallèles passe à 4 cm). Le pourcentage de vers à soie étant arrivé au milieu est utilisé comme un indice pour refléter la sensibilité des réponses olfactives. Le traitement est répété 3 fois et chaque échantillon comprend 50 vers à soie.

4. Effet du jeûne sur le comportement alimentaire :

Les larves du 3^{ème} âge venant d'éclore (variété : Jingsong) sont affamées pendant différentes durées à 25° C puis on les autorise à prendre du milieu artificiel pendant 10 heures. La quantité d'excréments, la durée du troisième âge et le poids larvaire sont mesurés. La quantité d'excréments

est prise comme l'indice indirect reflétant le comportement alimentaire. Les expériences sont triplées et 30 vers à soie sont utilisés pour chaque test.

5. Etude de la quantité de nourriture ingérée, de la quantité digérée et de l'efficacité alimentaire :

Les larves du 5^{ème} âge avec différentes habitudes de nourrissage sont élevées avec une nourriture rationnée et la quantité de feuilles utilisée pour le nourrissage est enregistrée. Les excréments de ver à soie et les feuilles résiduelles sont recueillis et le poids sec est mesuré. La quantité de nourriture sèche ingérée, la quantité digérée et la digestibilité sont calculées selon la quantité de feuilles fournies. Enfin, les indices correspondants d'efficacité du régime alimentaire sont calculés selon les résultats des tests des cocons d'après les formules suivantes :

Efficacité de production du poids du cocon (%) =

$$\frac{\text{Poids du cocon sec}}{\text{Quantité de nourriture sèche ingérée pendant le 5ème âge}} \times 100$$

Efficacité de conversion du poids du cocon (%) =

$$\frac{\text{Poids du cocon sec}}{\text{Quantité de nourriture sèche ingérée pendant le 5ème âge}} \times 100$$

Efficacité de production du poids de la coque (%) =

$$\frac{\text{Quantité de nourriture sèche ingérée pendant le 5ème âge}}{\text{Efficacité de conversion du poids de la coque (\%)}} \times 100$$

Efficacité de production du poids de la coque (%) =

$$\frac{\text{Poids de la coque sèche}}{\text{Quantité de nourriture sèche ingérée pendant le 5ème âge}} \times 100$$

Efficacité de conversion du poids de la coque (%) =

$$\frac{\text{Poids de la coque sèche}}{\text{Quantité de nourriture sèche digérée pendant le 5ème âge}} \times 100$$

RESULTATS

1. Relation entre les réponses olfactives et le comportement alimentaire sur l'aliment artificiel :

Les résultats montrent que les vers à soie présentant une réponse positive à la feuille de mûrier et au milieu artificiel ont un bon comportement alimentaire sur le milieu artificiel (Tableau I). D'autre part, comme le montre le Tableau II, comme pour les larves nouvellement écloses, les larves nouvellement muées du 2^{ème} âge présentant un bon comportement alimentaire sur le milieu artificiel montrent une réponse positive à la feuille de mûrier et au milieu artificiel. Ce type de différence est surtout plus significatif pour le milieu artificiel.

2. Relation entre le comportement alimentaire sur le milieu artificiel et le sexe des larves nouvellement écloses :

Comme le montre le Tableau III, l'habitude alimentaire larvaire est étroitement liée au sexe larvaire. Dans les groupes à la bonne habitude alimentaire, les femelles sont beaucoup plus nombreuses que les mâles tandis que chez les groupes à la mauvaise habitude alimentaire, la tendance est opposée, c'est à dire qu'il y a un taux élevé de mâles. On trouve la même tendance chez les trois variétés testées et la proportion de femelles par rapport aux mâles est comprise entre 1,68 : 1 et 3,78 : 1, ce qui indique qu'en matière de comportement alimentaire sur le milieu artificiel, les femelles sont meilleures que les mâles.

3. Relation entre l'âge de l'œuf d'un même papillon et le comportement alimentaire sur le milieu artificiel :

Les œufs pondus par un papillon sont divisés comme suit : ponte précoce, ponte intermédiaire et ponte tardive selon la période de ponte. Les larves nouvellement écloses sont recueillies et élevées sur du milieu artificiel et on étudie leur croissance larvaire et leur développement. Le taux de dispersion des soies après 24 heures et le poids corporel des larves du 2^{ème} âge ayant mué sont les plus élevés chez le groupe provenant de la ponte précoce que chez le groupe provenant de la ponte tardive (Tableau IV). A partir de ces résultats, on peut suggérer que la période de ponte a un effet sur l'habitude alimentaire larvaire à un certain degré. Cependant, cela n'entraîne pas de différence significative par rapport au taux de mue du 3^{ème} âge et au taux de survie larvaire.

4. Différences de comportement alimentaire sur le milieu artificiel entre les larves provenant d'œufs à diapause et d'œufs traités couramment à l'acide :

Les résultats du tableau V indiquent que le taux de dispersion des soies et le taux de mue des larves du 3^{ème} âge provenant d'œufs à diapause sont significativement plus élevés que ceux des larves provenant d'œufs traités couramment à l'acide. Mais il y a peu de différence par rapport au poids du corps et au taux de survie. Les résultats montrent que l'habitude alimentaire larvaire et l'adaptabilité par rapport au milieu artificiel des œufs diapausants sont meilleures que celles des œufs traités à l'acide.

5. Effet du niveau de jeûne par rapport à l'habitude alimentaire sur le milieu artificiel :

Comme on le voit dans le tableau VI, si l'on fait jeûner les vers à soie venant de muer à une température appropriée, leur habitude alimentaire sur l'aliment artificiel peut être améliorée. A 25° C, la durée de jeûne optimum est de 24 heures, tandis qu'un temps de jeûne trop long donne un mauvais résultat. Après le jeûne, la durée larvaire est prolongée, mais le temps de prolongation est plus court que le temps de jeûne. Le poids corporel des larves en mue montre une tendance à la hausse plutôt qu'une tendance à la baisse avec une durée de jeûne de 12 à 36 heures, mais quand le temps de jeûne est de 48 heures, le poids des larves en mue baisse. Cela veut dire qu'un jeûne approprié peut non seulement améliorer l'habitude alimentaire larvaire sur l'aliment artificiel mais peut aussi accélérer la croissance larvaire et le développement.

De plus, la relation entre le jeûne des larves nouvellement écloses et l'uniformité de développement des âges 1-2 a été étudié. On fait jeûner les larves nouvellement écloses pendant 0 et 60 heures et on étudie le % de larves nouvellement écloses du 3^{ème} âge pendant 144 hrs par intervalles de 12 heures. Les résultats sont présentés dans la Fig 1. Non seulement la durée de jeûne est prolongée mais le pic des vers à soie nouvellement mués du 3^{ème} âge est également retardé mais la durée de report est plus courte que la durée du jeûne et ce phénomène a été clairement observé quand la durée de jeûne est de plus de 36 heures. Cela indique que le développement larvaire devient plus rapide après le jeûne. De plus, quand la durée du jeûne est prolongée, le pic des vers à soie nouvellement mués est centré. Dans les lots ayant jeûné de 0 à 12 heures, il faut environ 36 heures pour avoir 10 % à 90 % de larves nouvellement muées, tandis que quand la durée de jeûne dépasse 24 heures cela

prend environ 24 heures pour atteindre ce taux. Donc, un jeûne approprié des larves nouvellement écloses pourrait améliorer l'uniformité de développement larvaire.

6. Relation entre le comportement alimentaire du ver à soie sur aliment artificiel, et le développement de la croissance, la qualité du cocon et l'efficacité du régime alimentaire :

Les résultats des tableaux VII à XII montrent qu'à partir du lot d'un même papillon, les individus avec un bon comportement alimentaire sur le milieu artificiel ne présentent pas de différences remarquables quand ils sont élevés avec de la feuille de mûrier, comparés à ceux ayant un mauvais comportement alimentaire pour 9 caractères : croissance, poids du corps en mue, poids de la coque, richesse soyeuse et taux de coconnage, etc... Les larves au mauvais comportement alimentaire donnent une performance légèrement meilleure pour certains caractères tels que : poids du corps du ver à soie mature, poids du cocon, quantité de nourriture ingérée, quantité de digestion et de digestibilité. Mais le ratio larves / pupes baisse. L'analyse de variance indique qu'il n'y a pas de différences significatives pour les indices ci-dessus sauf pour l'indice du taux de vers morts dans les cocons.

DISCUSSION

Selon les réponses d'alimentation larvaire, Hamano (1985) a classé les variétés de vers à soie en deux types, le type dépendant des facteurs de stimulation alimentaire et le type dépendant des facteurs d'inhibition alimentaire. Les premiers incluent des variétés qui ont une bonne adaptation sur les milieux artificiels tandis que les seconds présentent une mauvaise adaptation. Nos études (Cui et coll., 1998, 2001) montrent que chez la même variété, les individus présentant une mauvaise habitude alimentaire sont généralement plus sensibles par rapport à leur réponse alimentaire et aux réceptions gustatives que ceux ayant une bonne habitude alimentaire.

Les résultats de cette expérience indiquent de plus que pour la même variété de vers à soie, le comportement alimentaire larvaire est non seulement lié à la sensibilité gustative mais aussi étroitement à la sensibilité olfactive. Ils présentent une réponse positive à la feuille de mûrier et au milieu artificiel et présentent aussi un meilleur comportement alimentaire sur le milieu artificiel. Cela montre que la sensibilité olfactive est aussi la raison physiologique principale des différences individuelles d'habitude alimentaire. Ce caractère peut être utilisé comme un indice auxiliaire rapide pour sélectionner une variété de ver à soie qui peut bien accepter le milieu artificiel et pour tester le comportement alimentaire.

De plus, la différence individuelle de comportement alimentaire sur le milieu artificiel est liée au sexe, à la diapause et au jeûne. La période de ponte a aussi un effet sur l'habitude alimentaire des larves nouvellement écloses. Pour la production de cocons sur milieu artificiel à partir de variétés présentant de mauvaises habitudes alimentaires il faut élever les vers à soie à partir d'œufs à hibernation et les faire jeûner pendant une durée appropriée pour améliorer le comportement alimentaire et l'uniformité de développement.

Les résultats de cette étude montrent que les larves d'une variété provenant d'un même papillon, même si elles ont des habitudes alimentaires différentes sur le milieu artificiel, ne présentent pas de différences marquées quand elles sont nourries sur des feuilles de mûrier, par rapport aux aspects physiologiques et aux caractères économiques tels que l'efficacité alimentaire, la digestion et l'ingestion, la qualité du cocon, la croissance et le développement, etc. Les résultats suggèrent que les individus avec des comportements alimentaires variés sur le milieu artificiel ont la même adaptation sur la feuille de mûrier et présentent donc peu de différences par rapport aux caractères économiques mentionnés ci-dessus. Donc, les vers à soie à mauvais comportement alimentaire peuvent aussi être élevés sur milieu artificiel, donner de meilleurs caractères économiques et améliorer leur habitude alimentaire et leur uniformité de développement, si l'on améliore la recette du milieu artificiel et si l'on régule l'environnement d'élevage et l'élevage.

STUDIES ON THE MINOR ELEMENTS AND THE ANTISEPTICS OF ARTIFICIAL DIET FOR SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUN-GEN & JIANG LI-JUN

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

There are tight relations between minor elements and the nutrition on artificial diet for silkworm. The test suggested that chloromycetin was an inhibitor to feeding of silkworm larvae. But inositol, gallic acid and choline chloride was indispensable to the growth and development of silkworm larvae. Adding antiseptics is important to prevent the diet to be devalued. 0.10% sorbic acid and 0.15% propionic acid and 0.05% bavistin could be efficient for more than 10 days. So it can be used once during 1-2 instars and the cost is cheap.

Keywords : Silkworm, *Bombyx mori* L., artificial diet, minor elements, antiseptics.

INTRODUCTION

The ingredients of artificial diet are studied mainly according to the feeding habits and the demand for the growth and development and cocoon quality and quantity of silkworm, *Bombyx mori* L. (Ito, 1981). The cost is also an important factor in practice. The minor elements and antiseptics are closely related to the nutrition and duration of the artificial diet (Miao, 1994 ; Cai, 1980 ; Shyamala, 1962). In the minor elements, vitamin B mixture and vitamin C consist in the main cost of artificial diet and are important for silkworm growth (Cai *et al.*, 1980 ; Horie *et al.*, 1963 ; 1965 ; Ito, 1961 and Ito, 1981).

In this paper, we studied the types and demands of minor elements and antiseptics in artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori* L.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm races :

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

Basic ingredient for test :

Ingredients	Quantity (g)	Ingredients	Quantity (g)
Mulberry leaf powder	30	Salt mixture	2
Soybean powder	35	Vitamin B mixture	0.5
Corn starch	20	Ascorbic acid	1.0
Sucrose	4	Minor elements	
Citric acid	3	Antiseptics	
Carragenan	6	Water	250 ml

Test for minor elements :

For control, chloromycetin (0.2%, crude medicine use w/w), choline chloride (0.2% w/w), inositol (0.5% w/w) and gallic acid (0.5% w/w) were added to basic ingredient. In test treatments, above materials were removed from diet respectively.

Test for antiseptics :

Sodium benzoate, sorbic acid, propionic acid, bavistin and their mixture used as antiseptics were added to artificial diet (w/w).

Artificial diet making-up :

At 1 day before collecting the newly hatched larvae, the diet was prepared by mixing thoroughly with the diet ingredients. Three times the amount of water was added to the diet powder and mixed homogeneously. The mixed wet diet was laid on the rearing dish and the diet was cooked for 35 min. at 100° C, then the dish with diet was cooled at room temperature.

Rearing methods :

The newly hatched larvae were kept on the plated artificial diet directly and diet was given once in every instar. Silkworms were mass reared up to the third instar. Each test group consisted of three replications, each of 150 larvae.

Rearing condition :

The artificial diet rearing was conducted at 28-29°C, 85-90% RH for the first instar ; 28° C, 80-85% RH for the 2nd instar. After the 3rd instar, the silkworm larvae were reared with standard mulberry leaves.

Investigation items :

Setae dispersion of silkworm 24 hr or 48h after hatching, survival rate, rate of newly molted silkworm, body weight of 1st or 2nd molting silkworm and development speed were measured. The formula for development is :

Development speed =

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

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of minor elements on growth and development of young silkworms :

The growth and development of young silkworms were shown in Figure 1.

The figure 1 showed that when chloromycetin was removed from diet, the development of young silkworms was speeded and the 3rd newly molted larval rate was higher than control. This result suggests that chloromycetin inhibits the feeding activity and the growth and development of silkworm, but merely affected the weight of 3rd newly molted larvae and survival rate. In addition, when choline chloride was removed from ingredients, survival rate and 3rd newly molted larvae rate were lower than that of control. This suggests that choline chloride was the necessary nutritive material. If all

above 4 kinds of minor elements were removed from diet, the growth and development was inhibited seriously and the 3rd newly molted larvae was reduced to almost zero.

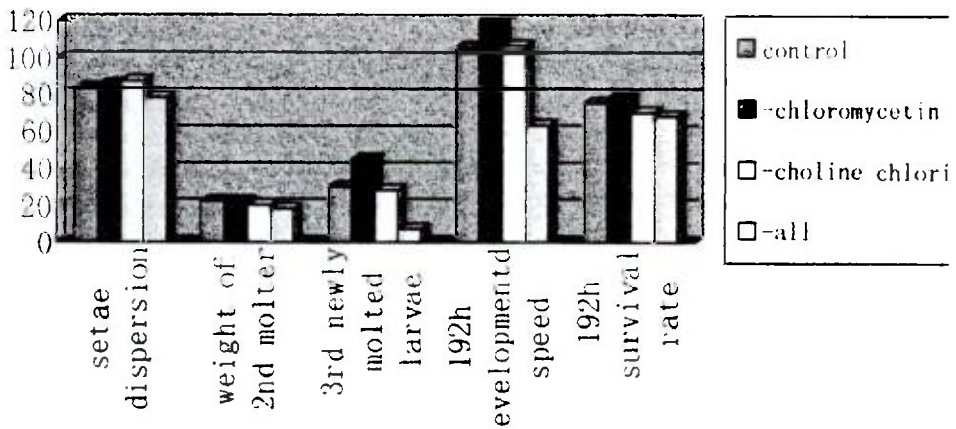


Fig. 1. Effect of minor elements on the growth and development of the young silkworms.

Fig. 1. Effet des éléments mineurs sur la croissance et le développement des jeunes vers à soie.

Table I. Comparison of the effects and cost of different antiseptics.

Tableau I. Comparaison des effets et du coût de différents antiseptiques.

Antiseptics	Sodium benzoate			Sorbic acid			Propionic acid			Bavistine		
Antiseptique	Benzoate de sodium			Acide sorbique			Acide propionique					
Concentration (%)	0.25	0.50	0.75	0.25	0.50	0.75	0.25	0.50	0.75	0.05	0.10	0.15
Antiseptic duration (d) Durée de conservation de l'antiseptique (d)	6	10	> 15	10	> 15	> 15	5	15	>15	3	5	8
Setac dispersion rate (%) Taux de dispersion des soies (%)	94.74	96.71	84.23	99.06	100	100	99.22	97.72	95.83	97.73	95.97	99.17
Price (yuan / kg) Prix (yuan / kg)	79.2			424.00			63.00			10.00		

Table II. The antiseptic effect of different contents of sorbic acid and sorbic acid + propionic acid.

Tableau II. Effet antiseptique de différentes teneurs en acide sorbique et en acide sorbique + acide propionique.

Antiseptics		Sorbic acid									Sorbic acid + propionic acid						CK
<i>Antiseptique</i>		<i>Acide sorbique</i>									<i>Acide sorbique + acide propionique</i>						
											0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	
Concentration (%)		0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0
Preservation time (d)		2	3	4	10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	6	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	2
<i>Durée de conservation (j)</i>																	

Table III. Effects of different contents of antiseptics and 0.05% bavistin on the growth and development of young silkworms.

Tableau III. Effets de différentes teneurs en antiseptiques associés à la bavistine à 0,05 % sur la croissance et le développement des jeunes vers à soie.

Antiseptics			Weight of molter (mg)		Rate of newly molted larvae		Development speed		Survival rate (%)	
	Preservation time (d)	Setae dispersion (%)	1 st moulter	2 nd moulter	2 nd instar (96 h)	3 rd instar (192 h)	1 st instar (96 h)	2 nd instar (192 h)	96 h	192 h
			Poids du muant (mg)		Taux de larves nouvellement muées		Vitesse de développement		Taux de survie (%)	
Antiseptique	Temps de conservation (j)	Dispersion des soies (%)	1 ^{ère} mue	2 ^{ème} mue	2 ^{ème} âge (96 h)	3 ^{ème} âge (192 h)	1 ^{er} âge (96 h)	2 ^{ème} âge (192 h)	96h	192h
A + 0.05 % bavistin	10	98.53	5.34	23.5	49.70	45.24	120.15	115.27	99.33	96.37
B + 0.05 % bavistin	> 10	99.45	5.39	23.4	45.38	43.66	120.36	116.98	98.90	95.05

A. 0.10% sorbic acid + 0.15% propionic acid / 0,10 % d'acide sorbique + 0,15 % d'acide propionique.

B. 0.15% sorbic acid + 0.20% propionic acid / 0,15 % d'acide sorbique + 0,20 % d'acide propionique.

Comparative tests for antiseptics :

The table I shows that the antiseptic effects of sorbic acid and propionic acid were better than that of sodium benzoate (control). Among them, 0.25% of sorbic acid could keep the diet fresh for 10 days. But the antiseptic effect of bavistin was less, furthermore, the fungi were not found and the bacteria were numerous in the bavistin treatment.

The antiseptic effect of different contents of sorbic acid and sorbic acid + propionic acid :

The antiseptic effect of different contents of sorbic acid and the mixture of sorbic acid and propionic acid is shown in Table II. In this test, 0.2% of sorbic acid could keep the diet fresh for 10 days as did the mixture of 0.15% sorbic acid and 0.20% propionic acid, but the diet molded in 2 days in control.

Because the price of propionic acid was much lower than that of sorbic acid, and bavistin was an effective fungicide, we studied the effects of the mixture of different antiseptics on the growth and development of young silkworms. The results are shown in Table III.

The results suggested that the diet could be preserved for 10 days with 0.10% sorbic acid and 0.15% propionic acid and 0.05 bavistin. So it can be used in once for 1-2 instars rearing in practice and the cost is cheap.

CONCLUSION

Chloromycetin is a bacterial inhibitor, but hinders the feeding habit of silkworm larvae. When the chloromycetin was added to the diet, the diet was inappetent and the silkworms refused to feed. The results of this study suggested that inositol, gallic acid and choline chloride are indispensable to silkworm, but chloromycetin can be removed from diet.

There are many studies about the use of antiseptics in the artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori* L. But sorbic acid and sodium benzoate were the main antiseptics in practice. This study showed that antiseptic efficiency of sodium benzoate was relatively poor and inhibited the silkworm larvae feeding. Sorbic acid is a strong antiseptic but the price is high. So is the mixture of sorbic acid, propionic acid and bavistin is an ideal antiseptics both in antiseptic efficiency and cost.

REFERENCES

- CAI Y., WANG H. & LI S. (1980) Studies on the artificial diet rearing. Sericultural Science China, 6(3) : 181-186.
- HORIE Y. & ITO T. (1963) Vitamin requirements of the silkworm. Nature, 197(4862) : 98-99.
- HORIE Y. & ITO T. (1965) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*—X. Vitamin B requirements and the effects of several analogues. J. Insect Physiol., 11(10) : 1585-1593.
- ITO T. (1961) Effect of dietary ascorbic acid on the silkworm, *Bombyx mori* L. Nature, 192(4906):951-952.
- ITO T. (1961) Studies on the nutrition of silkworm, *Bombyx mori*. III. Sterol requirement and its effect on the feeding habit of silkworm. Bulletin of Sericultural Station, Japan, 17(1) 91-117.
- ITO T. (1961) Studies on the nutrition of silkworm, *Bombyx mori* L. IV. The effects of ascorbic acid on silkworm growth. Bulletin of Sericultural Station, Japan, 17(1) : 91-117.
- ITO T. (1964) Effects of sterols on feeding and nutrition of silkworm, *Bombyx mori* L., J. Insect Physiol., 10(2) : 225-238.
- ITO T. (1967) Nutrition requirements and artificial diets for the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn, 36(40) : 315-319.
- ITO T. (1981) Development of artificial diets and their application in sericulture. Sericologia, 21(4) : 298-306.
- MIAO Y., XU J. & YANG Y. (1994) Studies of antiseptic and shaping of artificial diet for silkworm, *Bombyx mori* L. Bulletin of sericulture Zhejiang, 25(4) : 29-30.
- SHYAMALA M. B. & BHAT J. V. (1962) Chloromycetin in the nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol., 8 : 241-250.

ETUDES SUR LES ELEMENTS MINEURS ET LES ANTISEPTIQUES DES ALIMENTS ARTIFICIELS POUR LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUN-GEN & JIANG LI-JUN

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

Il y a des relations étroites entre les éléments mineurs contenus dans le milieu artificiel et la nutrition du ver à soie sur l'aliment artificiel. Le test pratiqué suggère que la chloromycétine est un inhibiteur de l'alimentation chez les larves de ver à soie. Mais l'inositol, l'acide gallique et le chlorure de choline sont indispensables à la croissance et au développement des larves de vers à soie.

L'ajout d'antiseptiques est important pour empêcher l'aliment d'être dévalué. 0,10 % d'acide sorbique, 0,15 % d'acide propionique et 0,05 % de bavistine conservent la fraîcheur du milieu pendant plus de 10 jours. Il peut donc être utilisé une seule fois pendant les 1er et 2ème âges et son coût est faible.

INTRODUCTION

Les ingrédients composant l'aliment artificiel ont été étudiés principalement en fonction des habitudes alimentaires, des besoins de la croissance et du développement et de la qualité et de la quantité de cocons du ver à soie, *Bombyx mori* L. (Ito, 1981). Le coût est aussi un facteur important dans la pratique. Les éléments mineurs et les antiseptiques sont étroitement associés à la nutrition et à la durée de l'aliment artificiel (Miao, 1994 ; Cai, 1980 ; Shyamala, 1962). Parmi les éléments mineurs, les mélanges de vitamine B et de vitamine C représentent le coût principal de l'aliment artificiel et sont importants pour la croissance du ver à soie (Cai et coll., 1980 ; Horie et coll., 1963 ; 1965 ; Ito, 1961 et Ito, 1981).

Dans cet article, nous étudions les types et les besoins en éléments mineurs et en antiseptiques dans l'aliment artificiel du ver à soie, *Bombyx mori* L.

MATERIELS ET METHODES

Races de vers à soie :

Nous avons utilisé le ver à soie hybride Qingsong × Haoyue, fourni par le Sericultural Department du Zhejiang Agricultural Bureau.

Ingrédients de base testés :

Ingrédients	Quantité (g)	Ingrédients	Quantité (g)
Poudre de feuille de mûrier	30	Mélange de sels	2
Farine de soja	35	Mélange de vitamine B	0,5
Amidon de maïs	20	Acide ascorbique	1,0
Sucrose	4	Eléments mineurs	
Acide citrique	3	Antiseptiques	
Carraghénine	6	Eau	250 ml

Test des éléments mineurs :

Pour le témoin, on ajoute de la chloromycétine (0,2 %, usage médical brut p/p), du chlorure de choline (0,2 % p/p), de l'inositol (0,5 % p/p) et de l'acide gallique (0,5 % p/p) à l'ingrédient de base. Dans les traitements testés, on enlève respectivement les substances ci-dessus de l'aliment.

Antiseptiques testés :

Le benzoate de sodium, l'acide sorbique, l'acide propionique, la bavistine et leur mélange utilisés comme antiseptiques sont ajoutés au milieu artificiel (p/p).

Composition du milieu artificiel :

Un jour avant avoir recueilli les larves nouvellement écloses, on prépare le milieu en mélangeant soigneusement les ingrédients de l'aliment. On ajoute trois fois la quantité d'eau à l'aliment en poudre et on le mélange de manière homogène. L'aliment mélangé humide est étalé sur un plateau d'élevage et cuit pendant 35 minutes à 100° C, puis le plateau avec l'aliment est refroidi à température ambiante.

Méthodes d'élevage :

Les larves nouvellement écloses sont conservées sur le milieu artificiel étalé et le milieu est fourni une fois à chaque âge. Les vers à soie sont élevés en masse jusqu'au troisième âge. Chaque groupe test est constitué de trois répétitions, chacune de 150 larves.

Conditions d'élevage :

L'élevage sur aliment artificiel est réalisé à 28-29° C, 85 à 90 % d'HR pour le premier âge ; 28° C, 80 à 85 % d'HR pour le 2^{ème} âge. Après le 3^{ème} âge, les larves de ver à soie sont élevées avec des feuilles de mûrier ordinaires.

Caractères étudiés :

La dispersion des soies du ver à soie 24 hr ou 48 h après l'éclosion, le taux de survie, le taux de vers à soie nouvellement mués, le poids du ver à la 1^{ère} ou à la 2^{ème} mue et la vitesse de développement sont mesurés. La formule pour le développement est la suivante :

$$\frac{\text{Nombre de l'âge ciblé} \times 50 + \text{nombre de vers à soie muants pour l'âge ciblé} \times 100 + \text{nombre de vers de l'âge suivant} \times 150}{\text{Nombre total de vers à un moment décidé}}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

Effets des éléments mineurs sur la croissance et le développement des jeunes vers à soie :

La croissance et le développement des jeunes vers à soie sont présentés dans la Figure 1.

La figure 1 montre que quand on supprime la chloromycétine de l'aliment, le développement des jeunes vers à soie s'accélère et le taux de larves ayant effectué leur 3^{ème} mue est plus élevé que chez le témoin. Ce résultat suggère que la chloromycétine inhibe l'alimentation et la croissance et le développement du ver à soie, mais n'a pas beaucoup d'effet sur le poids des larves après la 3ème mue et sur le taux de survie. De plus, quand on enlève le chlorure de choline des ingrédients, le taux de survie et le taux de larves après la 3ème mue sont plus faibles que ceux du témoin. Cela suggère que le chlorure de choline est un matériau nutritif nécessaire. Si on enlève tous les 4 éléments mineurs de l'aliment, cela inhibe sérieusement la croissance et le développement et le taux de larves après la 3ème mue tombe à presque zéro.

Tests comparatifs des antiseptiques :

Le tableau I montre que les effets antiseptiques de l'acide sorbique et de l'acide propionique sont plus élevés que ceux du benzoate de sodium (témoin). L'acide sorbique à 0,25 % peut conserver la fraîcheur de l'aliment pendant 10 jours. Mais l'effet antiseptique de la bavistine est moindre ; de plus on ne trouve pas de champignons et les bactéries sont nombreuses avec le traitement à la bavistine.

Effet antiseptique des différentes teneurs en acide sorbique et en acide sorbique + acide propionique :

L'effet antiseptique de différentes teneurs en acide sorbique et du mélange acide sorbique + acide propionique est présenté dans le Tableau II. Dans ce test, l'acide sorbique à 0,2 % permet de conserver la fraîcheur de l'aliment pendant 10 jours, comme le mélange avec 0,15 % d'acide sorbique et 0,20 % d'acide propionique alors que l'aliment moisit en 2 jours chez le témoin.

Comme le prix de l'acide propionique est beaucoup plus bas que celui de l'acide sorbique, et que la bavistine est un fongicide efficace, nous avons étudié les effets du mélange de différents antiseptiques sur la croissance et le développement des jeunes vers à soie. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.

Les résultats suggèrent que l'aliment peut être conservé pendant 10 jours avec 0,10 % d'acide sorbique, 0,15 % d'acide propionique et 0,05 % de bavistine. Il peut donc être utilisé une seule fois pendant l'élevage des 1^{er} et 2^{ème} âges en pratique et son coût est bon marché.

CONCLUSION

La chloromycétine est un inhibiteur bactérien, mais elle gêne les habitudes alimentaires des larves de vers à soie. Quand on ajoute de la chloromycétine au milieu, l'aliment devient inappétent et les vers à soie refusent de se nourrir. Les résultats de l'étude suggèrent que l'inositol, l'acide gallique et le chlorure de choline sont indispensables au ver à soie, mais on peut enlever la chloromycétine de l'aliment.

Il existe de nombreuses études sur l'utilisation d'antiseptiques dans l'aliment artificiel pour le ver à soie, *Bombyx mori* L. Mais en pratique, l'acide sorbique et le benzoate de sodium sont les principaux antiseptiques. Cette étude montre que l'efficacité antiseptique du benzoate de sodium est relativement faible et inhibe l'alimentation des larves de vers à soie. L'acide sorbique est un antiseptique puissant mais son prix est élevé. Il en va de même pour le mélange acide sorbique + acide propionique. Le mélange acide sorbique, acide propionique et bavistine est donc un antiseptique idéal à la fois en raison de son efficacité antiseptique et de son coût.

OPTIMAL CONDITIONS OF HOST - PARASITOID DENSITY, RATIO AND AGE FOR THE MULTIPLICATION OF *NESOLYNX THYMUS* (GIRAULT), A PARASITOID OF THE UZIFLY, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi - 835 303 (India).

Nesolynx thymus (Girault) (Hymenoptera: Eulophidae) is a parasitoid of uzi fly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae), a endoparasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) causing considerable damage to tasar silk industry. The effect of different age, ratio and density of parasitoid vs host on the mass multiplication of a gregarious parasitoid *N. thymus* was studied. Maximum parasitoid progeny can be obtained by maintaining a density of 500:2000 parasitoid (two days old) to host (two days old) in 60 × 30 × 30 cm unit area of glass cage. It can be stated that one female (gravid) parasitoid Vs four host puparia was found to be the optimum ratio for multiplying the parasitoid on *B. zebina* as it resulted in the production of maximum number of healthy adults, besides providing a high per cent parasitism.

Keywords: Uzifly, *Blepharipa zebina*, silkworm, *Antheraea mylitta*; tachinidae; Saturniidae; parasitoid; *Nesolynx thymus*; Eulophidae; multiplication.

INTRODUCTION

The *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae) commonly known as uzi fly, a serious endoparasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) causing considerable damage to tasar silk 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). *Nesolynx thymus* (Girault) (Hymenoptera: Eulophidae) has been reported as parasitoid of *B. zebina* (Kishore *et al.*, 1996; Kishore *et al.*, 1999). Among the various biological and physical characteristics studied, developmental stages, fecundity, longevity and tolerance limit of the parasitoid species to temperature and humidity play an important role in determining the mass culture (Kishore *et al.*, 1994). However, for mass multiplication of any natural enemy, it is essential to standardise the age, ratio and density of the host and parasitoid used. Many hymenopterous parasitoids are known to increase progeny production in response to rising host densities (Legner, 1967).

Therefore, the present study was undertaken to observe the effect of age, ratio and density of host and parasitoid to determine the maximum progeny production of *N. thymus* per unit of space.

MATERIALS AND METHODS

The laboratory colony of *N. thymus* was maintained at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ and $70 \pm 5\%$ RH on the puparia of uzi fly, *B. zebina*. To determine the effect of host age on the parasitisation and progeny production of parasitoid, *N. thymus*, single one day old mated female parasitoid was provided with 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 day old 1, 2, 3, 4 and 5 host puparia kept separately in 10 × 2.2 cm glass vials. Similarly

1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 and 1:10 parasitoid to host ratio was maintained separately with 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days old mated female parasitoid to observe the effect of parasitoid age on the progeny production of *N. thymus*.

After determining the optimum age of host (2 days) and parasitoid (2 days) and the best parasitoid to host ratio (1:4) parasitoids and hosts were maintained in different densities in 60 × 30 × 30 cm glass cage for five days. The parasitoids were fed on 50 % aqueous honey solution. The parasitoid progeny, emerged from 100 parasitised puparia was counted. All the treatments were replicated five times. Replicated data were subjected to statistical analysis (Fisher and Yates, 1963) to determine the level of significance following ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the effect of host and parasitoid age on the average parasitisation and progeny production of single female *N. thymus* are presented in Table I. Maximum four puparia were parasitised when two day old puparia were provided and three puparia parasitised when 1, 3, 4 and 5 day old host were provided. There is a significant decline ($P < 0.05$) in the number of puparia parasitised in their late stage (8 days old) of development as compared to 1 to 6 days old puparia. However, maximum parasitisation takes place in the early stage of development of host puparia (1 to 5 days old).

The mean number of offspring produced by single female parasitoid was 173.53, 185.72, 175.50 and 168.06 when 1, 2, 3 and 4 days old puparia were provided to the parasitoid. It was observed that progeny production was affected when 5 to 10 days old puparia were exposed to the parasitoids. Age of parasitoid on progeny production has no significant difference as evident from table that when 1 to 10 days old parasitoids were exposed to uzi fly puparia (Table I). However, maximum parasitisation takes place when two days old parasitoid was provided to uzi fly puparia followed by 1, 3, 4 and 5 days old.

Progeny production was not found to be significantly correlated with the every succeeding increase in the number of host puparia exposed to single parasitoid (Table II). Parasitisation rate was 100% when 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 ratio of parasitoid Vs host puparia was maintained. However, it is clear from data that significant decline ($P < 0.05$) in parasitisation rate was found when 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 and 1:10 ratio between parasitoid and host puparia was maintained.

These findings therefore, suggest that maximum progeny production is obtained by providing two days old 4 host puparia to single (Two days old) parasitoid. Jalali *et al.*, (1987) reported that when 1 – 10 days old host pupae were offered to *Cotesia marginiventris* in the laboratory at $27 \pm 1^\circ \text{C}$ and 50-60% RH, rate of parasitism was highest on 3 to 5 days old larvae and maximum population of female parasitoids emerged from 3 to 7 days old host larvae.

Data indicated in Table II revealed that there is a direct and progressive relationship between the progeny production and the increase in number of host puparia. It is therefore, inferred that maximum progeny production can be obtained by maintaining 1:4 parasitoid to host ratio.

Parasitoid progeny production increases when parasitoid to host density increased from 250:1000, 375:1500 to 500:2000 (Table III) and accordingly 95850 adults of *N. thymus* can be obtained from 60 × 30 × 30 cm area when 500:2000 parasitoid to host density was maintained. A further increase in parasitoid to host density i.e. from 500:2000 to 625:2500 and 750:3000 results in a decrease of the progeny production significantly. Ulleyet (1949) in *Gyptus* sp. noted the increase in productivity of the female in direct proportion to the density of the parasitoid population. De Bach and White (1960) while studying the effect of densities of *Aphytis lignanensis* Comp. pointed out that with a higher inoculum of host and parasitoid density, a point would be reached at which parasitoid progeny produced per unit space will decrease. Puri and Sangwan (1972) and Utida (1950) observed the same trend in case of *Neocalolaccus mamezophagous* and *Bracon gelechiae*, respectively. The present observations also show the similar pattern as described by these workers.

Table I. Effect of host and parasitoid age on the average parasitisation and progeny production (in number) of single female *Nesolynx thymus*.

Tableau I. Effet de l'âge de l'hôte et du parasitoïde sur le parasitisme moyen et la production de descendants (en nombre) d'une femelle Nesolynx thymus.

Age of host puparia and parasitoids (in days)	Host age		Parasitoid age	
	Host puparia parasitised over five pupa (mean)	Progeny production in number by single parasitoid (mean)	Host puparia parasitised over five pupa (mean)	Progeny production in number by single parasitoid (mean)
	<i>Age de l'hôte</i>		<i>Age du parasitoïde</i>	
<i>Age du puparium hôte et des parasitoïdes (en jours)</i>	<i>Pupariums hôtes parasités sur cinq pupes (moyenne)</i>	<i>Production de descendance en nombre par parasitoïde (moyenne)</i>	<i>Pupariums hôtes parasités sur cinq nymphes (moyenne)</i>	<i>Production de descendance en nombre par parasitoïde (moyenne)</i>
1	3.00	173.53	3.50	188.60
2	4.00	185.72	4.00	190.51
3	3.00	175.50	3.00	178.74
4	3.00	168.06	2.85	159.67
5	3.00	130.02	2.75	145.28
6	2.00	97.55	2.00	141.50
7	2.00	60.64	1.50	137.22
8	1.50	41.32	1.00	139.32
9	1.00	38.23	0.60	138.07
10	00	0.00	0.50	137.35
C.D. at 5%	0.62	24.70	0.54	NS

C. D. = $P < 0.05$

NS = Not significant / Non significatif.

Table II. Per cent parasitism and number of adult parasitoids per parasitised pupa at different parasitoid vs host ratios.*Tableau II. Pourcentage de parasitisme et nombre de parasitoïdes adultes par pupe parasitée avec différents ratios parasitoïde / hôte.*

Parasitoid Vs Host ratio	Parasitisation (%)	Mean number of parasitoids emerged per parasitised pupa
<i>Ratio Parasitoïde / hôte</i>	<i>Parasitisme (%)</i>	<i>Nombre moyen de parasitoïdes ayant émergé par pupe parasitée</i>
1:1	100.0 ± 00 (90.00)	126.00 ± 2.64
1:2	100.0 ± 00 (90.00)	125.00 ± 2.37
1:3	100.0 ± 00 (90.00)	124.00 ± 3.60
1:4	100.0 ± 00 (90.00)	122.00 ± 4.58
1:5	80.0 ± 1.32 (63.43)	110.00 ± 2.34
1:6	66.7 ± 1.66 (54.76)	114.00 ± 1.73
1:7	57.1 ± 3.37 (49.08)	115.00 ± 5.00
1:8	50.0 ± 5.00 (45.00)	117.00 ± 3.00
1:9	38.9 ± 1.32 (38.59)	115.00 ± 3.60
1:10	30.0 ± 5.00 (33.21)	110.00 ± 3.32
C.D at 5%	1.32	NS

Figures in parenthesis indicate the mean data after angular transformation followed by $\pm$ SD. / *Les chiffres entre parenthèses indiquent les données moyennes après transformation angulaire suivies par l'écart type.*

C. D. = $P < 0.05$. NS = Not significant / *Non significatif.*

Table III. Mass culture of *Nesolynx thymus* in 1 : 4 parasitoid to host ratio in different densities (cage size 60 × 30 × 30 cm).

Tableau III. Elevage de masse de *Nesolynx thymus* avec un ratio parasitoïde hôte de 1 : 4 à différentes densités (taille de la cage 60 × 30 × 30 cm).

Number of parasitoids	Number of puparia	Parasitisation (%)	Number of parasitoids emerged from 100 parasitised puparia		
			Male	Female	Sex ratio Male : female
<i>Nombre de parasitoïdes</i>	<i>Nombre de pupariums</i>	<i>% de parasitisme</i>	<i>Nbre de parasitoïdes ayant émergé de 100 pupariums parasités</i>		
			<i>Mâle</i>	<i>Femelle</i>	<i>Sexe ratio mâle : femelle</i>
250	1000	60.7 (51.18)	1001	3752	1:3.75
375	1500	69.1 (56.23)	1106	4280	1:3.87
500	2000	80.3 (63.65)	1204	4768	1:3.96
625	2500	68.3 (55.73)	828	3204	1:3.87
750	3000	65.1 (53.79)	587	2196	1:3.74
C.D. at 5%		11.25 NS	χ^2 test		4.39 NS

Figures in parenthesis indicate the mean data after angular transformation. / Les chiffres entre parenthèses indiquent les données moyennes après transformation angulaire.

C. D. = $P < 0.05$. NS = Not significant / Non significatif.

χ^2 = Chi square / Chi carré.

The present study, therefore, suggests that for mass multiplication of *N. thymus*, a maximum 95850 parasitoid progeny can be obtained by maintaining 1:4 parasitoid to host ratio and a density of 500:2000 parasitoid (2 days old) to host (2 days old) in 60 × 30 × 30 cm area of glass cage.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Shri Bahadur Guwala, T. A and Shri L. B. N. Shahdeo, Sr. F. A. for their assistance rendered during the present investigations. Authors are also grateful to Shri Suresh Rai, Statistician, CTR & TI, Ranchi for analysis of the experimental data.

REFERENCES

- CHATURVEDI H. K.; SAXENA V. & KHOTALE V. (1986) Survey of uzi fly infestation in Bastar district (India). *Indian J. Zool.*, 14(2): 27-32.
- DE BACH P. & WHITE E. G. (1960) Commercial mass culture of the California red scale parasite, *Aphytis lignanensis*. *Bull. Calif. Exp. Stn.*, 770: 1-58.
- FISHER R. A. & YATES F. (1963) *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. Longman, England, 146 p.
- JALLALI S. K., SINGH S. P. & BALLAL C. R. (1987) Studies on host age preference and biology of exotic parasite, *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Entomon*, 12: 59-62.
- JOLLY M. S., SEN S. K. & AHSAN M. M. (1974) *Tasar culture*. Ambica Publishers, Bombay, India, 266 p.
- KISHORE R., KUMAR P., MANJUNATH D. & DATTA R. K. (1994) Effect of temperature on the developmental period, progeny production and longevity of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae). *J. Biol. Control*, 8(1): 10-13.
- KISHORE R., BARDAIYAR B. N., GUPTA R. & KARNAN P. (1996) Bionomics and control of uzi fly. Annual Report, CTR & TI, Ranchi, India, 48p.
- KISHORE R., SHARMA S. P., PRASAD B. C., SINHA B.R.R.P. & THANGAVELU K. (1999) Evaluation of four hymenopteran parasitoids against uzi fly, *Blepharipa Zebina* Walker (Diptera: Tachinidae). National Seminar on tropical Sericulture at University of Agricultural Sciences, Bangalore on 28-30th December 1999, 53 p.
- LEGNER E. F. (1967) Behaviour changes in the reproduction of *Spalangia cameroni*, *S. endius*, *Muscidifurax raptor* and *Nasonia vitripennis* (Hym: Pteromalidae) at increasing fly host densities. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 60: 819-826.
- PURI S. N. & SANGWAN H. S. (1972) Economics of mass rearing of *Bracon gelechia* Ashmead. *Indian J. Ent.*, 34: 232-239.
- SINGH R. N. & THANGAVELU K. (1991) Parasites and predators of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* and their control measures. *Indian Silk*, 29(12):33-36.
- ULLEYET G. C. (1949) Distribution of progeny by *Chelonus taxanus* Crass. *Can. Ent.* 81: 25-44.
- UTIDA S. (1950) On the equilibrium state of the interacting population of an insect and its parasite. *Ecology*, 31: 165-175.

CONDITIONS OPTIMALES DE DENSITE, DE RATIO ET D'AGE DE L'HOTE ET DU PARASITOÏDE, POUR LA MULTIPLICATION DE *NESOLYNX THYMUS* (GIRAULT), UN PARASITOÏDE DE LA MOUCHE UZI, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, S. N. SINHADEO & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303 (Inde).

Nesolynx thymus (Girault) (Hymenoptera : Eulophidae) est un parasitoïde de la mouche uzi, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera : Tachinidae), un endoparasitoïde du ver à soie, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) causant des pertes considérables pour l'industrie de la soie tasar. Nous avons étudié l'effet de différents âges, ratios et densités du parasitoïde et de l'hôte sur la multiplication en masse du parasitoïde grégaire *N. thymus*. On peut obtenir la descendance maximum de parasitoïdes en maintenant une densité de parasitoïdes (âgés de deux jours) / hôtes (âgés de deux jours) de 500 : 2000 sur une surface unitaire de 60 × 30 × 30 cm dans une cage en verre. On peut dire que le meilleur ratio pour multiplier le parasitoïde sur *B. zebina* s'obtient avec une femelle parasitoïde (gestante) contre quatre nymphes hôtes puisqu'il permet d'obtenir la production maximum d'adultes sains, et donne en plus un pourcentage élevé de parasitisme.

INTRODUCTION

Blepharipa zebina Walker (Diptera : Tachinidae) connu couramment sous le nom de mouche uzi est un endoparasitoïde sévère du ver à soie, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) qui entraîne des pertes très importantes pour l'industrie de la soie tasar (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). Parfois, les pertes dues à cette mouche sont d'environ 40 % dans la zone tropicale tasar (Chaturvedi et coll., 1986 ; Singh et Thangavelu, 1991). *Nesolynx thymus* (Girault) (Hymenoptera : Eulophidae) a été recensé comme parasitoïde de *B. zebina* (Kishore et coll., 1996 ; Kishore et coll., 1999). Parmi les différentes caractéristiques biologiques et physiques étudiées, le stade de développement, la fécondité, la longévité et la tolérance limite de l'espèce de parasitoïde à la température et à l'humidité jouent un rôle important pour élaborer un élevage de masse (Kishore et coll., 1994). Cependant, pour la multiplication en masse de n'importe quel ennemi naturel, il est essentiel de standardiser l'âge, le ratio et la densité hôte / parasitoïde utilisés. On sait que de nombreux parasitoïdes hyménoptères augmentent la production de leur descendants lorsque les densités des hôtes augmentent (Legner, 1967).

Nous avons donc entrepris cette étude pour observer l'effet de l'âge, du ratio et de la densité hôte / parasitoïde pour obtenir la production maximum de descendants chez *N. thymus* par unité d'espace.

MATERIELS ET METHODES

La colonie de laboratoire de *N. thymus* est maintenue à $27 \pm 2^\circ \text{C}$ et $70 \pm 5\%$ d'HR sur des pupariums de la mouche uzi, *B. zebina*. Pour déterminer l'effet de l'âge de l'hôte sur la parasitisation et sur la production de descendants du parasitoïde, *N. thymus*, on fournit 1, 2, 3, 4 et 5 pupariums

hôtes âgés de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 jours conservés séparément dans des récipients en verre de $10 \times 2,2$ cm à un parasitoïde femelle accouplé d'un jour. De même, on maintient séparément un ratio parasitoïde / hôte de 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, 1 : 7, 1 : 8, 1 : 9 et 1 : 10 avec une femelle parasitoïde accouplée âgée de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 jours pour observer l'effet de l'âge du parasitoïde sur la production de descendants de *N. thymus*.

Après avoir déterminé l'âge optimal de l'hôte (2 jours) et du parasitoïde (2 jours) et le meilleur ratio parasitoïde / hôte (1 : 4) les parasitoïdes et les hôtes sont conservés avec différentes densités dans une cage en verre de $60 \times 30 \times 30$ cm pendant cinq jours. Les parasitoïdes sont nourris avec une solution aqueuse comprenant 50 % de miel. On compte la descendance du parasitoïde ayant émergé de 100 pupariums parasités. Tous les traitements sont répétés cinq fois. Les données concernant les répétitions sont soumises à une analyse statistique (Fisher et Yates, 1963) pour déterminer le niveau de signification puis à un test ANOVA.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'effet de l'âge de l'hôte et du parasitoïde sur la parasitisation moyenne et la production de descendants d'une femelle *N. thymus* sont présentées dans le Tableau I. Un maximum de quatre pupariums est parasité quand on fournit des pupariums de deux jours et trois pupariums sont parasités quand on fournit un hôte âgé de 1, 3, 4 et 5 jours. Il y a un déclin significatif ($P < 0,05$) du nombre de pupariums parasités à leur dernier stade de développement (8 jours) par rapport aux pupariums âgés de 1 à 6 jours. Par contre, un parasitisme maximum a lieu au début du stade de développement des pupariums hôtes (de 1 à 5 jours).

Le nombre moyen de descendants produit par une femelle parasitoïde est de 173,53, 185,72, 175,50 et 168,06 quand on lui fournit des pupariums de 1, 2, 3 et 4 jours. On observe que la production de descendants est affectée quand on expose des pupariums de 5 à 10 jours aux parasitoïdes. L'âge du parasitoïde n'entraîne pas de différence significative sur la production de descendants comme on peut le voir dans le tableau quand des parasitoïdes de 1 à 10 jours sont mis en présence de pupariums de la mouche uzi (Tableau I). Cependant, un parasitisme maximum a lieu quand on fournit des parasitoïdes de deux jours à des pupariums de la mouche uzi puis ensuite des pupariums âgés de 1, 3, 4 et 5 jours.

La production de descendants n'est pas corrélée de manière significative avec l'augmentation du nombre de pupariums hôtes exposés à un parasitoïde (Tableau II). Le taux de parasitisme est de 100 % quand on maintient un ratio de parasitoïdes / hôtes de 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 et 1 : 4. Cependant, il est clair d'après les données qu'il y a une baisse significative ($P < 0,05$) du taux de parasitisme quand on conserve un ratio entre les parasitoïdes et les hôtes de 1 : 5, 1 : 6, 1 : 7, 1 : 8, 1 : 9 et 1 : 10.

Ces observations suggèrent donc qu'on donne une production maximum de descendants en donnant 4 pupariums hôtes de deux jours à un parasitoïde (âgé de deux jours). Jalali et coll., (1987) ont signalé que lorsqu'on donne des larves hôtes de 1 à 10 jours à *Cotesia marginiventris* en laboratoire à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ et 50-60 % d'HR, le taux de parasitisme est le plus élevé sur des larves de 3 à 5 jours et une population maximum de parasitoïdes femelles émerge sur des larves hôtes de 3 à 7 jours.

Les données présentées dans le Tableau II révèlent qu'il y a une relation directe et progressive entre la production de descendants et l'augmentation du nombre de pupariums hôtes. On en déduit donc que la production de descendants maximum peut être obtenue en maintenant un ratio parasitoïde / hôte de 1 : 4.

La production de descendants du parasitoïde augmente quand la densité parasitoïde / hôte augmente de 250 : 1000, 375 : 1500 à 500 : 2000 (Tableau III) et en conséquence on peut obtenir 95850 adultes de *N. thymus* sur une surface de $60 \times 30 \times 30$ cm quand on maintient une densité parasitoïde / hôte de 500 : 2000. Une augmentation supplémentaire de la densité parasitoïde / hôte c'est à dire de 500 : 2000 à 625 : 2500 et 750 : 3000 entraîne une baisse significative de la production de descendants. Ulleyet (1949) a noté une augmentation de la productivité de la femelle chez *Gypsus*

sp. en relation directe avec la densité de la population du parasitoïde. De Bach et White (1960) pendant qu'ils étudiaient l'effet des densités de *Aphytis lignanensis* Comp. ont fait remarquer qu'avec un inoculum plus élevé de densité hôte / parasitoïde, on atteint un point à partir duquel la descendance de parasitoïdes produite par surface unitaire baisse. Puri et Sangwan (1972) et Utida (1950) ont observé la même tendance dans le cas respectivement de *Neocalolaccus mamezophagous* et *Bracon gelechiaae*. Nos observations correspondent à celles décrites par ces chercheurs.

Cette étude suggère donc que pour la multiplication en masse de *N. thymus*, on peut obtenir une descendance maximum de 95850 parasitoïdes en maintenant un ratio parasitoïde / hôte de 1 : 4 et une densité de 500 : 2000 parasitoïdes (âgés de deux jours) par rapport aux hôtes (âgés de deux jours) dans une cage en verre de 60 × 30 × 30 cm.

HOST PLANT ATTRACTIVITY IN A MODEL, *COTESIA GLOMERATUS* - *BOMBYX MORI* - MULBERRY

T. V. SATHE & A. D. JADHAV*

Department of Zoology, Shivaji University, Kolhapur - 416 004, India.

Host plant attractivity in a model, Cotesia glomeratus - Bombyx mori - mulberry has been studied. Juice of leaves, flower buds, stems, roots and saliva and feces of host larvae have been examined. It was observed that the factors responsible for oviposition stimulus were olfactory and visual.

Keywords: Parasitoids host plant interaction, *Cotesia glomeratus*, *Bombyx mori*, mulberry.

INTRODUCTION

Insect parasitoids play an important role in rearing of silkworms since they cause damage to worms by killing them. Hence there is a strong need to understand parasitoid host plant interactions in the present model, *Cotesia glomeratus* Cameron - *Bombyx mori* L. mulberry.

Various stimuli (visual, audio, chemical, etc.) help entomophagous insects (parasitoids) in finding and recognising their hosts (Salt, 1937; Arthur, 1966; Herrebut, 1969; Vinson, 1976, 1977). According to Herrebut (1969) the role of chemicals in classic insect plant relationship has received much attention however, importance of other cues and sensory modalities have gone relatively unexplored. In the past, Vinson (1968) Spreadberry (1970), Richerson & Borden (1972), Weseloh (1974) Sathe & Santhakumar (1988, 1992), Persoons *et al.*, (1993), Ngi-Song & Overholt (1997) etc. have attempted parasitoid host plant interactions in some models.

MATERIALS AND METHODS

Laboratory cultures of parasitoid and its host were used for the present experiments. The glass cages, 33 × 33 × 50 cm and test tubes (size 19 × 2.5 cm) were used for conducting the experiments under laboratory conditions (25 ± 1°C, 75 ± 3% RH, photoperiod 18 : 6 hr L : D). In each experiment, 10 mated female parasitoids were exposed for 5 min and the experiment was replicated five times. Because of the diverse nature of the experiments, methods and results of each of the foregoing experiments are presented separately wherever necessary. The main food plant of *B. mori* was grown out of door, other food plants were tested as indicated in the text, either cultivated in the laboratory or collected from the field during the experiments. The adult parasitoids were fed with pure honey and host larvae with mulberry leaves.

* Silkworm Seed Production Centre, Suleran, Sindhudurg (MS), India.

EXPERIMENTS AND RESULTS

a) Behaviour of *C. glomeratus* female on food plant:

Sequence of host seeking behaviours:

Potted mulberry plant (S-54) was taken in glass cage (size 33 × 33 × 50 cm) for observing the behavioural sequence of females of *C. glomeratus*. The observations were made on the sequence of seeking behaviours. A female landed on a leaf after flying around the plant at a few centimetres distance, she turned toward and approached the leaves of S-54 mulberry. Then, it walked around rather slowly touching leaf surface with its antennal tips. When it came across the leaf damaged by the feeding of silkworm larvae it raised its antennae and turned toward the damaged part. Then it raised its wings upright and / or turned its abdomen ventrally forward. Presence of a host larva brought up and down movements of abdomen, approaching its ovipositor to the host larva and leaping at it and stabbing. If host larva was not found, it continued intensive searching by raising wings and stabbing intention movements. Intensive searching sometimes continued for more than 4 min.

After landing on a healthy leaf, female stopped searching after 48 ± 4.28 sec. It waved its antennae and performed walking movements and flew to another leaf. Cleaning movements were also performed by its legs. The effective searching stimulus was by the leaves damaged by host larvae.

b) Food plant factors eliciting *C. glomeratus* female, searching :

Experiment-1: Responses to different food plant leaves:

In the experiments, food plants like mulberry *Morus alba* L. (M-5, local, S-54) sunflower (*Helianthus annuus* L.) castor (*Ricinus communis* L.), China rose, (*Hibiscus rosasinensis*), rose (*Rosa indica* L.) were used to observe the responses of female parasitoids. A leaf piece of 1.5 × 0.5 cm square was placed in each test tube (19 × 2.5 cm) with female parasitoid and observations were noted.

When females were exposed to leaf piece, they were attracted immediately and started orientation of antennae, followed by walking and flying movements. Female moved its antennae in upward and downward directions during walking. When it came 1.5 cm nearer to leaf piece, it stopped walking and moved antennae in circular directions and contacted the surface with antennae. After contacting, it came slowly upon the leaf surface and performed searching movements. When leaves were not damaged by host larvae, stabbing intention movements were not performed. The maximum searching period (100%) was on mulberry (M-5, S-54 & local variety leaves) and the minimum searching period (65%) was on castor leaf piece (Table I). Maximum search was observed on mulberry S-54 leaves, hence, considered for further experiments.

Experiment 2: Responses to food plant parts:

Pieces of mulberry leaf of S-54 variety (size, 1 × 1 cm), flower bud, fruit, bark of stem and root of mulberry were removed with the help of blade and exposed for observing the responses of females. 100% females have performed searching movements on leaf and 85% of them have searched on flower buds while, 82%, 94% and 36% of them searched on fruit, stem and root pieces respectively (Table II). The order of the preference of search was, leaves > stem > flower > bud > fruit > root (Table II). As the females showed maximum response to leaves, further experiments were carried out with leaves only.

The leaf pieces of size 1.5 × 0.5 cm were exposed to the females for 5 min for finding the role of morin factor in attracting female. The leaf pieces washed with distilled water were subjected to the females. 100% females have searched on intact leaf piece (mean 50.20 ± 7.98 sec). For leaf pieces washed with distilled water very few females (10%) showed searching movements. From above findings it is concluded that morin factor may be responsible for attracting the females towards S-54 mulberry plant.

Table I. Responses of female *C. glomeratus* to different food plant leaves of *B. mori*Tableau I. Réponses de la femelle *C. glomeratus* à des feuilles de différentes plantes

Food plants	Percent females searching	Mean search $\pm$ SE (sec.)
<i>Plantes hôtes</i>	<i>Pourcentage de recherche chez les femelles</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ SE (sec.)</i>
M-5	100	32.50 $\pm$ 7.32
Local	100	20.10 $\pm$ 2.19
S-54	100	48.20 $\pm$ 4.12
Sunflower / <i>Tournesol</i>	82	7.2 $\pm$ 2.43
Caster	65	5.00 $\pm$ 1.72
China Rose	70	2.5 $\pm$ 0.92
Rose	70	2.00 $\pm$ 0.5

Table II. Responses of *C. glomeratus* to host food plant partsTableau II. Réponses de *C. glomeratus* aux parties des plantes hôtes

Mulberry	Percent females searching	Percent female performed stabbing intention movements	Mean Search $\pm$ S. E. (Sec)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles exécutant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S. E. (Sec)</i>
Leaf / <i>Feuille</i>	100	Nil / <i>Nul</i>	50.20 $\pm$ 7.98
Flower bud / <i>Bourgeon de fleur</i>	85	Nil / <i>Nul</i>	9.75 $\pm$ 2.77
Fruit	82	Nil / <i>Nul</i>	5.00 $\pm$ 1.22
Stem / <i>Tige</i>	94	Nil / <i>Nul</i>	15.25 $\pm$ 3.19
Root / <i>Racine</i>	36	Nil / <i>Nul</i>	2.10 $\pm$ 1.22

Experiment 3: Response to cellophane wrapped leaves:

A piece, S-54 leaf (1.5×0.5 cm) was wrapped with transparent cellophane tape and placed in a test tube to see whether or not a visual stimulus is involved. The observation (Table III) showed that 82% female wasps were able to locate a food plant by visual stimuli, by walking and searching movements.

Table III. Responses of *C. glomeratus* to cellophane wrapped leaves of mulberryTableau III. Réponses de *C. glomeratus* à des feuilles de mûrier enveloppées de cellophane

Percent females searching	Mean Search $\pm$ S. E. (Sec)
<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Moyenne de recherche $\pm$ S. E. (Sec)</i>
82.00	20.00 $\pm$ 4.31

Experiment 4: Responses to collodionized leaves:

A leaf piece of S-54 variety mulberry leaf (1.5×0.5 cm) was collodionized and placed in test tube for exposure to female parasitoids. Activity on the collodionized leaf decreased by 38%. However, it was recovered to near the control, when the collodion was washed off with ether (Table IV). Above observations and results suggest that chemical stimuli and perhaps odour were responsible for eliciting searching.

Table IV. Responses of *C. glomeratus* female to collodionized leaf of mulberryTableau IV. Réponses des femelles de *C. glomeratus* à une feuille de mûrier collodionisée

Leaf	Percent females searching	Mean search $\pm$ S. E. (sec.)
<i>Feuille</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S. E. (sec.)</i>
Clean (control) / <i>Propre (témoin)</i>	100	24.25 $\pm$ 7.98
Collodionized / <i>Collodionisé</i>	62	15.35 $\pm$ 4.31
Collodion ether removed / <i>Collodion retiré à l'éther</i>	100	21.50 $\pm$ 4.04

Experiment 5: Responses to leaf extracts on filter paper:

An intact healthy mulberry leaf of S-54 variety was washed with 0.5 ml of diethyl ether for 5 sec. and the ether then applied to a piece of filter paper (1.5×0.5 cm). This experiment was designed to find out the role of leaf odour in attracting female parasitoids. It was observed that filter paper treated with extract was most attractive. All females have performed searching movements (Table V) (mean search 45.25 ± 7.39) and 76% of them have shown stabbing intention movement while for pure ether treated on paper none of the female have responded. Chemicals were thus shown as being responsible for searching in the tests.

Table V. Responses of *C. glomeratus* female to filter paper treated with ether extract of mulberry leaf

Tableau V. Réponses de femelles de C. glomeratus au papier filtre traité avec de l'extrait d'éther de feuille de mûrier

Mulberry	Percent females searching	Percent females shown stabbing intention movements	Mean search $\pm$ S. E. (Sec.)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S. E. (Sec.)</i>
Paper with extract of intact healthy leaf <i>Papier avec un extrait de feuille saine</i>	100	76.00	45.25 ± 7.39
Paper with ether alone <i>Papier avec de l'éther seul</i>	100	-	-

c) Damage leaf factors eliciting responses:

Experiment 6: Responses to leaves damaged by larvae of *B. mori*:

In a glass case, leaves of mulberry varieties M-5, local, S-54 and sunflower, caster, china rose and rose damaged by third instar *B. mori* were exposed for 5 min to individual parasitoid females. On mulberry varieties, the females continued intensive searching and showed stabbing intention movements but, they gave a very less response to other plants (Table VI). Maximum searching and stabbing intention movements (95%) were observed on the leaf of S-54. Other details are recorded in Table VI.

Experiment 7: Responses to damaged leaf extract on filter paper:

For investigating the existence of relevant stimuli emanating from the host larvae, the leaf pieces (1.5×0.5 cm) of mulberry variety, S-54 damaged by third instar *B. mori* were washed with 0.5 ml of ether for 10 sec. Filter paper pieces (1.5×0.5 cm) applied with washings were presented to the female wasps. All females (100%) have performed searching and stabbing intention movements at its edge. The mean duration of searching was also high, (35.20 ± 8.42). The exciting effect of filter paper treated this way was greater than that of an extract of piece of mulberry S-54 leaf cut to the same size (Table VII) and extract of intact leaves was less attractive (Table V). Other details are tabulated in

Table VI. The results suggest that factors responsible for searching and stabbing were olfactory. There exists a relevant stimulus that originates from the host larvae damaged leaves.

Experiment 8: Responses to saliva of host larvae:

12 hr starved larvae of third instar of *B. mori* forced to salivate on pieces of filter paper and mulberry leaf by pushing the mandibles against them. The saliva was also applied to edges of 5mm diameter hole punched in the papers and leaves.

Females have performed searching and stabbing intention for more duration on the test surfaces, regardless of where it was on the surface (Table VIII). The searching movements performed by the females are shown in Table VIII. Without saliva, no searching occurred on clean paper. Intensive searching reported only on to cut edge of mulberry leaf however, the saliva did not increase number of females searching on the mulberry leaf without saliva. The females performed prolonged searching or intensive searching inside the hole, making many circuits along its edges, in case of the punched samples. The filter paper treated with saliva was less effective than mulberry leaf treated. They started continuous searching only when their antennae contacted a spot of saliva. This contrasted with the behaviour on the mulberry leaves, to the treated margin of which the females were attracted and showed prolonged intensive searching, this indicates that contact chemicals from the oral secretions of the host larvae were responsible for the continuous searching. The factors that elicit females seem to be volatile ones.

Table VI. Responses of *C. glomeratus* female to leaves damaged by larvae of *B. mori*

Tableau VI. Réponses de la femelle *C. glomeratus* aux feuilles abimées par les larves de *B. mori*

Mulberry	Percent females searching	Percent females shown stabbing intention movements	Mean search $\pm$ S. E. (Sec.)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S. E. (Sec.)</i>
M-5	100	84	32.00 $\pm$ 8.45
Local	100	83	28.00 $\pm$ 7.18
S-54	100	95	48.60 $\pm$ 7.61
Sunflower / <i>Tournesol</i>	78	Nil / <i>Nul</i>	00.00
Caster / <i>Ricin</i>	62	Nil / <i>Nul</i>	00.00
China rose	79	Nil / <i>Nul</i>	00.00
Rose	88	Nil / <i>Nul</i>	00.00

Table VII. Responses of *C. glomeratus* female to damaged leaf extract on filter paperTableau VII. Réponses de la femelle *C. glomeratus* à un extrait de feuille abîmée sur du papier filtre

Mulberry	Percent females searching	Percent females shown stabbing intention movements	Mean search $\pm$ S. E. (Sec.)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S.E. (Sec.)</i>
Filter paper $\pm$ ether extract of damaged leaf <i>Papier filtre $\pm$ extrait éthéré de feuille abîmée</i>	100	100	35.20 $\pm$ 8.42
Filter paper + ether alone <i>Papier filtre + éther seul</i>	100	Nil / Nul	Nil / Nul
Extract of cut leaf <i>Extrait de feuille coupée</i>	100	80	22.40 $\pm$ 4.06
Cut leaf / <i>Feuille coupée</i>	100	Nil / Nul	22.20 $\pm$ 3.76

Table VIII. Responses of *C. glomeratus* female to objects treated with host larvaeTableau VIII. Réponses de la femelle *C. glomeratus* aux objets traités avec des larves hôtes

Mulberry	Percent females searching movement	Percent females shown stabbing intention	Mean search $\pm$ S. E. (Sec.)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne $\pm$ S. E. (Sec.)</i>
Mulberry leaf / <i>Feuille de mûrier</i>			
to edge / <i>au bord</i>	100	90	38.30 $\pm$ 7.18
around hole / <i>autour du trou</i>	100	86	39.70 $\pm$ 6.77
to surface / <i>à la surface</i>	100	73	28.00 $\pm$ 4.22
leaf without saliva / <i>feuille sans salive</i>	100	17	11.00 $\pm$ 2.43
Filter paper / <i>Filtre papier</i>			
to edge / <i>au bord</i>	76	32	17.50 $\pm$ 6.77
around hole / <i>autour du trou</i>	72	45	18.60 $\pm$ 4.20
to surface / <i>à la surface</i>	44	15	18.10 $\pm$ 3.76
leaf without saliva / <i>feuille sans salive</i>	00	00	00.00

Experiment 9: Responses to larval faeces:

The experiment was made to find out whether faeces of host larvae stimulate the wasps or not. For this, litter were collected from third instar of *B. mori* feeding on mulberry. Samples placed on pieces of mulberry leaf (1.5 × 0.5 cm) were introduced into test tubes along with the female wasps with fresh (wet) litter of silkworms, 100% females have performed searching movements and 77% of them have shown stabbing intention movements. Females parasitoids exposed to the wet litter reported intensive searching movements by all. However, only 42% of them have performed stabbing intention movements towards the dry litter of silkworms (Table IX). Here also the factors responsible were olfactory ones.

Table IX. Responses of *C. glomeratus* female to faeces of *B. mori* larva.Tableau IX. Réponses de la femelle *C. glomeratus* aux excréments des larves de *B. mori*.

<i>B. mori</i> larva	Percent females searching	Percent females showing stabbing intention movements	Mean search ± S. E. (Sec.)
<i>Larve B. mori</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne ± S. E. (Sec.)</i>
Fresh wet faeces / Excréments frais	100	77	18.20 ± 3.22
Dry faeces / Excréments secs	100	42	21.40 ± 6.72

Experiment 10: Responses to filter paper treated with mulberry leaf juice & host saliva:

The mulberry leaf contaminated with host saliva on cut edge was the most important aspect of host damaged leaves which excited the females. When saliva applied along the cut edge of mulberry, leaf was strongly attractive and effective in inducing excitement. Hence, the experiment was performed to find out whether the factors eliciting the parasitoids are the products of chemical reaction between leaf component and saliva. A piece of filter paper (1.5 × 0.5 cm) was prepared by punching a 5 mm hole in it through a mulberry leaf and saliva then applied along the edge of this hole. The results indicate that, females were attracted by the control filter paper with leaf juice alone and approached the filter paper with leaf juice and saliva and spend much time searching on it (Table X) and performed excitement at the treated edge. The observations show that, products of chemical reaction between host component and saliva are responsible for exciting the female parasitoids.

d) Host larva factors eliciting attacking behaviour:

Experiment 11: Response to host larvae:

When third instar larvae of *B. mori* exposed to female parasitoids along with mulberry leaves, induced exciting movements in female parasitoid. During these observations the host larva changed their location, in those conditions parasitoid females searched the host larvae by showing exciting and stabbing intention movements. For first oriented stabbing, their mean delay was 8.7 ± 2.75 sec. The female brushed over the larvae with the tips of antennae, moved over, unsheathed it for inserting its ovipositor by bending the tip of abdomen. A mean of 15 ± 4.74 sec. was observed for all successful search.

Table X. Responses of *C. glomeratus* female to filter paper treated with mulberry leaf juice and saliva of *B. mori*Tableau X. Réponses de *C. glomeratus* au papier filtre traité avec du jus de feuille de mûrier et de la salive de *B. mori*

Mulberry	Percent females searching	Percent females shown stabbing intention movements	Mean search (Sec.)
<i>Mûrier</i>	<i>Pourcentage de femelles en recherche</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Recherche moyenne (Sec.)</i>
Leaf juice + saliva <i>Jus de feuille + salive</i>	100	92	43.00 ± 10.39
Leaf juice / <i>Jus de la feuille</i>	100	21	24.20 ± 7.61

Table XI. Responses of female *C. glomeratus* to filter paper treated with extract of host larvaeTableau XI. Réponses de la femelle de *C. glomeratus* au papier filtre traité avec un extrait de larve hôte

<i>B. mori</i> larva	Percent females searching movements	Percent females shown stabbing intention movements	Time to first stab in seconds	Mean search ± S. E. (Sec.)
<i>Larve B. mori</i>	<i>Pourcentage de mouvements de recherche chez les femelles</i>	<i>Pourcentage de femelles présentant des mouvements intentionnels de perforation</i>	<i>Temps pour la première perforation en secondes</i>	<i>Recherche moyenne ± S. E. (Sec.)</i>
Intact larva / <i>Larve intacte</i>	100	100	5.50 ± 2.82	22.2 ± 2.81
Larva washed with ether <i>Larve lavée avec de l'éther</i>	100	74	9.25 ± 2.11	22.6 ± 3.34
Filter paper + ether extract <i>Papier filtre+ extrait étheré</i>	100	86	7.75 ± 2.44	25.75 ± 6.00
Filter paper with ether alone <i>Papier filtre avec de l'éther seul</i>	000	00	0.0	00.0

In all experiments n was 50 / Dans toutes les expériences n = 50.

A third instar larva of *B. mori* was inserted into each test tube to determine, whether parasitoid females will directly attack host larvae. Only when the larva was at a distance of 3 mm a female responded by directing their antennae forward approaching slowly and then stabbing it.

Experiment 12: Responses to host larvae wrapped in cellophane:

The silkworm larvae were wrapped in cellophane tape placed on a piece of mulberry leaf (1.5 × 0.5 cm) and introduced into test tubes to find out whether a visual stimulus is concerned with host location. The leaf and larva were responsible for all the parasitoid female for exciting and searching for a mean of 24 ± 2.62 sec. Thus, results showed that visual stimuli were essential to recognise a host.

Experiment 13: Responses to host larvae in dark:

The third instars of *B. mori* along with mulberry leaves were exposed to the female parasitoid in test tube under red dim light to investigate the parasitization behaviour of female parasitoid in dark. The parasitoid action was successful like in the light, with stabbing occurring in 20 ± 3.27 sec in twenty females.

Experiment 14: Responses to leaves contaminated with host odour:

To investigate whether the odour of the larva left on the leaf can stimulate the female or not, the third instar larvae of *B. mori* were rubbed against intact healthy leaves of mulberry and the leaves then exposed to the wasp females. All female parasitoids showed intensive mean search for 42 ± 13.29 sec. and further, they performed stabbing intention movements against the surface of the leaf without preliminary antennal contact. From above results it is concluded that an odour from the host larva was responsible for host location by female parasitoids.

Experiment 15: Responses to filter paper treated with extracts of host larvae:

Experiments were conducted to confirm whether the odour of the host larva elicits attacking behaviour in parasitoid. Third instar *B. mori* were washed for 10 sec with 5 ml ether and a strip of filter paper (2 × 6 mm) was impregnated with the extract of host larva. Into the test tube containing wasps, the filter paper or the washed larvae were placed on a piece of mulberry leaf (1.5 × 0.5 cm) and introduced. Both the washed larvae and filter paper were effective. 86% females have performed stabbing intention movements on the washed larvae (Table XI). The results indicated that females showed more difficulty to locate ether washed larvae than intact larvae. The results pertaining to responses of female to filter paper treated with extracts of host larvae are tabulated in Table XI.

DISCUSSION

In uzi fly *Exorista sorbillans* Beck, a parasitoid of *B. mori* it has been proven that semiochemicals play an important role in the host finding behaviour of this parasitoid. Persoons *et al.*, (1993) reported that silkworm rearing takes place indoors. The habitat in which silkworms are reared therefore, is an artificial habitat, that cannot be compared with the habitat of free living larvae in a field crop. In the latter case the parasitoids are attracted by semiochemicals released from the plants, but also physical factors play a role (e. g. colour of the crop). In the case of the silkworm uzi fly, complex semiochemicals are released from the food plants, of the silkworms may play a role but, it seems possible to assume that in case of the uzi fly habitat selection and host location is one and the same process induced by the same blend of chemicals, released from either the host plant, or from the host insect, or from both. Persoons *et al.*, (1993) also reported that the leaf material does not play a significant role in host finding behaviour of uzi fly unless it acts as a source from which larvae accumulate certain compounds that served as intermediates for the Kairomone biosynthesis or that

are excreted by insects without any change. They analysed several chemicals involved in host selection.

Some species of parasitoids detect their host by perception of the sound or vibrations produced by host larvae however, recent work has disproved the hypothesis that host produced sound or vibration sound produced by the parasitoid or odour were obligatory host finding stimuli (Richerson & Borden 1972). In *Cardiochiles nigriceps* Viereck, a habitual parasitoid of *Heliothis virescens* (F.) (Vinson, 1968) and *Microplitis croceipes* Viereck, a parasitoid of *Heliothis* species, mandibular gland secretion of host larva elicited searching behaviour. Sathe & Santhakumar (1988) conducted the experiments in order to investigate the factors responsible for parasitization behaviour in *Cotesia diurnii* R & N females. They reported that when the food plant flower buds, pods damaged by the host larvae, intact host larva, host larval saliva, host larval faeces and host larval extracts treated with ether were exposed, female parasitoids showed searching and stabbing intention movements and the odour was mainly responsible for searching followed by stabbing intention movements. The olfactory stimulus played a major role compared to visual in attracting a female parasitoid towards a host larva. In the present study, same parameters were considered and the factors responsible for eliciting parasitism behaviour were both olfactory and visual.

Vinson (1976) reported that parasitoids respond to both short range or contact cues and to long range volatile chemical cues during host selection. The use of semiochemicals for manipulating parasitoids seems to hold considerable potential as a technique for incorporation in pest management strategies. The timing and mode of application are also probably critical factors for success (Vinson, 1977).

Dead larvae and exuviae were quite acceptable to *Apanteles (Cotesia) melanoscelus* Ratzeburg females (Weseloh, 1974). Weseloh (1974) also reported that the chemical(s) within or on the integument of the host were responsible for less acceptability. In *Itopectis conquisitor* (Say) females were attracted to artificial host shelters such as paper tubes and oviposited in the host while moving (Arthur, 1966). Likely, Spradberry (1970) has reported that host frass plays a main role in attracting parasitoid, *Rhyssa persuasoria* (L.) (Ichneumonidae).

Ngi-song & Overholt (1997) studied host location and acceptance by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera, Braconidae), the parasitoids of African gramineous stem borers and reported the role of frass and other host cues. Naive females of *C. flavipes* and *C. sesamiae* were attracted in a T tube olfactometer to volatile kairomones from frass produced by *Chilo partellus* (Swinhoe), *Chilo orichalcociliellus* Strand, *Sesamia calamistis* Hampson and *Busseola fusca* (Fuller) fed on maize (*Zea mays* L.) sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumacher). In dual choice tests, *C. flavipes* and *C. sesamiae* were generally unable to discriminate between volatiles from frass produced by any of the four different stem borer species fed on maize stalk. When larvae of *C. partellus* and *S. calamistis* were washed in distilled water their acceptance by both parasitoid species was reduced.

Sathe & Santhakumar (1992) studied the influence of host and host food plant factors on parasitization behaviour of *Apanteles prodeniae* Viereck, a parasitoid of *Spodoptera litura* (Fab.) at laboratory conditions ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 3\%$ R. H.) in which the odour was mainly responsible for searching followed by stabbing intention movements. Olfactory stimuli played major role compared to visual in attracting a female parasitoid towards host larvae. In the present investigation on *C. glomeratus* - *B. mori* mulberry interactions, both olfactory and visual stimuli were responsible for bringing parasitism in parasitoids.

REFERENCES

- ARTHUR A. P. 1966 Associative learning in *Itopectis conquisitor* (Say.) (Hymenoptera, Ichneumonidae). Can. Ent., 98, 213-223.

- HERREBOUT W. M. 1969 Some aspects of host selection in *Eucarcelia rutilla* Vill. (Diptera, Tachinidae) Neth. J. Zool., 19, 1-104.
- NGI-SONG A. J. & OVERHOLT W. A. 1997 Host location and acceptance by *Cotesia flavipes* Cameron and *C. sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera, Braconidae), parasitoids of African gramineous stemborers, Role of grass and of the host cues. Biological Control, 9, 136-142.
- PERSOONS C. J., VEERANNA G., VOS J. D. & NAGASUNDARA K. R. 1993. The role of semiochemicals in the host finding behaviour of parasitoids with special reference to the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Tachinidae). "Recent advances in uzi fly research," Proceedings of National Seminar on uzi fly and its control. Eds. G. P. Channa Basavanna, G. Veeranna & S. B. Dandin, 167-189.
- RICHERSON J. V. & BORDEN J. H. 1972. Host finding behaviour of *Coeloides brunneri* (Hymenoptera, Braconidae). Can. Ent., 104, 1235-1250.
- SALT G. 1937. Experimental studies in insect parasitization V. The sense used by *Trichogramma* to distinguish between parasitized and non-parasitized host. Proc. Roy. Soc. London (B), 122, 57-75.
- SATHE T. V. & SANTHAKUMAR M. V. 1988. Host finding behaviour by *Cotesia diurnii* Rao & Nikam (Hymenoptera, Braconidae), a parasitoid of *Exelastis atomosa* Walsingham (Lepidoptera, Pterophoridae). Uttar Pradesh J. Zool., 8, 105-113.
- SATHE T. V. & SANTHAKUMAR M. V. 1992. Impact of host and plant parts on parasitization behaviour of *Apanteles prodeniae* Viereck, a parasitoid of *Spodoptera litura* (Fab.) Bull. Env. Sci., 10, 17-20.
- SPREADBERRY J. P. 1970. A technique for artificially culturing ichneumonid parasites of wood wasp. Ent. Exp. & Appl. 11, 257-260.
- VINSON S. B. 1968. Source of a substance in *Heliothis virescens* that elicits a searching response in its habitual parasite, *Cardiochiles nigriceps*. Ann. Ent. Soc. Am. 61, 8-10.
- VINSON S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. Ann. Rev. Ent., 21, 109-134.
- VINSON S. B. 1977. Behavioural chemicals in the augmentation of natural enemies, In "Biological Control by Augmentation natural enemies", R. L. Ridyway & S. B. Vinson eds. Plenum, New York, pp. 237-279.
- WESELOH R. M. 1974. Host-related microhabitat preferences of the gypsy moth larval parasitoid, *Parasetigena agilllis*. Environ Entomol., 3, 363-364.

ATTRACTIVITE DE LA PLANTE HÔTE DANS L'EXEMPLE *COTESIA GLOMERATUS* - *BOMBYX MORI* - MURIER

T. V. SATHE & A. D. JADHAV*

Department of Zoology, Shivaji University, Kolhapur – 416 004, Inde.

*Nous avons étudié l'attraction pour la plante hôte en prenant l'exemple *Cotesia glomeratus* - *Bombyx mori* - mûrier. Nous avons étudié le jus des feuilles, des bourgeons floraux, des tiges, des racines et la salive et les excréments des larves hôtes. Nous avons observé que les facteurs responsables de la stimulation de la ponte sont olfactifs et visuels.*

INTRODUCTION

Les insectes parasitoïdes jouent un rôle important dans l'élevage des vers à soie puisqu'ils nuisent aux vers à soie en les tuant. Il s'avère donc nécessaire de comprendre les interactions entre la plante hôte et le parasitoïde en étudiant le modèle *Cotesia glomeratus* Cameron – *Bombyx mori* - mûrier.

Des stimulations variées (visuelles, auditives, chimiques, etc ...) aident les insectes entomophiles (parasitoïdes) à trouver et reconnaître leurs hôtes (Salt, 1937 ; Arthur, 1966 ; Herrebout, 1969 ; Vinson, 1976, 1977). Selon Herrebout (1969) le rôle des substances chimiques dans la relation classique insecte / plante a reçu beaucoup d'attention, cependant, on a relativement peu exploré l'importance d'autres signaux et modalités sensoriels. Dans le passé, Vinson (1968), Spreadberry (1970), Richerson & Borden (1972), Weseloh (1974) Sathe & Santhakumar (1988, 1992), Persoons et coll., (1993), Ngi-Song et Overholt (1997) etc.. ont étudié certains modèles d'interactions entre les plantes hôtes et les parasitoïdes.

MATERIELS ET METHODES

Des élevages en laboratoire du parasitoïde et de son hôte sont utilisés pour les expériences présentes. Des cages en verre de 33 × 33 × 50 cm et des tubes à essai de (19 × 2,5 cm) sont utilisés pour réaliser les expériences dans des conditions de laboratoire (25 ± 1° C, 75 ± 3 % d'HR, photopériode 18 : 6 hr L : J). Pour chaque expérience, 10 parasitoïdes femelles accouplées sont exposées pendant 5 minutes et l'expérience est répétée cinq fois. En raison de la nature diverse des expériences, les méthodes et les résultats pour chaque expérience sont présentés séparément là où c'est nécessaire. La plante hôte principale de *B. mori* est cultivée à l'extérieur, les autres plantes hôtes testées comme il est indiqué dans le texte, sont soit cultivées en laboratoire ou recueillies dans les champs pendant les expériences. Les parasitoïdes adultes sont nourris avec du miel pur et les larves hôtes avec des feuilles de mûrier.

* Silkworm Seed Production Centre, Suleran, Sindhudurg (MS), Inde.

EXPERIENCES ET RESULTATS

a) Comportement de la femelle *C. glomeratus* sur la plante hôte :

Enchaînement des comportements de recherche de l'hôte :

On met un plant de mûrier dans une cage en verre ($33 \times 33 \times 50$ cm) pour observer l'enchaînement des comportements des femelles de *C. glomeratus*. Des observations sont faites sur l'enchaînement des comportements de recherche. Une femelle atterrit sur une feuille après avoir volé autour du plant à quelques centimètres de distance, puis elle tourne et approche les feuilles du mûrier S-54. Puis, elle marche assez lentement en touchant la surface de la feuille avec le bout de ses antennes. Quand elle arrive vers la feuille abîmée par les larves de vers à soie lorsqu'elles se nourrissent, elle lève ses antennes et se tourne vers les parties abîmées. Puis elle lève ses ailes en l'air et / ou tourne son abdomen en avant. La présence d'une larve hôte entraîne des mouvements de l'abdomen de haut en bas et elle approche son ovipositeur vers la larve hôte, saute dessus et la transperce. Si elle ne trouve pas de larve hôte, elle continue sa recherche intensive en levant ses ailes et en réalisant des mouvements intentionnels de perforation. La recherche intensive continue parfois pendant plus de 4 minutes.

Après avoir atterri sur une feuille saine, la femelle arrête de chercher après $48 \pm 4,28$ sec. Elle agite ses antennes et effectue des mouvements de marche et vole sur une autre feuille. Elle réalise aussi des mouvements de nettoyage avec ses pattes. La stimulation de la recherche est exercée par les feuilles abîmées par les larves hôtes.

b) Facteurs de la plante hôte entraînant une recherche de la femelle *C. glomeratus* :

Expérience 1 : Réponses à des feuilles de plantes hôtes différentes :

Dans les expériences, nous utilisons des plantes hôtes comme le mûrier *Morus alba* L. (M-5, local, S-54), le tournesol (*Helianthus annuus* L.), le ricin (*Ricinus communis* L.), la rose de Chine (*Hibiscus rosasinensis*), la rose (*Rosa indica* L.) pour observer les réponses des parasitoïdes femelles. Un morceau de feuille de $1,5 \times 0,5$ cm carré est placé dans chaque tube à essai ($19 \times 2,5$ cm) avec un parasitoïde femelle et les observations sont notées.

Quand les femelles sont exposées à un morceau de feuille, elles sont immédiatement attirées et commencent l'orientation de leurs antennes, puis elles font des mouvements de marche et de vol. La femelle bouge ses antennes de haut en bas lorsqu'elle marche. Quand elle arrive à 1,5 cm du morceau de feuille, elle arrête de marcher et bouge ses antennes dans des directions circulaires et entre en contact avec la surface de la feuille avec ses antennes. Après être entrée en contact avec la feuille, elle vient lentement sur la surface de la feuille et réalise des mouvements de recherche. Quand les feuilles ne sont pas abîmées par les larves hôtes, il n'y a pas de mouvements intentionnels de perforation. La période de recherche maximum (100 %) a lieu sur le mûrier (feuilles de M-5, S-54 et de la variété locale) et la période de recherche minimum (65 %) a lieu sur un morceau de feuille de ricin (Tableau I). La recherche maximum est observée sur les feuilles de mûrier de S-54, qui sera donc considéré pour des expériences ultérieures.

Expérience 2 : Réponses à différentes parties de la plante hôte :

Des morceaux de feuille de mûrier de la variété S-54 (taille de 1×1 cm), de bourgeon floral, de fruit, de l'écorce de la tige et de la racine sont excisés à l'aide d'une lame et exposés pour observer les réponses des femelles. 100 % des femelles réalisent des mouvements de recherche sur la feuille et 85 % d'entre elles effectuent une recherche sur les bourgeons floraux, tandis que 82 %, 94 % et 36 % d'entre elles font respectivement leur recherche sur des morceaux de fruit, de tige et de racine (Tableau II). La recherche se fait dans l'ordre de préférence suivant feuilles > tige > fleur > bourgeon > fruit > racine (Tableau II). Comme les femelles montrent une réponse maximum aux feuilles, les expériences suivantes sont réalisées avec les feuilles.

Les morceaux de feuille d'une taille de $1,5 \times 0,5$ cm sont exposés aux femelles pendant 5 minutes pour trouver le rôle de la morine dans l'attraction de la femelle. Les morceaux de feuille lavés avec de

l'eau distillée sont soumis aux femelles. 100 % des femelles font leur recherche sur un morceau de feuille intact (moyenne $50,20 \pm 7,98$ sec.) Très peu de femelles (10 %) effectuent des mouvements de recherche avec les morceaux de feuille lavés dans de l'eau distillée. D'après les observations ci-dessus, on peut conclure que la morine pourrait être responsable de l'attraction pour le plant de mûrier S-54.

Expérience 3 : Réponses à des feuilles enveloppées dans du cellophane :

Un morceau de feuille de S-54 ($1,5 \times 0,5$ cm) est enveloppé dans du papier de cellophane transparent et placé dans un tube à essai pour voir s'il existe une stimulation visuelle. L'observation (Tableau III) montre que 82 % des guêpes femelles sont capables de localiser la plante hôte grâce à des stimulations visuelles, en effectuant des mouvements de marche et de recherche.

Expérience 4 : Réponses à des feuilles collodionisées :

Un morceau de feuille de la variété de mûrier S-54 ($1,5 \times 0,5$ cm) est collodionisé et placé dans un tube à essai pour être exposé à des parasitoïdes femelles. L'activité sur la feuille collodionisée baisse de 38 %. Cependant, elle approche celle du témoin, quand le collodion est enlevé avec de l'éther (Tableau IV). Les observations et résultats ci-dessus suggèrent que les stimulations chimiques et peut-être l'odeur entraînent une recherche.

Expérience 5 : Réponses à des extraits de feuille sur du papier filtre :

Une feuille de mûrier saine intacte de la variété S-54 est lavée avec 0,5 ml de diéthyl éther pendant 5 secondes, puis on applique de l'éther sur un morceau de papier filtre ($1,5 \times 0,5$ cm). L'expérience est conçue de manière à trouver le rôle de l'odeur de la feuille pour attirer les femelles parasitoïdes. On observe que le papier filtre traité avec de l'extrait est le plus attirant. Toutes les femelles réalisent des mouvements de recherche (Tableau V) (recherche moyenne $45,25 \pm 7,39$) et 76 % font un mouvement intentionnel de perforation tandis qu'aucune femelle ne répond à de l'éther pur sur du papier. Les tests montrent donc que les substances chimiques sont responsables de la recherche.

c) Réponse à des feuilles de mûrier abimées :

Expérience 6 : Réponses à des feuilles abimées par les larves de *B. mori* :

Dans un récipient en verre, des feuilles de mûrier des variétés M5, locale et S-54 et du tournesol, du ricin, de la rose de chine et de la rose abimées par le ver *B. mori* au 3^{ème} âge sont exposées pendant 5 minutes à des parasitoïdes femelles. Sur les variétés de mûrier, les femelles continuent une recherche intensive et présentent des mouvements intentionnels de perforation mais leur réponse est bien moindre sur d'autres plantes (Tableau VI). Les mouvements intentionnels maximums de recherche et de perforation (95 %) sont observés sur la feuille de S-54. D'autres détails sont enregistrés dans le Tableau VI.

Expérience 7 : Réponses à un extrait de feuille abimée sur du papier filtre :

Pour tester l'existence de stimulations provenant des larves hôtes, des morceaux de feuilles ($1,5 \times 0,5$ cm) de la variété de mûrier S-54 abimées par des larves de *B. mori* du 3^{ème} âge sont lavés avec 0,5 ml d'éther pendant 10 secondes. Des morceaux de papier filtre ($1,5 \times 0,5$ cm) ayant reçu des applications lors des lavages sont présentés aux guêpes femelles. Toutes les femelles (100 %) réalisent des mouvements intentionnels de recherche et de perforation sur le bord. La durée moyenne de recherche est élevée ($35,20 \pm 8,42$). L'effet excitant du papier filtre traité de cette manière est plus grand que celui d'un extrait de morceau de feuille de mûrier S-54 coupé à la même taille (Tableau VII) et l'extrait des feuilles intactes est moins attirant (Tableau V). Les autres détails sont présentés dans le Tableau VI. Les résultats suggèrent que les facteurs responsables de la recherche et de la perforation sont olfactifs. Il existe une stimulation significative qui vient des feuilles abimées par les larves hôtes.

Expérience 8 : Réponses à la salive des larves hôtes :

Des larves de *B. mori* du troisième âge affamées depuis 12 h sont mises à saliver sur des morceaux de papier filtre et de la feuille de mûrier en poussant leurs mandibules contre elles. La salive est aussi appliquée sur les bords d'un trou de 5 mm de diamètre percé sur du papier et sur des feuilles.

Les femelles réalisent une intention de recherche et de perforation pendant une durée plus longue sur les matières testées quel que soit l'endroit sur la matière (Tableau VIII). Les mouvements de recherche réalisés par les femelles sont présentés dans le Tableau VIII. Sans la salive, aucune recherche n'a lieu sur du papier propre. Une recherche intensive n'a lieu que sur un morceau de feuille de mûrier coupé, cependant, la salive n'augmente pas le nombre de femelles cherchant sur la feuille de mûrier. Les femelles réalisent une recherche prolongée ou intensive à l'intérieur du trou en faisant de nombreux circuits le long des bords, dans le cas des échantillons percés. Le papier filtre traité avec de la salive est moins efficace que la feuille de mûrier traitée. Elles ne commencent leur recherche continue que lorsque leurs antennes entrent en contact avec une tache de salive. Cela contraste avec le comportement sur les feuilles de mûrier, là les femelles sont attirées par le bord traité et montrent une recherche intensive et prolongée. Cela indique que les substances chimiques de contact provenant des sécrétions orales des larves hôtes sont responsables de la recherche continue. Les facteurs qui attirent les femelles semblent être volatiles.

Expérience 9 : Réponses aux excréments des larves :

Nous avons réalisé une expérience pour savoir si les excréments des larves hôtes stimulent les guêpes ou non. Pour cela, nous récoltons les excréments de *B. mori* du 3^{ème} âge se nourrissant sur du mûrier. Les échantillons placés sur des morceaux de feuille de mûrier (1,5 × 0,5 cm) sont introduits dans les tubes à essai avec les guêpes femelles avec des excréments frais (mouillés) de vers à soie, 100 % des femelles réalisent des mouvements de recherche et 77 % d'entre elles font des mouvements intentionnels de perforation. Cependant, seulement 42 % d'entre elles réalisent des mouvements intentionnels de perforation sur les excréments secs des vers à soie (Tableau IX). Là aussi, les facteurs responsables sont olfactifs.

Expérience 10 : Réponses au papier filtre traité avec du jus de feuille de mûrier et de la salive de l'hôte :

Ce qui excite le plus les femelles chez les feuilles abimées par les hôtes est la contamination de la feuille de mûrier par la salive de l'hôte sur le bord coupé. Quand la salive est appliquée le long du bord coupé du mûrier, la feuille est très attirante et efficace pour générer une excitation. L'expérience est donc réalisée pour trouver si les facteurs qui provoquent les parasitoïdes sont les produits d'une réaction chimique entre le composant de la feuille et la salive. Un morceau de papier filtre (1,5 × 0,5 cm) est préparé en perforant un trou de 5 mm au travers d'une feuille de mûrier et la salive est ensuite appliquée au bord de ce trou. Les résultats indiquent que les femelles sont attirées par le papier filtre témoin avec le jus de feuille seul et elles approchent le papier filtre avec le jus de feuille et la salive et passent beaucoup de temps en train de chercher dessus (Tableau X) et sont excitées quand elles sont sur le bord traité. Les observations montrent que les produits de la réaction chimique entre le composant de la plante hôte et la salive sont responsables de l'excitation des parasitoïdes femelles.

d) Facteurs de la larve hôte entraînant un comportement d'attaque :

Expérience 11 : Réponse des larves hôtes :

Quand les larves du troisième âge de *B. mori* sont exposées aux parasitoïdes femelles avec des feuilles de mûrier, cela induit des mouvements d'excitation chez les parasitoïdes femelles. Pendant ces observations, les larves hôtes changent de place, dans ces conditions les femelles parasitoïdes cherchent les larves hôtes en montrant des mouvements intentionnels de perforation. Pour la première perforation orientée, leur délai moyen est de $8,7 \pm 2,75$ sec. La femelle brosse les larves avec le bout

de ses antennes, bouge, et sort son ovipositeur en pliant le bout de son abdomen. Une moyenne de $15 \pm 4,74$ sec. est observée pour la durée totale d'une recherche réussie.

On insère une larve de *B. mori* du 3^{ème} âge dans chaque tube à essai pour déterminer si les parasitoïdes femelles attaquent directement les larves hôtes. La femelle ne répond que lorsque la larve est à une distance de 3 mm en dirigeant ses antennes vers l'avant, en approchant lentement et en la transperçant.

Expérience 12 : Réponses aux larves hôtes enveloppées dans du cellophane :

Les larves de vers à soie sont enveloppées dans du papier cellophane, et placées sur une feuille de mûrier ($1,5 \times 0,5$ cm) et introduites dans des tubes à essai pour savoir s'il existe une stimulation visuelle en rapport avec la localisation de l'hôte. La feuille et la larve sont responsables chez tous les parasitoïdes femelles de l'excitation lorsqu'elles cherchent pendant une durée moyenne de $24 \pm 2,62$ sec. Les résultats montrent donc que les stimulations visuelles sont essentielles pour reconnaître un hôte.

Expérience 13 : Réponses aux larves hôtes dans l'obscurité :

Le troisième âge de *B. mori* et les feuilles de mûrier sont exposées au parasitoïde femelle dans le tube à essai sous une lumière rouge tamisée pour étudier le comportement de parasitisme des parasitoïdes femelles dans l'obscurité. L'action du parasitoïde est réussie comme avec la lumière, et le transperçement se produit après $20 \pm 3,27$ s. chez vingt femelles.

Expérience 14 : Réponses à des feuilles contaminées par l'odeur de l'hôte :

Pour étudier si l'odeur des larves laissée sur la feuille peut stimuler la femelle ou non, des larves du troisième âge de *B. mori* sont frottées contre des feuilles saines de mûrier et les feuilles sont ensuite exposées aux guêpes femelles. Tous les parasitoïdes femelles effectuent une recherche moyenne intensive pendant $42 \pm 13,29$ sec et de plus, elles essaient intentionnellement de transpercer la surface de la feuille sans contact préliminaire avec les antennes. D'après les résultats ci-dessus, nous concluons donc que l'odeur des larves est responsable de la localisation de l'hôte par les parasitoïdes femelles.

Expérience 15 : Réponses à du papier filtre traité avec des extraits de larves hôtes :

Des expériences sont réalisées pour confirmer si l'odeur des larves entraîne un comportement d'attaque chez le parasitoïde. Des larves de troisième âge de *B. mori* sont lavées pendant 10 sec. avec 5 ml d'éther et une bande de papier filtre (2×6 mm) est imprégnée avec de l'extrait de larve hôte. On place du papier filtre ou des larves lavées sur un morceau de feuille de mûrier ($1,5 \times 0,5$ cm) dans un tube à essai contenant les guêpes. Les larves lavées et le papier filtre sont tous les deux efficaces. 86 % des femelles réalisent des mouvements intentionnels de perforation sur les larves lavées (Tableau XI). Les résultats indiquent que les femelles présentent plus de difficulté pour trouver les larves lavées à l'éther que les larves intactes. Les résultats des réponses des femelles au papier filtre traité avec des extraits de larves hôtes sont présentés dans le Tableau XI.

DISCUSSION

Chez la mouche uzi *Exorista sorbillans* Beek, un parasitoïde de *B. mori*, il a été prouvé que les semio substances chimiques jouent un rôle important par rapport au comportement de localisation de l'hôte par le parasitoïde. Persoons et coll., (1993) ont précisé que l'élevage des vers à soie a lieu à l'intérieur. L'habitat dans lequel les vers à soie sont élevés est donc un habitat artificiel, qui ne peut pas être comparé à l'habitat de larves vivant librement dans un champ cultivé. Dans ce dernier cas, les parasitoïdes sont attirés par les semio substances chimiques libérées par ces plantes, mais des facteurs physiques jouent aussi un rôle (par exemple la couleur de la culture). Dans le cas de la mouche

uzi du ver à soie, des semio substances chimiques complexes sont libérées par les plantes hôtes du ver à soie, qui peuvent jouer un rôle mais il semble possible de penser que la sélection de l'habitat par la mouche uzi et la localisation de l'hôte, constituent un seul et même processus, entraîné par le mélange même de substances chimiques libérées soit par la plante hôte, soit par l'insecte hôte ou par les deux. Persoons et coll., (1993) ont aussi rapporté que le matériel foliaire ne joue pas un rôle significatif dans le comportement de localisation de l'hôte par la mouche uzi à moins qu'il n'agisse comme une source à partir de laquelle les larves accumulent certains composants qui servent d'intermédiaires pour la biosynthèse de Kairomone ou qui sont excrétés par les insectes sans aucun changement. Ils ont analysé plusieurs substances chimiques impliquées dans la sélection de l'hôte.

Certaines espèces de parasitoïdes détectent leurs hôtes par la perception de sons ou de vibrations produites par les larves hôtes cependant, les travaux récents ont réfuté l'hypothèse selon laquelle le son produit par l'hôte ou la vibration produite par le parasitoïde ou l'odeur sont des stimulations obligatoires pour trouver l'hôte (Richerson & Borden, 1972). Chez *Cardiochiles nigriceps* Viereck, un parasitoïde habituel de *Heliothis virescens* (F.) (Vinson, 1968) et chez *Microplitis croceipes* Viereck, un parasitoïde de l'espèce *Heliothis*, une sécrétion de la glande mandibulaire de la larve hôte entraîne un comportement de recherche. Sathe & Santhakumar (1988) ont réalisé des expériences pour étudier les facteurs responsables du comportement de parasitisme chez les femelles R & N de *Cotesia diurnii*. Ils ont rapporté que quand les bourgeons floraux et les gousses de la plante hôte sont abimés par les larves hôtes, la larve hôte intacte, la salive de la larve hôte, les excréments de la larve hôte et les extraits larvaires de l'hôte traités avec de l'éther sont exposés, les parasitoïdes femelles présentent des mouvements intentionnels de recherche et de perforation : l'odeur est donc principalement responsable de la recherche et est suivie par les mouvements intentionnels de perforation. La stimulation olfactive joue un rôle majeur par comparaison aux symptômes visuels pour attirer le parasitoïde femelle vers une larve hôte. Dans l'étude présente, les mêmes paramètres sont considérés et les facteurs responsables du déclenchement des comportements de parasitisme sont à la fois olfactifs et visuels.

Vinson (1976) a rapporté que les parasitoïdes répondent à la fois à des signaux de distance proche ou de contact et à des signaux chimiques volatiles à longue distance pendant la sélection de l'hôte. L'utilisation de semio substances chimiques pour manipuler les parasitoïdes semble être une technique au potentiel considérable que l'on pourrait utiliser dans les stratégies de lutte contre les parasites. La période et le mode d'application sont aussi probablement des facteurs critiques pour la réussite (Vinson, 1977).

Les larves mortes et les exuvies sont acceptables pour les femelles de *Apanteles* (*Cotesia*) *melanoscelus* Ratzeburg (Weseloh, 1974). Weseloh (1974) a aussi rapporté que les substances chimiques à l'intérieur ou sur le tégument de l'hôte sont responsables d'une moins bonne acceptation. Chez *Itopectis conquisitor* (Say) les femelles sont attirées par des abris artificiels de l'hôte tels que des tubes en papier et pondent dans l'hôte tout en bougeant (Arthur, 1966). De même, Spradberry (1970) a rapporté que les excréments de l'hôte jouent un rôle principal pour attirer le parasitoïde, *Rhyssa persuasoria* (L.) (Ichneumonidae).

Ngi-song et Overholt (1997) ont étudié la localisation de l'hôte et l'acceptation par *Cotesia flavipes* Cameron et *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera, Braconidae), les parasitoïdes de perceurs de la tige d'une graminée africaine et ont rapporté le rôle des excréments et d'autres signaux de l'hôte. Les femelles de *C. flavipes* et de *C. sesamiae* sont attirées dans un olfactomètre à tube T par des kairomones volatiles provenant des excréments produits par *Chilo partellus* (Swinhoe), *Chilo orichalcociliellus* Strand, *Sesamia calamistis* Hampson et *Busseola fusca* (Fuller) se nourrissant sur du maïs (*Zea mays* L.), du sorgho (*Sorghum bicolor* L.) et de l'herbe napier (*Pennisetum purpureum* Schumacher). Dans les tests à choix double, *C. flavipes* et *C. sesamiae* sont en général incapables de distinguer entre les volatiles des excréments produits par n'importe quelle des quatre espèces de perceurs de tige se nourrissant sur des épis de maïs. Quand les larves de *C. partellus* et de *S. calamistis* sont lavées dans de l'eau distillée, leur acceptation par les deux espèces de parasites diminue.

Sathe & Santhakumar (1992) ont étudié l'influence des facteurs dus à l'hôte et à la plante hôte sur le comportement de parasitisme d'*Apanteles prodeniae* Viereck, un parasitoïde de *Spodoptera litura* (Fab.) dans des conditions de laboratoire ($26 \pm 1^\circ \text{C}$, $50 \pm 3\%$ d'H. R.) l'odeur s'avère être le principal responsable de la recherche et est suivie par des mouvements intentionnels de perforation. Les stimulations olfactives jouent un rôle majeur par comparaison aux stimulations visuelles pour attirer le parasitoïde femelle vers les larves hôtes. Dans l'étude présente sur les interactions entre *C. glomeratus*, le *Bombyx mori* et le mûrier, des stimulations à la fois olfactives et visuelles sont responsables du déclenchement du parasitisme chez les parasitoïdes.

DETECTION AND SEPARATION OF BACILLARIOPHACEAE MEMBERS RESEMBLING PEBRINE SPORE, *NOSEMA BOMBYCIS* DURING MOTHER MOTH EXAMINATION

N. R. PRASAD, N. PRABHUSWAMY, K. S. KESHAWA REDDY & S. T. GOVINDARAJU

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

Non pebrine spores resembling the spores of Nosema bombycis by their shape and size were reported from Bilidevalaya grainage, Karnataka. These spore like bodies were creating confusion and interfere in the detection leading to burn the disease free layings of silkworm. The infectivity, transovarian transmission, route of entry into the moth were studied. The spore like bodies were not infective and were not transovarially transmitted in the silkworm. They were identified as members of bacillariophaceae. These diatoms were reaching the mother moth through the water used for grainage operations. The diatoms were occurring in varied size and shape including the size and shape of pebrine spore. A simple method to detect their presence in the water and methods to separate them from water was described in this paper.

Keywords: Pebrine spore, *Nosema bombycis*, silkworm, *Bombyx mori*, artifacts, detection, Bacillariophaceae member, diatom.

INTRODUCTION

Pebrine disease of silkworm by *Nosema bombycis* spores spread horizontally by secondary contamination and vertically by transovarian transmission from generation to generation through eggs (Pasteur, 1870). Heavy mortality of silkworm due to this disease resulting in crop loss was recorded in sericulture (Lefroy, 1916; Tatsuki, 1971; Barman, 1990; Samson *et al.*, 1991 and Subbarao *et al.*, 1991). The only method to control the disease was by strict mother moth examination, destruction of infected moth and the crop and thorough disinfection (Ishihara, 1982).

Supply of disease free layings of silkworm to the silkworm rearers is an important factor deciding quality and yield of cocoons / silk. Hence precise identification of pebrine spore in mother moth examination is a crucial step in controlling primary contamination in addition to supply of disease free layings. Any error causing wrong diagnosis during mother moth examination leads to transmission of spores to the next generation and cause crop failure and difficulty in preparation of pebrine free layings.

Recently many spore like bodies resembling pebrine spore appeared during mother moth examination in Bilidevalaya grainage (Karnataka) and lead to a wrong diagnosis of pebrine disease (Prasad *et al.*, 1999). They interfered in the detection of pebrine spores and have created many problems and confusions by resembling pebrine spores causing the wrong diagnosis leading to burn the disease free layings. Visibility of the pebrine spore in the homogenate of the mother moth was affected by the interference of debris of cells, tissue, fat globules and scales (Geetha bai *et al.*, 1994). Fujiwara (1980) reported three microsporidians of *Nosema* spp. of varied size and shape from silkworm. Hezard and Weiser (1968) reported difficulties in accurate identification of microsporidians due to dimorphism exhibited. In the light of above findings this field problem was taken and the spore

like bodies were isolated and studied in detail to eliminate any doubt of its true nature in the grainage operation. Though this problem was experienced for the first time in Bilidevalaya (Mysore seed area in Karnataka) recently many grainages succumbed to this problem. In this paper the true nature of these spore like bodies, their infectivity in silkworm, transovarian transmission, route of entry and the source of these spores, as well as an easy method of detection and separation were described.

MATERIALS AND METHODS

Pebrine like bodies in the homogenate of the mother moth, reported for the first time in Bilidevalaya (Karnataka) were collected along with the eggs laid by such moths. The homogenate was purified by filtering through chisel cloth and low speed centrifugation (2000 rpm). The sediment was used for morphometry and photomicrography. The purified spore like bodies were also used for experimental infection and transovarian studies in silkworm.

The eggs laid by moth revealed pebrine like bodies in the grainage were brushed and larvae were reared by feeding them with mulberry (Krishnaswamy, 1978). The larvae were tested randomly in each instar for the presence of spores to confirm their transovarian transmission in the immediate generation. The worms were crushed and the homogenate was used for microscopic observations.

Experimental infection:

Purified spore like bodies were fed to silkworm (three batches of 50 worms each) after II molt and IVth molt per orally through mulberry leaf. A batch of silkworms infected with *Nosema bombycis* was used as infected control (Prasad *et al.*, 2000). The silkworms along with control batches were reared till they spun cocoons. Five worms from each batch were randomly tested for the presence of multiplication of spore in each instar. The worms which successfully spun the cocoons were allowed to pupate and the emerged moths from these pupae were allowed to mate and lay eggs. The moths were tested for spore like bodies after eggs were laid.

Mother moth examination:

The homogenate of moths received from the grainage (revealing the presence of pebrine like bodies) and the moths emerged from the experimental infection by per os feeding the spore like bodies through mulberry leaf were tested for the presence of spores to confirm infection and transovarian transmission. The moths were tested individually. Only abdomen of the moth leaving the rest of the body was taken in to moth crushing set and few drops of 2 percent potassium hydroxide and few drops of 10 percent K_2CO_3 solutions were added and crushed thoroughly. A small drop of the homogenate was taken on to a clean slide, mounted using a cover slip and observed under the microscope.

Examination of water sample used for grainage operation:

Sample of water used for grainage operation at Bilidevalaya suspected for doubt of entry of spore like bodies was collected and tested. Water sample (10 to 15 ml) was taken in centrifuge tubes and centrifuged at 2000 – 3000 rpm. The sediment was collected and observed under the microscope. In addition to this method, few drops of 10 percent K_2CO_3 solution was added to the test sample of the water taken in a beaker and left for 10-15 min. The same set of experiment was done using distilled water.

A simple method to detect the spore like bodies in the water:

First method:

One litre of water sample was collected in a beaker and ten ml of ten percent potassium carbonate solution was added. The solution was shaken well and allowed for 35 to 45 min. After 30-35 min. the water looked turbid indicating the presence of spore like bodies. To confirm further, the supernatant was decanted from the beaker leaving the sediment. A drop of the sediment from the beaker was taken

on to a clean micro slide, mounted using a cover slip and observed under the microscope. The spore like bodies resembling pebrine spores were seen as in the Plate 1. The spore like bodies were in different size and shape. When pebrine spore was observed amidst such spore like bodies it was difficult to differentiate the pebrine spore.

Second method:

Hundred ml of water sample was collected into a beaker and ten ml of ten percent K_2CO_3 solution was added and the resulting solution was shaken well. This solution was collected into the centrifuge tube after 5-10 min, centrifuged at 3000 rpm for 20 min. Then the sediment or pellet was observed under the microscope and the spore like bodies were seen as in plate 2.

Once the water sample revealed such spore like bodies in the water then such water should be treated to get rid of such spore like bodies.

Treatment of water to remove the spore like bodies:

First method:

The water sample revealing the pebrine like spores was passed into the charged beds of deionised plant. The water came out of the plant was tested for the presence of spore like bodies as above and observed under the microscope, the water coming out of the plant was free from such spore like bodies.

Second method:

The water sample containing spore like bodies was distilled using glass distillation unit. The distilled water was free from such spore like bodies. But the distillation process was slow compared to deionisation.

Note:

Boiling the water did not alter the shape and size of these spore like bodies, hence boiling will not solve the problem. Filtering the water by passing through the candles of water filters did not separate the spore like bodies present in the water. Hence water filters cannot be used for this purpose.

RESULTS AND DISCUSSION

The objective of this study was to identify the spore like bodies appearing in the homogenate of moth, resembling pebrine spore and interfering in pebrine detection in the grainage of Bilidevalaya, Karnataka. This lead to burn the disease free layings as pebrinised. Hence the sample was collected, purified and tested for their infectivity and transovarial transmission in silkworm. When the spore like bodies were fed orally to silkworm and the multiplication observed in different instars of larvae and moth, they were not seen in any stage of silkworm indicating their inability to multiply. Whereas in infected control batch (by pebrine spores) larvae of all the instars and moths revealed the spores. Hence, the spore like bodies were not pebrine. The moths emerged from experimental infection by spore like bodies and the moths obtained from the layings of Bilidevalaya (layings of moths revealed pebrine like bodies) were examined for the presence of spore like bodies. In both the cases spore like bodies were not seen. Hence the spore like bodies were not parasites multiplying in silkworm and are not transovarially transmitted. Hence they were not pebrine spores.

Results of microscopic observation revealed that the spore like bodies were similar to pebrine spores in size and shape in 250 – 400 × magnification. When photomicrographs were taken at higher magnification of 1500 ×, the spore like bodies looked slightly different showing narrow tip (Plate 1). Sometimes bivalent, tetravalent were also seen (Plate 2). The shape varies from oval to elongated oval and size varied enormously (Plate 2). Fujiwara (1980) reported three types of microsporidians (*Nosema* spp.) from silkworm *Bombyx mori* which are from oval to elongated oval shape. Similarly Sato *et al.*, (1981) also reported several types of pebrine spores from silkworm.

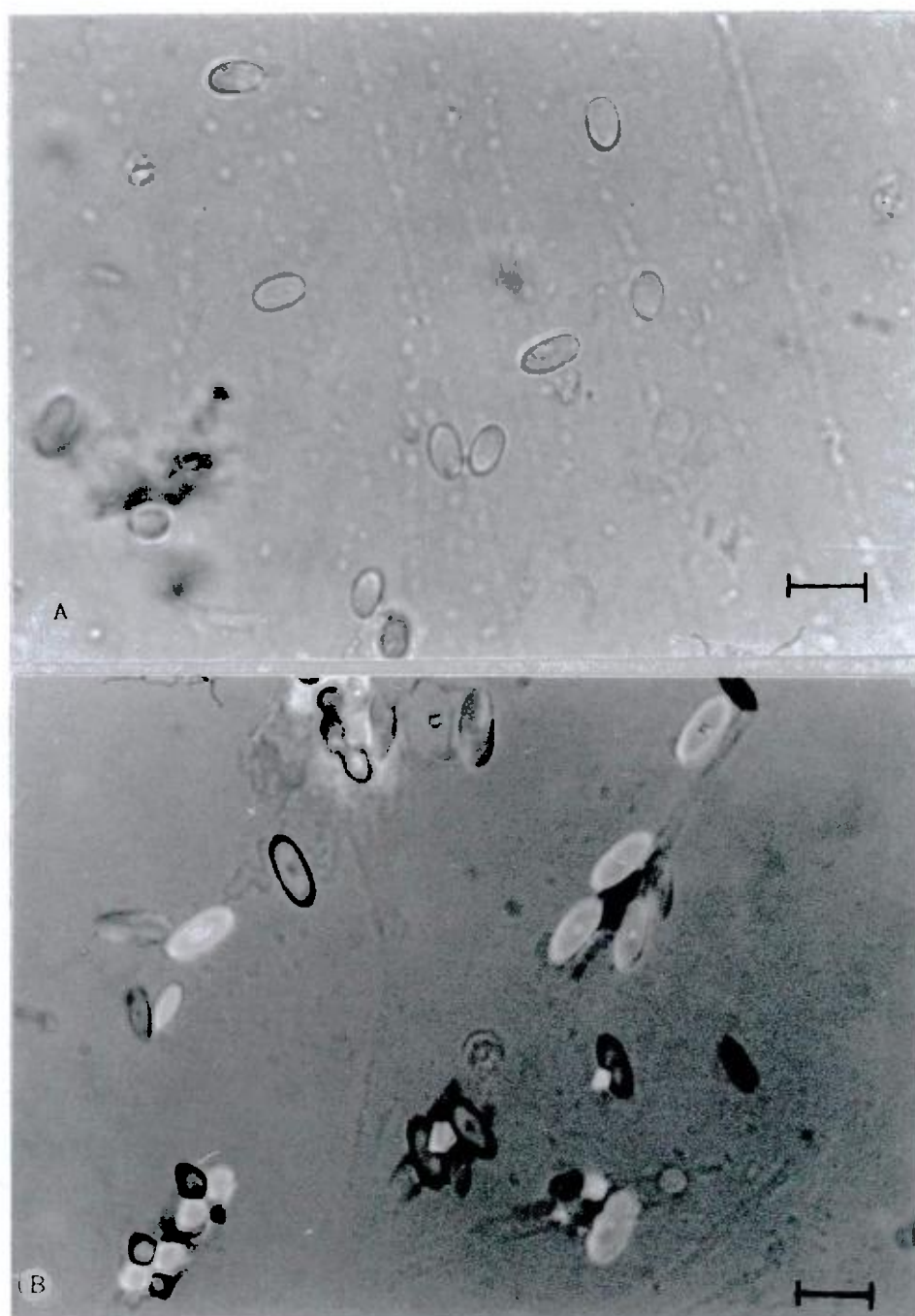


Plate 1

Plate 1.

a) Spores of *Nosema bombycis*, under 1500 × showing oval and elongated shape under phase contrast photomicrograph. Scale bar represents 50 µm.

b) Diatoms belong to bacillariophaceae showing oval and elongated oval shape under 1500 × in addition, bivalent and tetravalent structures of varied size are also seen under phase contrast photo-micrograph. Scale bar represents 50 µm.

Planche 1.

a) Spores de *Nosema bombycis*, sous un grossissement de 1500 présentant une forme ovale et allongée en contraste de phase. La barre d'échelle représente 50µm.

b) Les diatomées appartiennent aux bacillariophaceae et présentent une forme ovale et allongée sous un grossissement de 1500. De plus, on voit aussi des structures bivalentes et tétravalentes de tailles variées dans la photo-micrographie en contraste de phase. La barre d'échelle représente 50µm.

Hence based on the size and shape, it is difficult to differentiate the spore like bodies from that of pebrine spores. Since they are not parasites and are not pebrine, they were suspected as free living algae. Bongale and Bharathi (1980) and Bongale (1985) reported diatoms from soil and water of Davanagere and Raichur (Karnataka). The size, shape and structure of some of the diatoms reported by them were resembling to the present pebrine like bodies obtained from the homogenate sample of Bilidevalaya. Based on these studies they were identified as diatoms belonging to bacillariophaceae. The possible route of entry of these diatoms into the homogenate was suspected to be the water used in the grainage operation. Hence water sample from Bilidevalaya was analysed for the presence of diatoms. It was found that spore like diatoms were seen sparingly when the water sample was centrifuged many times at low speed. The comparison of spore like bodies (diatoms) from water with that of homogenate received from Bilidevalaya was made and found both were similar in structure and shape. Since the diatoms are free living autotrophs they were not able to multiply in the gut of silkworm when fed orally. It was concluded from the above observations that the spore like bodies seen in the homogenate of Bilidevalaya were diatoms and they were reaching the homogenate through the water used for grainage operations.

Later it was found that diatoms were also seen in other parts and creating the same confusion during pebrine detection. The spore like diatoms cannot be differentiated by negative staining method but they can be differentiated from that of pebrine spore by positive staining method as described by Prasad *et al.*, (2000). The entry of diatoms in the mother moth examination could be checked by detecting them in the water by simple method (as described in methodology) before using water for grainage operations. After detecting them in the water, they could be removed by passing the water through charged beds of deionised plants as described in the methodology. The water coming out of the deionised plant was free from these diatoms which were resembling pebrine spores.



Plate 2.

Diatoms of different species having varied size and shape. Some of them resembling pebrine spore *Nosema bombycis* under phase contrast photomicrograph. Scale bar represents 50 μm .

Planche 2.

Diatomées de différentes espèces ayant une taille et forme variées. Certaines ressemblent à des spores de pébrine *Nosema bombycis* en contraste de phase. La barre d'échelle représente 50 μm .

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express deep sense of gratitude to Dr U. D. Bongale, Director, KSSRDI, Thalagattapura, Bangalore -56 for helping in identification of diatoms and Dr S. B. Dandin, Dr R. Raghuraman and Dr C. S. Patil for their encouragement to do this work.

REFERENCES

- BARMAN A. C. (1990) Outbreak of silkworm *Bombyx mori* L. disease under the influence of different commercial seasons of Bangladesh. Bull. Seric. Res., 1: 41-46.
- BONGALE U. D. & BHARATHI S. G. (1980) Fresh water algae of Davanagere and Raichur of Karnataka state, India, Bombay Nat. Hist. Soc., Vol 77, 6-11.
- BONGALE U. D. (1985) Systematic account of diatoms from the cultivated soils of Karnataka State, India, Phycos., 24: 18-26.
- FUJIWARA T. (1980) Three microsporidia (*Nosema* sp.) from the silkworm *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci., 49(3), 329-336.
- GEETHA BAI M., PATIL C. S. & KASTURABAI A. R. (1994) A new method for easy detection of pebrine spore. Sericologia, 25(3), 297-300.
- HEZARD E. I. & WEISER J. (1968) J. Protozool. 15, 817-823.
- ISHIHARA R. (1982) Report on the technical co-operation to the World Bank Aided Sericulture Projects in Karnataka, India, pp 100-102.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing, Bulletin No. 2, Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore p. 23.
- LEFROY H. M. (1916) Report on an enquiry into the silk Industry in India, Govt. of India publication, Calcutta.
- PASTEUR L. (1870) Etudes sur la maladie des vers à soie, cité in Pebrine disease of silkworms, a technical report, (Ed., Tatsuke K. 1971) Overseas Technical Co-operation Agency, Tokyo, Japan.
- PRASAD N. R., PRABHUSWAMY N., KESHAWA REDDY K. S. & GOVINDARAJU S. T. (1999) Detection of Pebrine like contaminants during mother moth examination, Indian Silk, Vol. 38(2), 15-17.
- PRASAD N. R., GOVINDARAJU S. T. & KESHAVA REDDY K. S. (2000) Positive staining method for detection of pebrine spore *Nosema bombycis* in silkworm *Bombyx mori* L., Sericologia, 40(4), 1-6.
- SAMSON M. V., BAIG M., SHARMA S. D., BALAVENKATASUBBAIAH M., SASIDHARAN T. O. & JOLLY M. S. (1991) Survey on the relative incident of silkworm diseases in Karnataka, India, Indian J. Seric., 29(2): 248-254.
- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H. & FUJIWARA T. (1981) Serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from *Bombyx mori* L. by an indirect fluorescent antibody technique. J. Sericult. Sci. Japan, 50, 180-184.
- SUBBARAO G., CHANDRA A. K. & BHATTACHARYA J. (1991) Incidence of crop loss from adopted rearing level of West Bengal due to silkworm diseases, Indian J. Seric. Vol. 30(2): 167.
- TATSUKE K. (1971) Ed. Pebrine disease in silkworm, a technical report; Overseas Technical Co-operation Agency, Tokyo, Japan.

DETECTION ET SEPARATION DE BACILLARIOPHACEAE RESSEMBLANT A DES SPORES DE PEBRINE, *NOSEMA* *BOMBYCIS* PENDANT L'EXAMEN DU PAPILLON MERE

N. R. PRASAD, N. PRABHUSWAMY, K. S. KESHAWA REDDY & S. T. GOVINDARAJU

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

*On a observé des spores non pébrine ressemblant aux spores de *Nosema bombycis* en raison de leur forme et de leur taille au centre de grainage de Bilidevalaya dans le Karnataka. Ces corps ressemblant à des spores entraînent des confusions et interfèrent dans la détection, ce qui fait que des pontes saines du ver à soie sont brûlées. Nous avons étudié l'infectiosité, la transmission transovarienne, le chemin d'entrée dans le papillon. Les corps ressemblant à des spores ne sont pas infectieux et ne sont pas transmis de manière transovarienne. Ils sont identifiés comme des membres de la famille des bacillariophaceae. Ces diatomées atteignent le papillon mère par l'eau utilisée pendant les opérations de grainage. Les diatomées ont des tailles et des formes variées, et peuvent avoir la taille et la forme d'une spore pébrine. Nous décrivons dans cet article une méthode simple de détection de leur présence dans l'eau et des méthodes pour les éliminer de l'eau.*

INTRODUCTION

La maladie de la pébrine du ver à soie par les spores de *Nosema bombycis* se répand de manière horizontale par contamination secondaire et de manière verticale par transmission transovarienne de génération en génération par les œufs (Pasteur, 1870). On a enregistré une mortalité élevée du ver à soie à cause de cette maladie, qui entraîne des pertes de récoltes (Lefroy, 1916 ; Tatsuki, 1971 ; Barman, 1990 ; Samson et coll., 1991 et Subbarao et coll., 1991) en sériciculture. La seule méthode pour lutter contre la maladie consiste à examiner le papillon mère de manière stricte, à détruire les papillons infestés et les graines et à désinfecter soigneusement (Ishihara, 1982).

La fourniture de pontes saines du ver à soie aux éleveurs de vers à soie est un facteur décisif pour la qualité et le rendement en cocons / soie. L'identification précise des spores de pébrine pendant l'examen des papillons mère est donc une étape cruciale pour contrôler la contamination primaire tout comme la fourniture de pontes saines. N'importe quelle erreur de diagnostic pendant l'examen des papillons mère entraîne la transmission des spores à la génération suivante et fait échouer les récoltes et rend la préparation de pontes saines difficile.

Récemment de nombreux corps comme des spores ressemblant à des spores de pébrine sont apparus pendant l'examen du papillon mère dans le centre de grainage de Bilidevalaya (Karnataka) et ont entraîné un mauvais diagnostic de la maladie de la pébrine (Prasad et coll., 1999). Ils interfèrent dans la détection des spores de pébrine et ont créé de nombreux problèmes et confusions, et entraîné un mauvais diagnostic qui fait que des pontes saines sont brûlées. La visibilité de la spore de pébrine dans l'homogénat du papillon mère est affectée par l'interférence de débris de cellules, de tissus, de globules graisseux et d'écailles (Geetha bai et coll., 1994). Fujiwara (1980) a signalé trois microsporidiens de *Nosema* spp. de taille et de forme variées chez le ver à soie. Hezard et Weiser (1968) ont signalé des difficultés par rapport à l'identification précise des microsporidiens en raison du dimorphisme. Au vue de ces observations, nous avons voulu faire face à ce problème sur le terrain

et les corps ressemblant à des spores ont été isolés et étudiés en détail pour éliminer tout doute par rapport à leur nature véritable pendant l'opération de grainage. Bien que ce problème ait été rencontré pour la première fois à Bilidevalaya (la zone de grainage de Mysore dans le Karnataka) de nombreux centres de grainage ont dû faire face à ce problème récemment. Dans cet article, nous décrivons la véritable nature de ces corps ressemblant à des spores, leur infectiosité par rapport au ver à soie, la transmission transovarienne, le chemin d'entrée et la source de ces spores ainsi qu'une méthode facile de détection et de séparation.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons recueilli les corpuscules ressemblant à de la pébrine dans l'homogénat du papillon femelle, signalés pour la première fois à Bilidevalaya (Karnataka) et les œufs pondus par ces papillons. L'homogénat est purifié en le filtrant au travers d'un tissu et avec une centrifugation à vitesse lente (2000 tpm). Le sédiment est utilisé pour la morphométrie et la photomicrographie. Les corpuscules ressemblant à des spores purifiés sont aussi utilisés pour l'infection expérimentale et les études transovariennes chez le ver à soie.

Les œufs pondus par le papillon qui présentent des corps comme de la pébrine pendant le grainage sont levés et les larves sont élevées en les nourrissant avec du mûrier (Kirshnaswamy, 1978). Les larves sont testées au hasard à chaque âge pour détecter la présence de spores pour confirmer la transmission transovarienne à la génération immédiate. Les vers sont écrasés et l'homogénat est utilisé pour les observations microscopiques.

Infestation expérimentale :

Les corpuscules purifiés sont donnés aux vers à soie oralement avec les feuilles de mûrier dans leur alimentation (trois lots de 50 vers chacun) après la 2^{ème} mue et la 4^{ème} mue. Un lot de vers à soie infesté par *Nosema bombycis* est utilisé comme témoin infesté (Prasad et coll., 2000). Les vers à soie et les lots témoins sont élevés jusqu'à ce qu'ils filent leurs cocons. Cinq vers de chaque lot sont testés au hasard pour évaluer la multiplication des spores à chaque âge. On laisse les vers qui filent leurs cocons avec succès se transformer en nymphes et on laisse les papillons émerger de ces nymphes s'accoupler et pondre des œufs. On teste les papillons par rapport à la présence de corpuscules après qu'ils aient pondu leurs œufs.

Examen du papillon mère :

L'homogénat de papillons reçu du centre de grainage (révélant la présence de corpuscules) et les papillons ayant émergé de l'infestation expérimentale avec les feuilles de mûrier sont testés par rapport à la présence de spores pour confirmer l'infestation et la transmission transovarienne. Les papillons sont examinés individuellement. Seul l'abdomen du papillon (on laisse le reste du corps) est utilisé lorsqu'on écrase les papillons et on ajoute quelques gouttes d'hydroxyde de potassium à 2 % et quelques gouttes de solutions K₂CO₃ à 10 pour-cent et on l'écrase vigoureusement. Une petite goutte de l'homogénat est mise sur une lame propre et montée en utilisant une lamelle couvre objet et observée sous un microscope.

Examen de l'échantillon d'eau utilisée pendant l'opération de grainage :

Un échantillon d'eau utilisée pour l'opération de grainage à Bilidevalaya soupçonnée d'être responsable de l'entrée des corpuscules ressemblant à des spores de pébrine est recueilli et testé. L'échantillon d'eau (10 à 15 ml) est mis dans des tubes à centrifugeuse et centrifugé à 2000 – 3000 tpm. Le sédiment est recueilli et observé sous le microscope. On ajoute quelques gouttes de solution K₂CO₃ à 10 % à l'échantillon d'eau testé mis dans un récipient et on le laisse pendant 10 à 15 minutes. On réalise les mêmes expériences en utilisant de l'eau distillée.

Méthode simple de détection des corpuscules ressemblant à des spores dans l'eau :

Première méthode :

Un litre d'échantillon d'eau est recueilli dans un récipient et dix ml de solution de carbonate de potassium à dix pour-cent sont ajoutés. La solution est bien agitée et on la laisse reposer pendant 35 à 45 min. Après 30-35 min l'eau devient trouble, ce qui indique la présence de corpuscules. Pour confirmer cela, le surnageant est décanté du récipient, en laissant le sédiment. On prend une goutte de sédiment du récipient et on la place sur une lame propre, on la monte en utilisant une lamelle couvre objet et on l'observe sous un microscope. On peut voir les corpuscules ressemblant à des spores de pébrine sur la Planche 1. Les corpuscules ont des tailles et des formes différentes. Quand on observe la spore de pébrine parmi de tels corpuscules, il est difficile de différencier la spore de pébrine.

Deuxième méthode :

Cent ml d'échantillon d'eau sont recueillis dans un récipient et dix ml de solution de K_2CO_3 à dix pour-cent sont ajoutés et la solution qui en résulte est bien agitée. Cette solution est recueillie dans un tube de centrifugeuse après 5 à 10 minutes, centrifugée à 3000 tpm pendant 20 minutes. Puis le sédiment ou le eulot est observé sous le microscope et on peut voir les corpuscules, comme sur la planche 2.

Quand l'échantillon d'eau révèle de tels corpuscules dans l'eau, il faut traiter l'eau pour s'en débarrasser.

Traitement de l'eau pour enlever les corpuscules :

Première méthode :

L'échantillon contenant des corpuscules comme des spores est passé par des bassins d'une unité de déionisation. L'eau qui sort de l'unité est testée par rapport à la présence de corpuscules et observée sous le microscope. L'eau qui sort de l'unité ne contient pas de tels corps.

Deuxième méthode :

L'échantillon d'eau révélant des corpuscules est distillé en utilisant une unité de distillation en verre. L'eau distillée ne contient pas de tels corpuscules. Mais le processus de distillation est lent comparé à la déionisation.

Note :

Quand on fait bouillir l'eau, cela n'altère pas la forme et la taille de ces corpuscules, l'ébullition ne résout donc pas le problème. Le filtrage de l'eau ne sépare pas ces corpuscules dans l'eau. On ne peut donc pas utiliser de filtres à eau dans ce but.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de cette étude est d'identifier les corpuscules ressemblant à des spores de pébrine apparaissant dans l'homogénat du papillon, et interférant dans la détection de la pébrine au Centre de grainage de Bilidevalaya, dans le Karnataka. En effet des pontes saines sont brûlées à cause de cela car elles apparaissent pébrinisées. On recueille donc l'échantillon, on le purifie et on le teste par rapport à son infectiosité et sa transmission transovarienne chez le ver à soie. Quand les corpuscules sont donnés oralement au ver à soie et qu'on observe la multiplication à différents âges des larves et du papillon, elle n'apparaît à aucun stade chez le ver à soie, ce qui indique leur inaptitude à se multiplier. Tandis que chez le lot témoin infesté par les spores de pébrine les larves de tous les âges et les papillons révèlent des spores. Donc les corpuscules ne sont pas de la pébrine. Les papillons ayant émergé de l'infestation expérimentale par les corpuscules et les papillons obtenus à partir des pontes de Bilidevalaya (les pontes des papillons révèlent des corpuscules) sont examinés par rapport à la présence de corpuscules. Dans les deux cas, on ne voit pas de corpuscules. Ainsi, les corpuscules ne

sont pas des parasites qui se multiplient chez le ver à soie et sont transmis de manière transovarienne. Ils ne sont donc pas des spores de pébrine.

Les résultats de l'observation microscopique révèlent que les corpuscules sont similaires aux spores de pébrine pour la taille et la forme avec un grossissement de 250 à 400. Quand les microphotographies sont prises avec un grossissement plus important de 1500, les corpuscules sont légèrement différents et présentent un bout étroit (Planche 1). On voit aussi des bivalents, des tétravalents (Planche 2). La forme va d'ovale à allongée et la taille varie énormément (Planche 2). Fujiwara (1980) a rapporté trois types de microsporidiens (*Nosema* spp.) chez le ver à soie *Bombyx mori* qui ont une forme ovale à allongée. De même Sato et coll., (1981) ont aussi rapporté plusieurs types de spores de pébrine chez le ver à soie.

Il est donc difficile de différencier les corps des spores de pébrine en fonction de leur taille et de leur forme. Comme ce ne sont pas des parasites et que ce n'est pas de la pébrine, on soupçonne qu'ils sont des algues vivant librement. Bongale et Bharathi (1980) et Bongale (1985) ont rapporté des diatomées du sol et de l'eau à Davanagere et Raichur (Karnataka). La taille, la forme et la structure de ces diatomées qu'ils ont signalées ressemblent aux présents corpuscules obtenus à partir de l'échantillon de l'homogénat de Bilidevalaya. D'après ces études, ils ont été identifiés comme des diatomées appartenant aux bacillariophacées. On soupçonne que la voie d'entrée de ces diatomées dans l'homogénat est l'eau utilisée pendant l'opération de grainage. L'échantillon d'eau de Bilidevalaya a donc été analysé par rapport à la présence de diatomées. On a trouvé qu'on voit modérément les diatomées quand l'échantillon d'eau est centrifugé plusieurs fois à une vitesse lente. En comparant les corpuscules (diatomées) provenant de l'eau avec ceux de l'homogénat reçu de Bilidevalaya nous avons trouvé qu'ils sont tous les deux de structure et de forme similaires. Puisque les diatomées sont des autotrophes vivant librement, elles n'ont pas la possibilité de se multiplier dans l'intestin du ver à soie quand on les donne oralement. On conclut d'après les observations ci-dessus que les corpuscules ressemblant à des spores de pébrine vus dans l'homogénat de Bilidevalaya sont des diatomées et qu'ils atteignent l'homogénat avec l'eau utilisée pendant les opérations de grainage.

Plus tard, on observe des diatomées à d'autres endroits, ce qui crée la même confusion pendant la détection de la pébrine. Les diatomées ne peuvent pas être différenciées avec la méthode de coloration négative mais elles peuvent être différenciées des spores de pébrine avec la méthode de coloration positive décrite par Prasad et coll., (2000). On peut contrôler l'entrée des diatomées pendant l'examen du papillon mère en les détectant dans l'eau avec une méthode simple (comme celle décrite dans la méthodologie) avant d'utiliser l'eau pour les opérations de grainage. Après les avoir détectées dans l'eau, on peut les enlever en faisant passer l'eau par les bassins d'unités de déionisation comme on le décrit dans la méthodologie. L'eau qui sort de l'unité de déionisation ne contient pas de diatomées qui ressemblent aux spores de pébrine.

EFFICACY OF IODOPHOR ON GROWTH AND PRODUCTIVITY AND OCCURRENCE OF DISEASES IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. NB₄D₂ RACE

P. VENKATARAMANA¹, N. SURYANARAYANA² & R. K. DATTA³

1. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad (A. P.)—501 101, India.

2. Regional Sericultural Research Station, Anantapur (A. P.), 515 001, India.

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

*In the present investigation a bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) NB₄D₂ race was used to understand the efficacy of Iodophor (an alkyl phenoxy polyglycol ether complexing available 1.6% iodine (W/V) on growth and productivity and occurrence of grasserie and flacherie diseases in three seasons i.e., summer, rainy and winter in tropical conditions after oral administration through mulberry leaves. It was recorded that the larval and cocoon characters were significantly improved in lower doses of iodophor concentrations (1.0 – 1.5%) compared to the other concentrations and control in all seasons. Incidence of grasserie and flacherie diseases were also significantly suppressed in lower doses (1.0 and 1.5%) in all three seasons. However, due to higher dose of iodophor concentration (2%) the larval and cocoon characters were significantly affected and also induced the incidence of grasserie and flacherie diseases in all three seasons. These findings suggest that the lower doses of iodophor concentrations (1.0 and 1.5%) significantly improved the larval and cocoon characters and suppressed the incidence of diseases in all three seasons, whereas the higher dose of iodophor concentration (2%) significantly affected the larval and cocoon characters and also induced the grasserie and flacherie diseases.*

Keywords: *Bombyx mori*, iodophor, larval duration, cocoon characters, flacherie, grasserie.

IODOPHOR

Iodophor is a loose complex of elemental iodine (an alkyl phenoxy polyglycol ether complexing available 1.6% iodine (w/v) of M/s Asian Catalyst and Chemicals, Mumbai) with a broad range of microbicidal action on all the important health related micro organisms such as, enteric bacteria and enteric viruses and protozoan cysts (Hoehn, 1876). Mycobacteria and the spores of bacilli and clostridia can be killed by iodine (Wallhausser, 1978). Furthermore, iodine also exhibits a fungicidal and trichomonacidal activity (Knolle, 1975). In addition to that, the iodine is present in thyroxine, which is being produced in the thyroid gland of invertebrates and vertebrates. The evolution of thyroxine function has been suggested long back on the basis of wide phyletic distribution of the ability of the organisms to form iodoproteins, iodotyrosine and iodothyronine compounds having adaptive or metabolic value (Gorbaman, 1959). But, thyroidless invertebrates, also showing clear responsiveness to exogenous thyroid hormone like vertebrates, have been considered as good specimens for exploring the multiplicity of the thyroid hormone action. Minerals are not synthesised within the insects, although they are essential elements and effect various metabolic processes (House, 1967). Consequently new dimensions of comparative endocrinology are gradually emerging. Since, the silkworm as a whole is like the *prima donna* of the insect kingdom for the biologists for the study of growth, differentiation, reproduction etc. this animal has created interest as an excellent material

for the comparative physiologists to study with the vertebrate hormones, vitamins, minerals etc. on the various physiological processes. It is reported in literature that feeding of thyroxine and vitamin B through mulberry leaves (Majumdar and Medda, 1975; Medda *et al.*, 1980; Chaudhuri *et al.*, 1990) influenced the growth, metamorphosis, silk production, silk gland metabolism, egg production and economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. race Nistari. Majumdar and Medda (1975) reported that feeding of thyroxine with mulberry leaves has shortened the life span of *B. mori* L. Potassium iodide fed to the silkworm with mulberry leaves improved the larval growth and economic characters of silkworm, *B. mori* L. (Chakraborty and Medda, 1978; Majumdar, 1982). In eri silkworm, *Samia cynthia ricini* the dietary supplementation of potassium iodide improved the larval growth and cocoon characters (Govindan *et al.*, 1989). Thus considering the importance of iodine in silkworm nutrition, it is felt to conduct a study on the effect of iodophore on the larval growth, cocoon characters and occurrence of diseases in bivoltine pure silkworm, *Bombyx mori* L. (NB4D2) in three different seasons i.e. summer, rainy and winter under tropical climatic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bivoltine hybrid pure race of *Bombyx mori* L. (NB4D2) was used in this investigation. The experimental larvae after II moult were counted and five replications of 500 larvae each were maintained. Five different concentrations of Iodophor (1.6% available iodine) solution i.e. 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% were prepared in distilled water. Mulberry leaves were soaked in these treatments for 10 minutes and shade dried for 30 minutes before feeding. The treated leaves were fed to silkworm larvae once on the first day of every instar and also once on fifth day of final instar and the subsequent feeds were with untreated leaves. One control fed with untreated leaves was maintained for comparison with the treated batches. The experiment was conducted during three different seasons i.e., summer, rainy and winter in tropical climatic conditions. The data with respect to larval growth, economic characters of cocoons and the per cent incidence of flacherie and grasserie diseases were recorded and subjected to the statistical analysis (Duncan, 1951). The percent incidence of diseases were determined by using the formula as:

$$\% \text{ incidence of disease} = \frac{\text{No. of diseased larvae}}{\text{Total no. of sample larvae collected}} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

Larval duration, larval weight and effective rate of rearing (ERR%)

The resulting larval duration, larval weight and ERR after treatment with different concentrations of iodophor in three different seasons are presented in Table I. In all three seasons except 2% iodophor treatment the other treatments of iodophor (0.1, 0.5, 1.0 and 1.5%) reduced the larval duration and enhanced the larval weight and ERR compared to their respective controls. In contrary, the high concentration of iodophor (2%) reduced the larval weight and ERR and prolonged the larval duration in all three seasons. The more reduction in the larval span of life was 42 hrs (treated: 684 hrs; control: 726 hrs) in winter followed by 13 hrs (treated: 637 hrs; control 650 hrs) in rainy and 23 hrs (treated: 604 hrs; control 627 hrs) in summer season due to the effect of 1% iodophor treatments compared to the respective controls. Furthermore, among the treatments 1% iodophor induced the maximum larval weight by 35.74% (treated: 55.45 g; control 40.85 g) in rainy season followed by 18.77% (treated: 41.75 g, control 35.15 g) in winter and 13.22% (treated: 43.25 g; control : 38.20 g) in summer. For 1% treatment the tune of increase in survival rate was 83.44% (treated:92.18%; control 50.25%) in summer followed by 38.78% (treated 95.75%, control: 69.0%) in rainy and 24.83% (treated: 94.25%; control 75.5%) in winter season. However, the survival rate of larvae, larval duration and larval weight were affected by 2% iodophor treatment in all seasons compared to their respective controls.

Table 1. Effect of iodophor on larval growth of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* in 3 different seasons (mean of 5 replications).*Tableau 1. Effet du iodophore sur la croissance larvaire du ver à soie bivoltin, Bombyx mori pendant 3 saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).*

Parameters / Treatments		Season					
		Summer	% difference	Rainy	% difference	Winter	% difference
<i>Paramètres / Traitements</i>		<i>Saison</i>					
		<i>Été</i>	<i>Différence en %</i>	<i>Saison des pluies</i>	<i>Différence en %</i>	<i>Hiver</i>	<i>Différence en %</i>
Weight of 10 larvae (g) / Poids de 10 larves (g)							
Iodophor	0.1%	39.50**	3.40	45.20**	10.65	37.45**	6.54
	0.5%	42.50**	11.26	50.25**	23.00	40.28**	14.59
	1.0%	43.25**	13.22	55.45**	35.74	41.75**	18.76
	1.5%	40.75**	98.04	50.39**	23.35	39.89**	13.48
	2.0%	36.75**	-3.79	38.85**	-4.89	34.15	-2.84
Control / Témoin		38.20		40.85		35.15	
S. E.		0.552		0.034		0.043	
C D at 5%		1.627		0.101		0.123	
CD at 1%		2.219		0.137		0.175	
Larval period (hrs) / Durée larvaire (hrs)							
Iodophor	0.1%	624.00**	-0.48	648.00	-0.31	720.00**	-0.83
	0.5%	626.00	-0.16	647.00**	-0.46	695.00**	-4.27
	1.0%	604.00	-3.67	637.00**	-2.00	684.00**	-5.79
	1.5%	618.00	-1.44	648.00**	-0.31	701.00**	-3.44
	2.0%	677.00**	7.97	706.00**	8.61	781.00**	7.57
Control / Témoin		627.00		650.00		726.00	
S. E.		6.728		0.580		0.392	
CD at 5%		19.848		1.712		1.155	
CD at 1%		27.070		2.334		1.575	
ERR%							
Iodophor	0.1%	77.65**	54.53	80.75**	17.03	85.50	13.25
	0.5%	88.55**	76.22	90.39**	31.00	80.75	6.95
	1.0%	92.18**	83.44	95.75**	38.78	94.25	24.83
	1.5%	82.75%	64.67	85.00**	23.19	90.55	19.93
	2.0%	30.25**	-39.90	60.25**	-12.68	71.95	4.70
Control / Témoin		50.25		69.00		75.50	
S. E.		0.268		0.280		7.206	
CD at 5%		0.792		0.828		21.261	
CD at 1%		1.080		1.131		28.997	

* Statistically significant at 0.05% / Statistiquement significatif à 0,05 %.

** Statistically significant at 0.01% / Statistiquement significatif à 0,01 %.

Table II. Effect of iodophor on the cocoon characters of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* in 3 different seasons (mean of 5 replications).Tableau II. Effet de l'iodophore sur les caractères du cocon du ver à soie bivoltin, *Bombyx mori* pendant 3 saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).

Parameters/		Season					
Parameters	Treatments	Summer	% difference	Rainy	% difference	Winter	% difference
	Traitements	Été	Différence en %	Saison des pluies	Différence en %	Hiver	Différence en %
SC length (cm) / Longueur d'un cocon (cm)							
Iodophor	0.1%	3.20	6.67	3.30**	10.00	3.00	1.35
	0.5%	3.50**	16.67	3.64**	21.34	3.40**	14.86
	1.0%	4.00**	36.67	4.00**	36.67	4.00**	35.14
	1.5%	3.30**	10.00	3.30**	10.00	3.20**	8.11
	2.0%	3.00	-	3.00	-	3.00	1.35
Control / Témoin		3.00		3.00		2.96	-
S. E.		0.078		0.064		0.037	
CD at 5%		0.229		0.187		0.111	
CD at 1%		0.314		0.256		0.151	
SC breadth (cm) / Largeur d'un cocon SC (cm)							
Iodophor	0.1%	1.31	6.51	1.48	13.84	1.30	8.34
	0.5%	1.50**	21.95	1.70**	30.76	1.50**	25.00
	1.0%	2.00**	62.60	2.00**	53.85	2.00**	66.67
	1.5%	1.50**	21.95	1.50**	15.38	1.50**	25.00
	2.0%	1.30	5.69	1.36	4.61	1.30	8.34
Control / Témoin		1.23	-	1.30	-	1.20	-
S. E.		0.068		0.034		0.034	
C. D. at 5%		0.152		0.110		0.1007	
C. D. at 1%		0.299		0.150		0.137	
SC weight (g) / Poids du cocon SC (g)							
Iodophor	0.1%	1.724	2.93	1.800*	4.05	1.720*	3.93
	0.5%	1.950*	16.42	1.960*	13.30	1.902*	14.93
	1.0%	2.120*	26.57	2.220*	28.32	2.020*	22.05
	1.5%	1.755	4.78	1.830**	5.78	1.752*	5.86
	2.0%	1.412*	15.70	1.420*	17.92	1.356	18.07
Control / Témoin		1.675	-	1.730	-	1.655	-
S.E.		0.058		0.0298		0.0129	
CD at 5%		0.165		0.0880		0.0382	
CD at 1%		0.260		0.120		0.0520	

Table II. (Continued).

Tableau II. (Suite).

Parameters		Season					
	Treatments	Summer	% difference	Rainy	% difference	Winter	% difference
Paramètres		Saison					
	Traitements	Été	Différence de %	Saison des pluies	Différence de %	Hiver	Différence de %
Shell weight (g) / Poids de la coque (g)							
Iodophor	0.1%	0.350**	11.44	0.379	7.06	0.345*	4.23
	0.5%	0.425**	26.11	0.450**	27.12	0.401**	21.15
	1.0%	0.492**	45.99	0.529**	49.43	0.466**	40.78
	1.5%	0.354	5.04	0.375	5.93	0.356**	7.55
	2.0%	0.155**	-54.00	0.175**	-50.56	0.151**	-54.38
Control / Témoin		0.337		0.354		0.331	
S. E.		0.0074		0.0074		0.004	
CD at 5%		0.0218		0.0218		0.0124	
CD at 1%		0.0297		0.0297		0.0169	
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)							
Iodophor	0.1%	20.30	0.89	21.06*	2.53	20.06	0.40
	0.5%	21.79**	8.30	22.96**	11.78	21.60**	8.16
	1.0%	23.30**	15.81	23.80**	18.91	23.09**	15.62
	1.5%	20.17	0.25	20.21	-1.60	20.30	1.65
	2.0%	11.05**	-45.07	12.40**	-39.63	11.05**	-44.66
Control / Témoin		20.12		20.54		19.97	
S.E.		0.250		0.162		0.251	
Cd at 5%		0.739		0.477			0.741
Cd at 1%		1.008		0.651			1.011

* Statistically significant at 0.05% / Statistiquement significatif à 0,05 %.

** Statistically significant at 0.01% / Statistiquement significatif à 0,01%.

Rate of growth and development and viability are some of the prime important parameters to evaluate the effect of chemical or physical agents in animal test (Luning, 1966 ; Sankaranarayana, 1969; Gayathri and Krishnamurthy, 1979). These serve as good indicators of various somatic effects caused by a chemical in the test substrate (Luning, 1966, Sorsa and Pfeifer, 1973). The parameters analysed in the present investigation herald the effect of the growth regulators and viability in silkworm, *B. mori*.

The authors observed a reduction in larval span of life when oral administration of mulberry soaked in 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5% concentrations of iodophor solutions in different three seasons. It is reported that the insects are capable of metabolising the iodinated compounds in their tissues (Limpel and Casida, 1959) and there are several reports to show the role of iodinated compound potassium iodide in improvement of larval growth and economic characters of silkworm, *B. mori*. Majumdar

(1982) observed that the oral administration of lower dose of potassium iodide through mulberry leaves reduced the larval duration and improved the cocoon characters of silkworm. Majumdar and Medda (1975) reported that feeding of thyroxine with mulberry leaves has shortened the larval life span of *B. mori*. Qader *et al.* (1993) also reported that feeding of iodized salt to silkworm, *B. mori* shortened the larval period and improved the cocoon characters. Hence, it is inferred that minerals and their salts accelerate the growth of silkworm through orientation of physiological activity and thereby reduced the larval duration and increased the silk content in the cocoon. The prolongation of larval duration of silkworm with 2% iodophor treatment in all three seasons was also observed in this investigation. Krishnaswami *et al.* (1979) and Kowana *et al.*, (1984) have also reported an increased larval duration when they used juvenile hormones to improve the silk yield. Qader *et al.* (1993) reported the prolongation of larval period when higher doses of potassium iodide were supplemented to silkworm *B. mori*. This prolongation of larval period is attributed to the physiological changes in silkworm due to chemical administration. But Bonnier (1960) is of the opinion that the growth and development depends on both genetic and environmental factors. However, the authors feel that high dose (2%) of iodophor treatment alters the cellular environment and increases the larval duration.

It can be observed that the larval weight due to the effects of lower doses of iodophor treatments was more pronounced than that of 2% treatment and control in all three seasons tested. Majumdar and Medda (1975) reported that thyroxine hormone fed to silkworm has increased the larval body weight. On the other hand Majumdar (1982) found that potassium iodide (KI) increased the larval weight. Similar results were obtained by Qader *et al.* (1993) in silkworm, *Bombyx mori* L., after feeding with different lower doses of iodate salt through mulberry leaves. The low doses of iodophor solution supplemented to silkworm through mulberry leaves are attributed to stimulate food intake and correspondingly the larval body weight. This conclusion of the authors is in conformity with the earlier studies on eri silkworm, *Philosomia ricini* Hutt. (Joshi, 1981). Reduced larval weight was observed when high concentration of iodophor (2%) was supplemented with mulberry leaves, in all seasons. Qader *et al.* (1993) reported the reduced larval weight in silkworm *B. mori* after feeding with high concentrations of potassium iodide. The increase in the larval duration and the decrease of larval weight might be due to the retarding effect of high concentration of iodophor in their metabolic system.

Cocoon size, cocoon weight, shell weight and shell ratio:

The weights of single cocoon and single shell, size of cocoons and shell ratio are prime characters which portray the productivity. The productivity depends on Darwinian fitness and viability. Further, viability is an adaptive trait of an individual, the increase of which qualifies itself to survive and perpetuate in a given environment. The trait is also vulnerable to the changes in the internal and external factors. The present investigation reveals that oral administration of lower doses (0.1–0.15%) of iodophor concentrations to NB4D2 improved all the cocoon characters (Table II) in all three seasons compared to their respective controls and 2% iodophor concentrations. Majumdar and Medda (1975) reported that a lower dose of KI significantly increased the cocoon and shell weight and shell ratio. Chakraborty and Medda (1978) found that KI increased the shell and cocoon weights over control in silkworm, *B. mori* L. Qader *et al.* (1993) reported that a lower dose of KI and iodized salt increased the single cocoon and shell weight and shell ratio in silkworm, *B. mori* L. Chaudhuri *et al.* (1990) found that thyroxine hormone has increased the single cocoon and shell weights and shell ratio of silkworm, *B. mori* L. Nistari race. Based on the above observations it is opined that dietary supplementation of iodophor accelerate the growth and metamorphosis of silkworm and treatment of this iodophor improved the cocoon size, cocoon and shell weights and shell ratio. The present investigation also reveals that oral administration of high (2%) concentration of iodophor to NB4D2 race induced a significant reduction in all the above mentioned cocoon length and breadth, cocoon and shell weights and shell ratio. Therefore, on the basis of these results it can be concluded that lower doses of iodophor treatments (1.0–1.5 %) significantly improved the cocoon characters, whereas

when the high (2%) concentration of iodophor is significantly reduced these characters it might be due to its dual nature (Table II).

Table III. Effect of iodophor on suppression of disease incidence in bivoltine silkworm *Bombyx mori* in 3 different seasons (mean of 5 replications).

Tableau III. Effet de l'iodophore sur l'incidence de la maladie chez le ver à soie bivoltin Bombyx mori pendant 3 saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).

Parameters Treatments		Season					
		Summer	% difference	Rainy	% difference	Winter	% difference
<i>Paramètres Traitements</i>		<i>Saison</i>					
		<i>Eté</i>	% en différence	<i>Saison des pluies</i>	% en différence	<i>Hiver</i>	% en différence
Flacherie (%)							
Iodophor	0.1%	13.50**	- 61.36	9.65**	- 43.06	8.65**	- 44.09
	0.5%	5.20**	- 85.50	5.75**	- 66.07	2.75**	- 82.25
	1.0%	5.25**	- 85.35	2.64**	- 84.42	1.45**	- 90.65
	1.5%	10.90**	- 69.60	7.85**	- 53.68	4.35**	- 71.93
	2.0%	37.90**	5.17	24.60**	45.13	11.43**	- 26.25
Control / Témoin		35.85		16.95		15.50	
	S. E.	0.365		0.365		0.591	
	CD at 5%	1.077		1.078		1.745	
	CD at 1%	1.469		1.467		2.379	
Grasserie (%)							
Iodophor	0.1%	8.85**	- 36.33	9.60**	- 31.67	5.88**	- 34.67
	0.5%	6.25**	- 55.04	3.86**	- 72.52	2.98**	- 66.88
	1.0%	2.75**	- 80.21	1.61**	- 88.54	0.00	0.00
	1.5%	6.30**	- 54.67	7.15**	- 49.11	5.10**	- 43.34
	2.0%	39.85**	186.69	15.15	+ 7.83	16.62**	+ 84.67
Control / Témoin		13.90		14.05		9.00	
	S. E.	0.462		0.463		1.158	
	CD at 5%	1.364		1.364		3.419	
	CD at 1%	1.860		1.860		4.663	

* Statistically significant at 0.05% / *Significatif statistiquement à 0,05 %.*

** Statistically significant at 0.01% / *Significatif statistiquement à 0,01 %.*

Occurrence of grasserie and flacherie diseases:

The table III revealed that the highest (100%) reduction in the incidence of grasserie disease was noticed in winter in the silkworm batches treated with 1% iodophor concentration followed by – 88.54% in rainy and – 80.21% in summer seasons, whereas the highest incidence of grasserie (186.69%) was recorded in the silkworm batches treated with 2% iodophor solution in summer followed by 84.67% in winter and 7.83% in rainy seasons compared to their respective controls. The highest reduction in the incidence of flacherie disease (– 90.65 %) was recorded in winter, followed by – 85.35% in summer and – 84.42% in rainy seasons in the batches treated with 1% iodophor solution, whereas the highest incidence of flacherie disease (45.13%) was recorded in rainy season in the batches treated with 2% iodophor solution followed by 5.17% in summer season compared to their respective controls. This indicates the incidence of grasserie and flacherie diseases were suppressed significantly in the batches treated with lower doses of iodophor solution, whereas these were significantly induced in the batches treated with high (2%) concentration of iodophor solutions in all three seasons. The low / high incidence of grasserie and flacherie diseases reflected in high / low survival rate of the worms (Table I). Reduced larval period will be advantageous as this will minimize the larval mortality due to diseases and enhance the ERR (Thangavelu and Bania, 1990). The increase in high ERR in treated batches, except in 2% iodophor treatment may be due to the control of multiplication of intestinal flora of silkworm during varied seasons resulting in low incidence of flacherie. Similar results were recorded by Radha *et al.* (1981) and Baig *et al.* (1990) in silkworm, *B. mori* by feeding silkworms with antibiotics along with mulberry leaves. The decrease in the percent incidence of grasserie in treated batches, except in 2% iodophor treatment, may be due to some effects on virus multiplication. Similar results were recorded by Ueda *et al.* (1955) and Baig *et al.* (1990) in silkworm, *B. mori* L. by feeding the antibiotics through mulberry leaves. This conclusion of the observation is in conformity with the earlier observation on the effect of iodophor on virus and bacterial activities (Hoehn, 1976). The low ERR due to high concentration of iodophor (2%) resulting in high incidence of flacherie and grasserie diseases might be due to the detrimental effect of high concentration in the metabolic activity of silkworm, *B. mori* L. in various seasons tested (Table III).

The overall investigation shows that 1.0 – 1.5% iodophor treatments probably were capable of stimulating the larval growth, cocoon characters and reducing the incidence of flacherie and grasserie diseases in silkworm, *Bombyx mori* L. in three different seasons.

REFERENCES

- BAIG M., NATARAJU B., SAMSON M. V. (1990) Studies on the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to diseases in silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29, 54-58.
- BONNIER G. (1960) Experiments on hybrid superiority in *Drosophila melanogaster*. II Rate of development from egg hatching to eclosion. Genetics, 46, 86-91.
- CHAKRABORTHY M., MEDDA A. K. (1978) Effect of potassium iodide on silkworms (*Bombyx mori* L.) nistari race. Science and Culture, 44(5), 231-232.
- CHAUDHURI S., DAS S., MEDDA A. K. (1990) Is silkworm Responsive to Thyroxine? Indian Silk, 23(12), 23-25
- DUNCAN D. B. (1951) A significance test for differences between ranked treatments in an analysis of variance. Virginia J. Sci., 21, 171-189.
- GAYATHRI M. V., KRISHNAMURTHY N. B. (1979) Differential sensitivity of different species of *Drosophila* to ceresan – a mercurial fungicide. Ind. J. Exp. Biol., 17(4), 433-435.
- GORBMAN A. (1959) Comparative endocrinology. Wiley, New York, 746 p.
- GOVINDAN R., MAGADUM S. B., KRISHNA B. G., MAGADUM V. M. (1989) Effect of fortification of potassium iodide and copper sulphate through castor leaf of eri silkworm, *Samia cynthia ricini* on economic traits. Mys. J. Agric. Sci., 23, 62-64.
- HOEHN R. C. (1976) Comparative disinfection methods J. Am. Water works Assoc. 68, 302-308.

- HOUSE H. L. (1967) Res. Inst. Can. Dept. Agr. Bellevilla, Gntorio. Inform. Bull. 5400 pp.
- JOSHI K. L. (1981) Nutritional physiology of Lepidoptera, Evaluation of four dietary regimen for eri silkmoth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep. Saturnidae). Ph D. Thesis, Jodhpur Univ. India, 140.
- KNOLLE P. (1975) Alt und aktuell Keime undJod. Hospital. Hygiene. 67, 389-402.
- KRISHNASWAMI S., BENCHAMIN K. V., GEETHADEVI R. G., RAGHURAMAN R. (1980) Studies on the effect of juvenile hormone analogue ZR512 in Silkworm. Ann. Reports, CSRTI, Mysore, India.
- KUWANA E., TAKEYA R., ETO M. (1984) Synthesis and antijuvenile activity of 1-Citronellyl 1-5 substituted imidazole. Agric Biol. Chem., 48(12), 31115-3119.
- LIMPEL, CASIDA. (1959) Iodine metabolism in insect I, metabolism *in vivo* of radio active iodine. J. Exp. Zool., 135, 19-27.
- LUNING K. G. (1966) Drosophila tests in Pharmacology. Nature, 209, 84-86.
- MAJUMDAR A. C. (1982) Note on the physiological effects on the growth and reproduction of silkworm fed on mulberry leaves soaked in potassium iodide. Indian J. Agric. Sci., 52(4), 250-252.
- MAJUMDAR A. C., MEDDA K. (1975) Studies on the thyroxine and vitamin B12 induced changes in the life cycle of silkworms. Indian J. Physiol. Applied Sci., 29, 1-13.
- MEDDA A. K., RAY A. K., DASGUPTA A. K., MAJUMDAR A. C., DEY C. D., (1980) Thyroid hormone action in mugar fish and silkworms. Thyroid Res.VIII, 240-243.
- QADER A. A., SARKER M. A. RAB., BARMAN A. C. (1993) Effect of potassium iodide and iodized salt on the larval growth and cocoon characters of the silkworm, *Bombyx mori* L., race BSR-832. Sericologia, 33, 595-598.
- RADHA N. V., NATARAJAN T., MUTHUKRISHNAN T. S., OBLISAMI S. (1981) Effect of antibiotics on the growth and productivity of mulberry silkworms. Proceedings of sericulture symposium and seminar 1980, TNAU, Coimbatore, 173-177.
- SANKARANARAYANA K. (1969) The effect of nitrogen and oxygen frequency of x-ray induced dominant lethals and the physiology of the sperms in *Drosophila melanogaster*. Mut. Res., 4, 641-661.
- SORSA M., PFEIFER S. (1973) Effect of cadmium on development time and prepupal puffing pattern of *Drosophila melanogaster*. Hereditas, 74, 273-277.
- THANGAVELU K., BANIA H. R. (1990) Preliminary investigation on the effects of minerals in the rain water on the growth and reproduction of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29, 37-43.
- UEDA K., OKOMOTO Y., SAKAI H., AIRMA K., YONEHARA H., SAKAGAMI Y. (1955) An antibiotic against silkworm jaundice virus, grasseriomycin, produced by streptomyces species. J. Antibiotics (Japan), 8, 1-95.
- WALLHAUSSER K. H. (1978) Sterilisation, Disinfection, konservierung. Stuttgart, Georg Thieme.

EFFICACITE DU IODOPHORE PAR RAPPORT A LA CROISSANCE, LA PRODUCTIVITE ET L'APPARITION DE MALADIES CHEZ LA RACE NB₄D₂ DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

P. VENKATARAMANA¹, N. SURYANARAYANA² & R. K. DATTA³

1. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad (A. P.) - 501 101, Inde.

2. Regional Sericultural Research Station, Anantapur (A. P.), 515 001, Inde.

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

*Dans cette étude, nous avons utilisé une race de ver à soie (*Bombyx mori* L.) bivoltine NB₄D₂ pour comprendre l'efficacité du Iodophore [éther de polyglycol phenoxy alkyl complexant 1,6 % d'iode disponible (p/v)] par rapport à la croissance, la productivité et l'apparition des maladies de la grasserie et de la flacherie pendant trois saisons (en été, pendant la saison des pluies et en hiver) dans les conditions tropicales après l'avoir administré oralement avec les feuilles de mûrier. On observe qu'avec les doses les plus faibles de Iodophore (1 à 1,5 %) les caractères de la larve et du cocon s'améliorent de manière significative par rapport aux autres concentrations et au témoin pendant toutes les saisons. La fréquence de la grasserie et de la flacherie baisse aussi de manière significative avec les doses les plus faibles (1 et 1,5 %) pendant les trois saisons. Cependant, avec une dose plus importante en Iodophore (2 %) les caractères de la larve et du cocon sont affectés de manière significative et cela entraîne une éruption de grasserie et de flacherie pendant les trois saisons. Ces observations suggèrent donc que les doses les plus faibles de Iodophore (1 et 1,5 %) améliorent de manière significative les caractères de la larve et du cocon et suppriment l'apparition des maladies pendant les trois saisons tandis que la dose la plus élevée de Iodophore (2 %) affecte de manière significative les caractères de la larve et du cocon et entraîne l'éruption des maladies de la grasserie et de la flacherie.*

LE IODOPHORE

Le Iodophore est un complexant d'iode élémentaire (un éther de polyglycol phenoxy alkyl complexant 1,6 % d'iode disponible (p/v) produit par Asian Catalyst and Chemicals M/s, de Mumbai) avec un grand éventail d'action microbicide sur tous les micro-organismes importants liés à la santé tels que les entérobactéries, les virus entériques et les protozoaires (Hoehn, 1976). Les mycobactéries et les spores des bacilles et des clostridies peuvent être tuées par l'iode (Wallhauser, 1978). L'iode présente aussi une activité fongicide et trichomonacide (Knollc, 1975). De plus, l'iode est présente dans la thyroxine, qui est produite par la glande thyroïde des invertébrés et des vertébrés. On a suggéré depuis longtemps que la fonction de la thyroxine avait évolué en raison de la distribution phylétique importante de la capacité des organismes à former des composés de iodoprotéines, de iodotyrosine et de iodothyronine avec une valeur d'adaptation ou métabolique (Gorbaman, 1959). Les invertébrés sans thyroïde qui montrent une réponse claire à l'hormone exogène de la thyroïde comme les vertébrés sont considérés comme de bons spécimens pour étudier la multiplicité de l'action hormonale de la thyroïde. Les éléments minéraux ne sont pas synthétisés à l'intérieur des insectes, bien qu'ils soient des éléments essentiels et effectuent des processus métaboliques variés (House, 1967). Par conséquent, de nouvelles dimensions en endocrinologie comparative émergent. Comme le ver à soie

dans l'ensemble est la *prima donna* du royaume des insectes pour les biologistes pour l'étude de la croissance, de la différenciation, de la reproduction, etc... cet animal a attiré l'intérêt des physiologistes comme un excellent matériel pour étudier et comparer les hormones, les vitamines, les éléments minéraux etc... des vertébrés par rapport à des processus physiologiques variés. Il est signalé dans la littérature que l'apport de thyroxine et de vitamine B avec les feuilles de mûrier (Majumdar et Medda, 1975 ; Medda et coll., 1980 ; Chaudhuri et coll., 1990) a une influence sur la croissance, la métamorphose, la production de soie, le métabolisme de la glande séricigène, la production d'œufs et les caractères économiques chez la race Nistari du ver à soie, *Bombyx mori* L. Majumdar et Medda (1975) ont rapporté qu'en donnant de la thyroxine avec les feuilles de mûrier, cela diminue la durée de vie de *B. mori* L. Le iodeure de potassium donné avec les feuilles de mûrier améliore la croissance larvaire et les caractères économiques du ver à soie *B. mori* L. (Chakraborty et Medda, 1978 ; Majumdar, 1982). Chez le ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* l'ajout d'iodeure de potassium à l'alimentation améliore la croissance larvaire et les caractères du cocon (Govindan et coll., 1989). Ainsi compte tenu de l'importance de l'iode dans la nutrition du ver à soie, nous avons ressenti le besoin de réaliser une étude sur l'effet du Iodophore sur la croissance larvaire, les caractères du cocon et l'incidence des maladies chez le ver à soie bivoltin pur *Bombyx mori* L. (NB4D2) pendant trois saisons différentes, c'est à dire en été, pendant la saison des pluies et en hiver dans des conditions climatiques tropicales.

MATERIELS ET METHODES

La race pure hybride bivoltine de *Bombyx mori* L. (NB4D2) est utilisée dans cette étude. Les larves d'expérimentation sont comptées après la 2^{ème} mue et cinq répétitions de 500 larves chacune sont maintenues. Cinq concentrations différentes de solution de iodophore (1,6 % d'iode disponible), c'est à dire 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 % sont préparées dans de l'eau distillée. Les feuilles de mûrier sont trempées dans ces solutions pendant 10 minutes et séchées à l'ombre pendant 30 minutes avant le nourrissage. Les feuilles traitées sont données en nourriture aux larves de vers à soie une fois, le premier jour de chaque âge et aussi une fois le cinquième jour du dernier âge et les autres nourrissements ont lieu avec des feuilles non traitées. Un témoin nourri avec des feuilles non traitées est conservé pour le comparer avec les lots traités. L'expérience est réalisée pendant trois saisons différentes, c'est à dire pendant l'été, la saison des pluies et en hiver dans des conditions climatiques tropicales. Les données par rapport à la croissance larvaire, aux caractères économiques des cocons et au pourcentage de flacherie et de grasserie sont enregistrées et soumises à une analyse statistique (Duncan, 1951). Le pourcentage d'incidence des maladies est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'incidence de la maladie} = \frac{\text{Nbre de larves malades}}{\text{Nbre total de larves échantillons recueillies}} \times 100$$

RESULTATS ET DISCUSSION

Durée larvaire, poids larvaire et taux effectif d'élevage (% ERR) :

La durée larvaire, le poids larvaire et l'ERR (Taux Effectif d'Elevage) après le traitement avec les différentes concentrations de iodophore pendant les trois saisons différentes sont présentés dans le Tableau I. Pendant les trois saisons, à l'exception du traitement avec le iodophore à 2 %, les autres traitements au iodophore (0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 %) diminuent la durée larvaire et améliorent le poids larvaire et l'ERR par rapport à leurs témoins respectifs. Par contre la concentration élevée en iodophore (2 %) fait baisser le poids larvaire et l'ERR et prolonge la durée larvaire pendant les trois saisons. La réduction la plus importante de la durée larvaire par rapport à celle des témoins est de 42 h (traité : 684 heures ; témoin 726 hrs) en hiver, suivie par 13 hrs (traité : 637 heures ; témoin : 650 hrs) pendant la saison des pluies et 23 heures (traité : 604 hrs ; témoin 627 hrs) pendant l'été avec des

traitements en iodophore de 1 %. De plus, parmi les traitements, le traitement avec 1 % de iodophore donne le poids larvaire maximum, une augmentation de 35,74 % (traité : 55,45 g ; témoin : 40,85 g) pendant la saison des pluies, suivie par une augmentation de 18,77 % (traité : 41,75 g, témoin : 35,15 g) en hiver et 13,22 % (traité : 43,25 g ; témoin : 38,20 g) pendant l'été. Avec le traitement à 1 %, l'augmentation du taux de survie est de 83,44 % (traité : 92,18 %, témoin : 50,25 %) en été, suivie par 38,78 % (traité 95,75 %, témoin : 69 %) pendant la saison des pluies et 24,83 % (traité : 94,25 % ; témoin : 75,5 %) pendant l'hiver. Cependant le taux de survie des larves, la durée larvaire et le poids larvaire sont affectés par le traitement au iodophore à 2 % pendant toutes les saisons.

Le taux de croissance et de développement et la viabilité sont les principaux paramètres pour évaluer l'effet des agents chimiques ou physiques sur les animaux (Luning, 1966 ; Sankaranarayana, 1969 ; Gayathri et Krishnamurthy, 1979). Ils sont de bons indicateurs des effets somatiques variés entraînés par un produit chimique dans le substrat testé (Luning, 1966, Sorsa et Pfeifer, 1973). Les paramètres analysés dans cette étude témoignent de l'effet des régulateurs de croissance et de la viabilité chez le ver à soie, *B. mori*.

Les auteurs ont observé une baisse de la durée larvaire quand on administre des feuilles de mûrier trempées dans des solutions de iodophore à des concentrations de 0,1 ; 0,5 ; 1 et 1,5 % par voie orale pendant les trois saisons. On a observé que les insectes sont capables de métaboliser les composés iodés dans leurs tissus (Limpel et Casida, 1959) et il existe plusieurs rapports qui montrent le rôle du iode de potassium par rapport à l'amélioration de la croissance larvaire et des caractères économiques chez le ver à soie, *B. mori*. Majumdar (1982) a observé que l'administration orale de la plus faible dose d'iode de potassium avec les feuilles de mûrier diminue la durée larvaire et améliore les caractères du cocon chez le ver à soie. Majumdar et Medda (1975) ont signalé que l'apport de thyroxine avec les feuilles de mûrier diminue la durée larvaire chez *B. mori*. Qader et coll., (1993) ont aussi rapporté que l'apport de sel iodé au ver à soie *B. mori* diminue la durée larvaire et améliore les caractères du cocon. On en déduit donc que les produits minéraux et leurs sels accélèrent la croissance du ver à soie par l'orientation de son activité physiologique et de ce fait diminuent la durée larvaire et augmentent la teneur en soie du cocon. Nous avons aussi observé la prolongation de la durée larvaire du ver à soie avec le traitement au iodophore à 2 % pendant les trois saisons. Krishnaswami et coll., (1979) et Kowana et coll., (1984) ont aussi rapporté une augmentation de la durée larvaire quand ils utilisent des hormones juvéniles pour améliorer le rendement en soie. Qader et coll., (1993) ont fait part du prolongement de la durée larvaire quand on apporte des doses plus élevées de iode de potassium au ver à soie *B. mori*. Cette prolongation de la durée larvaire est attribuée aux changements physiologiques chez le ver à soie dus à l'administration chimique. Mais Bonnier (1960) pense que la croissance et le développement dépendent à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. Cependant, les auteurs pensent qu'une dose élevée (2 %) de iodophore altère l'environnement cellulaire et augmente la durée larvaire.

On peut observer un effet plus prononcé sur le poids larvaire avec des doses plus faibles de traitements au iodophore qu'avec le traitement à 2 % pour les trois saisons testées. Majumdar et Medda (1975) ont rapporté que si l'on ajoute de la thyroxine à l'alimentation du ver à soie cela augmente le poids larvaire. D'autre part, Majumdar (1982) a trouvé que l'iode de potassium (KI) augmente le poids larvaire. Des résultats similaires ont été obtenus par Qader et coll., (1993) chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. après l'avoir nourri avec différentes doses plus faibles en sel iodé apporté sur les feuilles de mûrier. On pense que les faibles doses de solution de iodophore données en supplément au ver à soie avec les feuilles de mûrier stimulent la consommation de nourriture et par conséquent le poids larvaire. Cette conclusion des auteurs est en conformité avec les études précédentes d'auteurs chez le ver à soie eri, *Philosomia ricini* Hutt. (Joshi, 1981). Nous observons une diminution du poids larvaire quand on ajoute une concentration élevée de iodophore (2 %) avec les feuilles de mûrier pendant toutes les saisons. Qader et coll., (1993) ont rapporté une baisse du poids larvaire chez le ver à soie *B. mori* après l'avoir nourri avec des concentrations élevées de iode de potassium.

L'augmentation de la durée larvaire et la baisse du poids larvaire pourraient être dues à l'effet retardataire de la concentration élevée en iodophore sur le système métabolique.

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

Les poids d'un cocon et d'une coque, la taille des cocons et la richesse soyeuse sont les principaux caractères qui reflètent la productivité. La productivité dépend de l'adaptation darwinienne et de la viabilité. De plus, la viabilité est un trait d'adaptation d'un individu, dont l'augmentation lui permet de survivre et de se perpétuer dans un environnement donné. Le trait est aussi sensible aux changements des facteurs internes et externes. Cette étude révèle que l'administration orale de doses faibles (0,1 – 0,15 %) en iodophore chez NB4D2 améliore tous les caractères du cocon (Tableau II) pendant les trois saisons par rapport à leurs témoins respectifs et aux concentrations en iodophore à 2 %. Majumdar et Medda (1975) ont signalé qu'une dose faible de KI augmente le poids du cocon et de la coque et la richesse soyeuse de manière significative. Chakraborty et Medda (1978) ont trouvé que le KI augmente les poids de la coque et du cocon par rapport au témoin chez le ver à soie, *B. mori* L. Qader et coll., (1993) ont rapporté qu'une dose plus faible de KI et de sel iodé augmente le poids du cocon et le poids de la coque et la richesse soyeuse chez le ver à soie, *B. mori* L. Chaudhuri et coll., (1990) ont trouvé que la thyroxine augmente les poids du cocon et de la coque et la richesse soyeuse chez le ver à soie, *B. mori* L., race Nistari. Les observations ci-dessus montrent que l'ajout d'iodophore au régime alimentaire accélère la croissance et la métamorphose du ver à soie et le traitement au iodophore améliore la taille du cocon et les poids du cocon et de la coque. Cette étude révèle que l'administration orale d'une concentration élevée (2 %) de iodophore chez la race NB4D2 induit une réduction significative de la longueur et de la largeur du cocon, du poids du cocon et de la coque et de la richesse soyeuse. D'après ces résultats nous pouvons donc conclure que des doses plus faibles de traitements au iodophore (1 – 1,5 %) améliorent de manière significative les caractères du cocon, tandis que quand la concentration de iodophore est élevée (2 %) ces caractères baissent de manière significative, ce qui pourrait être dû à sa double nature (Tableau II).

Taux de maladie de la grasserie et de la flacherie :

Le tableau III montre que la baisse la plus élevée (100 %) de taux de grasserie se produit en hiver chez les lots de vers à soie traités avec une concentration en iodophore de 1 %, suivie par une baisse de 88,54 % pendant la saison des pluies et de 80,21 % pendant l'été tandis qu'on enregistre le taux de grasserie le plus élevé (186,69 %) chez les lots de vers à soie traités avec une solution de iodophore à 2 % en été, suivi par 84,67 % en hiver et 7,83 % pendant la saison des pluies par comparaison à leurs témoins respectifs. La baisse la plus importante de la flacherie (– 90,65 %) est enregistrée en hiver, suivie par – 85,35 % en été et – 84,42 % pendant la saison des pluies chez les lots traités avec 1 % de solution iodophore, tandis que le taux le plus élevé de maladie (45,13 %) est enregistré pendant la saison des pluies chez les lots traités avec une solution de iodophore à 2 %, suivi par 5,17 % en été. Cela indique que les taux de maladie de la grasserie et de la flacherie baissent de manière significative chez les lots traités avec des doses plus faibles de solution iodophore tandis qu'ils sont déclenchés de manière significative chez les lots traités avec une concentration élevée (2 %) de solution en iodophore pendant les trois saisons. Le taux faible / élevé de grasserie et de flacherie a une incidence sur le taux de survie élevé / faible des vers (Tableau I). La diminution de la durée larvaire est avantageuse parce qu'elle minimise la mortalité larvaire due aux maladies et améliore l'ERR (Thangavelu et Bania, 1990). L'augmentation élevée de l'ERR chez les lots traités, à l'exception du traitement avec 2 % de iodophore, pourrait être due au contrôle de la multiplication de la flore intestinale chez le ver à soie pendant différentes saisons, ce qui entraîne une baisse du taux de flacherie. Radha et coll. (1981) et Baig et coll. (1990) ont enregistré des résultats similaires chez le ver à soie *B. mori* en apportant des antibiotiques aux vers à soie avec les feuilles de mûrier. La baisse du taux de grasserie chez les lots traités, à l'exception du traitement au iodophore à 2 %, pourrait être due à certains effets sur la multiplication du virus. Des résultats similaires ont été enregistrés par Ueda et coll. (1955) et Baig et

coll. (1990) chez le ver à soie, *B. mori* L. en donnant des antibiotiques avec les feuilles de mûrier. Cette conclusion est en accord avec une observation précédente sur l'effet du iodophore sur les activités de virus et de bactéries (Hoehn, 1976). Le faible ERR obtenu avec une concentration élevée en iodophore (2 %) et l'incidence élevée de flacherie et de grasserie pourrait être dus à l'effet préjudiciable d'une concentration élevée sur l'activité métabolique du ver à soie, *B. mori* L. pendant les différentes saisons testées (Tableau III).

L'étude globale montre que les traitements au iodophore de 1 à 1,5 % stimulent probablement la croissance larvaire et les caractères du cocon et diminuent le taux de flacherie et de grasserie chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. au cours des trois saisons différentes.

QUANTITATIVE STUDIES ON THE CONSUMPTION AND UTILIZATION OF *TERMINALIA TOMENTOSA* LEAVES BY LARIA LARVAE

U. S. P. SINHA*, S. K. MATHUR, A. K. SINHA & B. N. BRAHMACHARI

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303 (Bihar), India.

Food consumption and utilisation during different larval instars were quantitatively studied through a feeding trial on *Laria* eco-race of tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury on the foliage of *Terminalia tomentosa*. During its larval span of 42 days, the average total consumption of an individual larva was 136.713 g of which 80.518 g was assimilated by the insect. The quantity of food consumption increased with the increase in the age of the larvae and reached its peak in the fifth instar (80.13% of total consumption). The assimilation and tissue growth were found positively correlated with the consumption and maturity of the larva. With the advancement of age, the approximate digestibility declined whereas efficiency of conversion of ingested and digested food rose upto 4th instar and thereafter decreased in the 5th instar.

Keywords: *Laria*, eco-race, *Terminalia tomentosa*, consumption, assimilation.

INTRODUCTION

Although qualitative nutritional aspects of insect nutrition invited greater attention, its quantitative part remained neglected at least prior to the extensive review by Waldbauer (1968). Sudo *et al.* (1979, 1981), Joshi (1984, 1985 a & b), Periasamy *et al.* (1984), Periasamy & Radhakrishnan (1985), Narayananprakash *et al.*, (1985) and Pant *et al.*, (1986) conducted work on the food utilization by silkworm, *Bombyx mori* L. and *Philosamia ricini* Hutt. Recently, Sinha *et al.*, (1997) have done work on the consumption and utilization of *Shorea robusta* leaves in different instars of tasar silkworm *Antheraea mylitta*.

The present investigation was taken up due to the shortage of information on quantitative nutritional aspects of an important eco-race *Laria* of *A. mylitta* which is found in Bihar and Madhya Pradesh and is exploited for mass rearing of tropical tasar silkworm at farmers level.

MATERIALS AND METHODS

The healthy larvae of *Laria* eco-race of *A. mylitta* were reared indoor from the first to the fifth instar on *T. tomentosa* leaves during the second rearing season (September-November) as per method described by Rana *et al.* (1987). Four replications with fifty larvae in each were maintained throughout the larval stage, starting from brushing till the end of rearing. A parallel batch of worms were reared under identical conditions to replace the weak and dead larvae during the course of the study. Besides, a control set of leaves identical to those fed to worms was also maintained to determine the loss in

* Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Jamuguri, Rowriah, Jorhat 785 005 (Assam), India.

weight of leaves due to desiccation. The amounts of consumption, egestion and larval weight were measured and recorded except during the moulting period. The gravimetric method of Waldbauer (1968) was followed for the evaluation of day-to-day food consumption by the larvae.

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

RESULTS AND DISCUSSION

Quantity of food consumption, egestion, assimilation, the tissue growth and the food oxidised for all the larval instars are presented in Table I. It is evident from this table that average total leaf consumption by an individual larva was 136.713 g. In the process of natural growth of the larvae, the amount of food consumed started increasing from first to fifth instar. The consumption was maximum during the fifth instar being 80.13% of the total consumption. Almost similar findings have been reported by Rana *et al.* (1987) in *Antheraea proylei* and Barah *et al.* (1989) in *Antheraea assama*.

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

Tableau I. Consommation, élimination, assimilation, croissance des tissus et respiration au cours des différents âges des larves Larie nourries sur T. tomentosa (poids frais en grammes).

Instar	Consumption	Egestion	Assimilation	Tissue growth	Respiration
Age	Consommation	Elimination		Croissance des tissus	
I	0.383 ± 0.002 (0.28)	0.095 ± 0.001	0.288 ± 0.003 (0.36)	0.047 ± 0.001 (0.19)	0.241 ± 0.002
II	1.910 ± 0.002 (1.40)	0.500 ± 0.001	1.410 ± 0.001 (1.75)	0.454 ± 0.001 (1.83)	0.956 ± 0.001
III	5.910 ± 0.004 (4.32)	1.600 ± 0.001	4.310 ± 0.003 (5.35)	1.760 ± 0.009 (7.09)	2.548 ± 0.009
IV	18.960 ± 0.005 (13.87)	6.000 ± 0.002	12.960 ± 0.003 (16.10)	6.230 ± 0.009 (25.11)	6.730 ± 0.006
V	109.550 ± 0.077 (80.13)	48.000 ± 0.031	61.550 ± 0.047 (76.44)	16.320 ± 0.037 (65.78)	45.230 ± 0.009

± values indicate standard error ± instarwise percent of consumption, assimilation and tissue growth for each instar are given in parentheses (100% parameters were calculated on the total larval life)

Les valeurs ± indiquent l'écart type : les pourcentages de consommation, d'assimilation et de croissance des tissus en fonction de l'âge pour chaque âge sont donnés entre parenthèses (le 100 % des paramètres est calculé sur la vie larvaire totale).

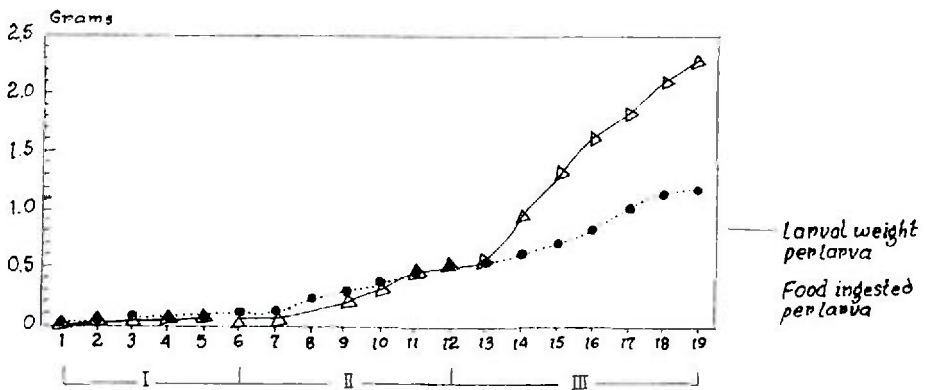


Fig. 1. Daily cumulative weights attained vrs. food consumed by larval instars (I-III).

Fig. 1. Poids cumulatifs quotidiens atteints en fonction de la nourriture consommée au cours des âges larvaires I à III.

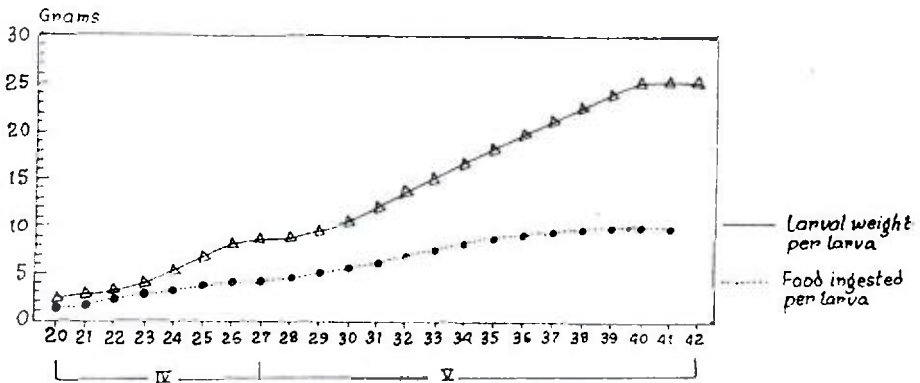


Fig. 2. Daily cumulative weights attained vrs. food consumed by larval instars (IV-V).

Fig. 2. Poids cumulatifs quotidiens atteints en fonction de la nourriture consommée au cours des âges larvaires IV à V.

In the insects, assimilation is the total quantity of food available to be incorporated as body substances or to be metabolized for energy (Reddy & Alfred, 1979). Assimilation was the highest in the fifth instar (76.44%) and found to be related with the amount of food consumed. This finding is in agreement with those of Barah *et al.* (1989). It is also clear from the data that there exists a direct correlation in tissue growth with the age of the larvae. The tissue growth was also found to be positively correlated to the amount of food consumed (Figs. 1 & 2) and found maximum (65.78%) in the fifth instar larvae. The average larval weight of mature larva in the fifth instar was found to be 24.850 g.

The three primary parameters of nutritional physiology digestibility, efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food to body substances are depicted in Table II. It is evident from

this table that the approximate digestibility (AD) was the highest (75.19%) in first instar larvae which gradually reduced with the advancement of instar and reached the lowest (56.19%) in the fifth instar larvae. Almost similar findings have been reported in *B. mori* (Horie & Watanabe, 1983; Benchamin & Jolly, 1984), in *A. proylei* (Rana *et al.*, 1987) and in certain other Lepidopteran insects (Waldbauer, 1968). According to Waldbauer (1964) digestibility is affected by imbalanced diet or high content of crude fibre in the food. The highest AD in early instars may be due to the fact that young larvae are generally selective feeders and feed on the young and succulent leaves containing low content of crude fibre, which is easy to digest, while the old instar larva ingest also mature leaves with veins in which crude fibre content is high. This results in the decline of approximate digestibility. The grand mean value of AD for the five larval instar in *Laria* larvae fed on *T. tomentosa* on fresh weight basis was found to be 69.30% while in *A. proylei* 71% (Rana *et al.*, 1987). Sinha *et al.*, (1997) reported this value to be 67.61% in *A. mylitta* fed on *S. robusta*.

It is also evident from Table II that the efficiency of conversion of ingested (ECI) and digested (ECD) food to body substances increased from first to fourth instar and then declined in the fifth instar. A number of other workers have found the same trend of rise and fall in ECI and ECD in different insects (Mukherji & Guppy, 1970; Latheef & Harcourt, 1972; Bailey, 1976). The lower value of ECI and ECD in the early instars is perhaps due to the fact that a smaller portion of the ingested or digested food is used for tissue growth and major portion for its maintenance. In the III & IV instars, the metabolic rate is higher than in the instars I & II and hence, more of the ingested or digested food is available for conversion to body tissues. The grand mean value of ECI over the entire larval period was 22.72%. The same value has been found to be in between 20-30% in *Menduca sexta* by Waldbauer (1968) and to be 22-23% in the mature larva of *B. mori* (Horie & Watanabe, 1983). The grand mean value of ECD was 32.79% in *Laria* larvae fed on *T. tomentosa*, while ECD for *A. proylei* fed on *Quercus serrata* was 34% (Rana *et al.*, 1987). Sinha *et al.*, (1997) reported this value to be 31.08% in *A. mylitta* fed on *S. robusta*.

Table II. Mean efficiency of food utilization by the *Laria* larvae fed on *T. tomentosa* leaves.

*Tableau II. Efficacité moyenne de l'utilisation de nourriture par les larves *Laria* nourries sur des feuilles de *T. tomentosa*.*

Instar	AD (%)	ECI (%)	ECD (%)
<i>Age</i>			
I	75.190 ± 0.233	12.268 ± 0.134	16.315 ± 0.128
II	73.822 ± 0.033	23.770 ± 0.010	32.199 ± 0.019
III	72.927 ± 0.014	29.790 ± 0.151	40.835 ± 0.190
IV	68.355 ± 0.001	32.859 ± 0.041	48.071 ± 0.061
V	56.185 ± 0.004	14.897 ± 0.024	26.515 ± 0.041
Grand mean	69.296 ± 3.473	22.717 ± 4.027	32.787 ± 5.520
<i>Moyenne totale</i>			

± values indicate standard error / les valeurs ± indiquent l'écart type.

Further, both ECI and ECD declined in the fifth instar where maximum tissue growth takes place. The longer span and maximum consumption of food during this instar (80.13% of the total consumption) was perhaps responsible for the high rate of tissue growth in spite of the decline in ECI and ECD. The fall of ECI and ECD in the fifth instar may be due to the fact that the higher amount of ingested or digested food was metabolised for maintenance of the body and lesser amount was used for tissue growth.

REFERENCES

- BAILEY C. C. (1976) A quantitative study of consumption and utilization of various diets in the bertha armyworm *Manestra configurata* (Lep.: Noct.) Can. Entomol., 108, 1319-1326.
- BARAH A., GOSWAMI M. C. & SAMSON M. V. (1989) Consumption and utilization of food in different instars of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim Sci.), 98, 99-103.
- BENCHAMIN K. V. & JOLLY M. S. (1984) Studies on ingestion, digestion and conversion efficiency in polyvoltine and bivoltine silkworm breeds (*B. mori* L.). Proceedings, III Oriental Entomological Symposium. Feb. 21-24 Trivandrum, 2, 195-206.
- EVANS A. C. (1939) The utilization of food by certain Lepidopterous insects. Trans. R. Entomol. Soc. London, 89, 13-22.
- HORIE Y. & WATANABE K. (1983) Daily utilization of food by certain Lepidopterous insects. Trans. R. Entomol. Soc. London, 89, 13-22.
- HORIE Y. & WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter in food by the silkworm *B. mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) Appl. Entomol. Zool., 18, 70-80.
- JOSHI K. L. (1984) Sex specific consumption and utilisation of food by Eri silkmoth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Satur.), Sericologia, 24, 21-24.
- JOSHI K. L. (1985a) Relationship between food consumption and fecundity of Eri silkmoth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Satur.) Sericologia, 25, 301-305.
- JOSHI K. L. (1985b) Studies on the growth indices for Eri silkmoth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Satur.) Sericologia, 25, 313-319.
- LATHEEF M. A. & HARCOURT D. C. (1972) Quantitative study of food consumption, assimilation and growth in *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chysom.) on two host plants. Can. Entomol., 104, 1271-1278.
- MUKHERJI M. K. & GUPPY J. C. (1970) Quantitative study of food consumption and growth in *Pseudaletia unipuncta* (Lep.: Noct.) Can. Entomol., 102, 1179-1188.
- NARAYANANPRAKASH R., PERIASAMY K. & RADHAKRISHNAN S. (1985) Effect of dietary water content on food utilization and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) Indian J. Seric., 24, 12-17.
- PANT R., RAMANA D. & SARKAR A. (1986) Consumption and utilisation of food in *Philosamia ricini* larva during development. Sericologia, 26, 49-54.
- PERIASAMY K. & RADHAKRISHNAN S. (1985) A quantitative study of food utilization and silk production in *Bombyx mori* L. for evaluation of superior varieties of mulberry, Sericologia, 25, 491-500.
- PERIASAMY K., NARAYANANPRAKASH R. & RADHAKRISHNAN S. (1984) Food utilisation in exotic and indigenous races of *Bombyx mori* L. (Lep.: Bombycidae). Sericologia, 24, 43-50.
- PETRUSEWICZ K. & MAC FAYDEN A. (1970) Productivity of terrestrial animals. IPB Handbook. Oxford and Edimburg Blackwell Scientific Publications, 13, 190.
- RANA, B., PRASAD B. & NIGAM M. P. (1987) Consumption and utilization of food by oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturnidae) Sericologia, 27, 11-19.

- REDDY M. V. & ALFRED J. R. B. (1979) Utilization of castor, *Ricinus communis* Linn. leaves by the last instar larvae of the silkworm. *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Sat.) Indian Biologist, 2, 35-40.
- SINHA U.S.P., BAJPAYEE C. M. & SINHA S. S. (1997) Consumption and utilization of *Shorea robusta* leaves in different instars of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Geobios new Reports, 16, 97-102.
- SUDO M., SHO Y. & OKAJIMA T. (1979) The relation between the leaf quality at different leaf order and silkworm growth and cocoon quality (1). J. Seric. Sci. Jpn., 50, 439-443.
- SUDO M., SHO Y. & OKAJIMA T. (1981) The relation between the leaf quality at different leaf order and silkworm growth and cocoon quality (2). J. Seric. Sci. Jpn., 50, 306-310.
- WALDBAUER C. P. (1964) The consumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan) (Lep.: Sphin.) Ent. Ext. Appl., 7, 253-269.
- WALDBAUER C. P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Advance Insect Physiol., 5, 229-288.

ETUDES QUANTITATIVES SUR LA CONSOMMATION ET L'UTILISATION DE FEUILLES DE *TERMINALIA TOMENTOSA* PAR LES LARVES *LARIA*

U. S. P. SINHA*, S. K. MATHUR, A. K. SINHA & B. N. BRAHMACHARI

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303 (Bihar), Inde.

Nous avons étudié quantitativement la consommation et l'utilisation de nourriture pendant différents stades larvaires grâce à un essai de nourrissage avec le feuillage de *Terminalia tomentosa* sur l'eco-race *Laria* du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury. Pendant sa durée larvaire de 42 jours, la consommation totale moyenne d'une larve est de 136,713 g dont 80,518 g sont assimilés par l'insecte. La quantité de nourriture consommée augmente au fur et à mesure que les larves avancent en âge et atteint son sommet au cinquième âge (80,13 % de la consommation totale). On trouve que l'assimilation et la croissance des tissus sont positivement corrélées avec la consommation et la maturité des larves. Avec l'avancement en âge, la digestibilité approximative baisse tandis que l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée augmente jusqu'au 4^{ème} âge et baisse après au 5^{ème} âge.

INTRODUCTION

Bien que les aspects nutritionnels qualitatifs de la nutrition de l'insecte aient beaucoup attiré l'attention, tout ce qui concerne les aspects quantitatifs a été négligé du moins avant la revue détaillée de Waldbauer (1968). Sudo et coll., (1979, 1981), Joshi (1984, 1985 a et b), Periasamy et coll., (1984), Periasamy & Radhakrishnan (1985), Narayananprakash et coll., (1985) et Pant et coll., (1986) ont réalisé une étude sur l'utilisation de nourriture par les vers à soie, *Bombyx mori* L. et *Philosamia ricini* Hutt. Récemment, Sinha et coll., (1997) ont fait des recherches sur la consommation et l'utilisation de feuilles de *Shorea robusta* à différents âges chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta*.

L'étude actuelle a été réalisée en raison du manque d'informations sur les aspects nutritionnels quantitatifs d'une écorace importante de *A. mylitta* (*Laria*), que l'on trouve dans le Bihar et dans le Madhya Pradesh et qui est exploitée pour l'élevage en masse du ver à soie tasar tropical par les fermiers.

MATERIELS ET METHODES

Les larves saines de l'écorace *Laria* de *A. mylitta* sont élevées en intérieur du premier au cinquième âge sur des feuilles de *T. tomentosa* pendant la deuxième saison d'élevage (septembre – novembre) d'après la méthode décrite par Rana et coll., (1987). Quatre répétitions de cinquante larves chacune sont maintenues pendant le stade larvaire, de la levée jusqu'à la fin de l'élevage. Un lot parallèle de vers à soie est élevé dans des conditions identiques pour remplacer les larves faibles et mortes au cours de l'étude. De plus, un lot témoin de feuilles identique à celui donné en nourriture aux vers est maintenu pour déterminer la perte en poids des feuilles due au dessèchement. Les quantités

* Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Jamuguri, Rowrah, Jorhat 785 005 (Assam), Inde.

consommées, évacuées et le poids larvaire sont mesurés et enregistrés sauf pendant la période de mue. On utilise la méthode gravimétrique de Waldbauer (1968) pour l'évaluation de la consommation quotidienne de nourriture par les larves.

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

RESULTATS ET DISCUSSION

La quantité de nourriture consommée, évacuée, assimilée, la croissance des tissus et la nourriture oxydée pendant tous les stades larvaires sont présentées dans le Tableau I. Il est évident d'après ce tableau que la consommation moyenne totale par une larve est de 136,713 g. Au cours du processus de croissance naturelle des larves, la quantité de nourriture consommée augmente du premier au cinquième âge. La consommation est maximum pendant le cinquième âge, soit 80,13 % de la consommation totale. Rana et coll., (1987) ont fait part d'observations similaires (1987) chez *Antheraea proylei* et Barah et coll., (1989) chez *Antheraea assama*.

Chez les insectes, l'assimilation est la quantité totale de nourriture disponible pour être incorporée comme substances corporelles ou pour être métabolisés pour l'énergie (Reddy et Alfred, 1979). L'assimilation est la plus élevée au cours du 5^{ème} âge (77,44 %) et s'avère être liée à la quantité de nourriture consommée. Cette observation est en accord avec celles de Barah et coll., (1989). Il est aussi clair d'après les données qu'il existe une corrélation directe entre la croissance des tissus et l'âge des larves. La croissance des tissus s'avère aussi être positivement liée à la quantité de nourriture consommée (Figs 1 & 2) et s'avère maximum (65,78 %) chez les larves du cinquième âge. Le poids larvaire moyen des larves matures du 5^{ème} âge s'élève à 24,850 g.

Les trois paramètres primaires de digestibilité physiologique nutritionnelle, l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) en substances corporelles sont présentés dans le Tableau II. Il est évident d'après le tableau que la digestibilité approximative (AD) est la plus élevée (75,19 %) chez les larves du premier âge, elle baisse progressivement avec l'avancement en âge et atteint la valeur la plus faible (56,19 %) chez les larves du 5^{ème} âge. Des observations similaires ont été signalées chez *B. mori* (Horie & Watanabe, 1983 ; Benhamin et Jolly, 1984), chez *A. proylei* (Rana et coll., 1987) et chez certains autres insectes lépidoptères (Waldbauer, 1968). Selon Waldbauer (1964) la digestibilité est affectée par un régime déséquilibré ou une teneur élevée en fibres brutes dans la nourriture. L'AD la plus élevée aux premiers âges pourrait être due au fait que les jeunes larves se nourrissent de manière sélective et se nourrissent sur des feuilles jeunes et succulentes contenant une faible teneur en fibres brutes, qui est facile à digérer, tandis que les larves du dernier âge ingèrent aussi des feuilles matures avec des nervures dans lesquelles la teneur en fibres brutes est élevée. Cela entraîne la baisse de la digestibilité approximative. La valeur moyenne totale de l'AD pour les cinq stades larvaires chez les larves *Laria* nourries sur *T. tomentosa* sur la base du poids frais s'avère être de 69,30 % tandis que chez *A. proylei*, elle est de 71 % (Rana et coll., 1987). Sinha et coll., (1997) ont signalé que la valeur est de 67,61 % chez *A. mylitta* nourrie sur *S. robusta*.

Il est aussi évident d'après le Tableau II que l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et digérée (ECD) en substances corporelles augmente du premier au quatrième âge et puis décline au cinquième âge. Un certain nombre d'autres chercheurs ont trouvé la même tendance de hausse et de baisse de l'ECI et de l'ECD chez différents insectes (Mukherji & Guppy, 1970 ; Latheef & Harcourt, 1972 ; Bailey, 1976). La valeur plus faible de l'ECI et de l'ECD aux premiers âges est peut être due au fait qu'une plus petite part de la nourriture ingérée ou digérée est utilisée pour la croissance des tissus et une plus grande portion pour son entretien. Pendant les âges III et IV, le taux métabolique est plus élevé que pendant les âges I & II et ainsi, il y a plus de nourriture ingérée ou digérée disponible pour la conversion en tissus corporels. La valeur moyenne totale de l'ECI pendant

la période larvaire totale est de 22,72 %. Waldbauer (1968) a trouvé que la même valeur s'élevait entre 20 et 30 % chez *Menduca sexta* (1968) et entre 22 à 23 % chez les larves matures de *B. mori* (Horie et Watanabe, 1983). La valeur moyenne totale de l'ECD est de 32,79 % chez les larves *Larva* nourries sur *T. tomentosa*, tandis que l'ECD chez *A. proylei* nourrie sur *Quercus serrata* est de 34 % (Rana et coll., 1987). Sinha et coll., (1997) ont rapporté que cette valeur est de 31,08 % chez *A. mylitta* nourrie sur *S. robusta*.

De plus, l'ECI et l'ECD baissent au cinquième âge lorsque la croissance maximum des tissus a lieu. La plus longue durée et la consommation maximum de nourriture pendant cet âge (80,13 % de la consommation totale) sont peut-être responsables du taux élevé de croissance des tissus malgré la baisse de l'ECI et de l'ECD. La baisse de l'ECI et de l'ECD pendant le cinquième âge pourrait être due au fait qu'une plus grande quantité de nourriture ingérée ou digérée est métabolisée pour l'entretien du corps et qu'une moins grande quantité est utilisée pour la croissance des tissus.

A REPEATABLE PROTOCOL FOR THE PRODUCTION OF GYNOGENIC HAPLOID PLANTS IN MULBERRY

R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH*

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

*Haploid plants have been obtained from unpollinated Gynoecium of mulberry variety – S₅₄ cultured **in vitro** as here reported for the first time. The shoot primordia and multiple shoots were produced after 4 and 8 weeks of explant culture respectively on LS + BAP (2 mg/l) + Kn (1 mg/l). Callus was not formed at any step of the process. The well developed gynogenic multiple shoots were transferred to rooting medium LS + BAP (2 mg/l) + NAA (1 mg/l). The gynogenic plants have been established in soil. The gynogenic plants were screened cytologically and they showed the haploid number of chromosomes $n = 14$ in their root tips. Further confirmation of ploidy level was made in these gynogenic haploid plants by counting the number of chloroplasts in the stomatal guard cells which showed 8 chloroplasts.*

Keywords: Mulberry, haploids, gynoecium culture, gynogenic plants.

Abbreviation: LS – Lindsmaier & Skoog's medium.

BAP – 6-Benzyl Amino Purine.

Kn – Kinetin.

NAA – 1-Naphthalene acetic acid.

HgCl₂ – Mercuric chloride.

HCl – Hydrochloric acid.

INTRODUCTION

Mulberry is a woody plant of considerable economic importance in sericulture industry due to its foliage, which constitutes the chief food for the silkworm, *Bombyx mori* L. The highly heterozygous perennial nature of the plant coupled with prolonged juvenile period limits the speed of the improvement in this crop. Moreover, in vegetatively propagated plants like mulberry it takes many years to evolve a clone with desirable economic and commercial traits through conventional hybridisation techniques (Ravindran *et al.*, 1988). Production of homozygous lines of mulberry by inbreeding is not possible because of its dioecious nature, the male and female lines being genetically diverse (Dennis Thomas *et al.*, 1999). Anther culture has failed or given unsatisfactory results in producing haploids in the tree crops (Cappadocia and Vieth, 1990; Sethi *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1996). In this paper, we report a reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of a high yielding cultivar S₅₄ of *Morus indica* L. using gynoecium from *in vivo* developed inflorescences to be used in mulberry improvement program in future.

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

MATERIAL AND METHODS

Mature and unpollinated inflorescences of *Morus indica* L. Cv. S54, a popular beneficial mutant bearing dioecious flowers, were used as the source material collected from the mulberry germplasm bank, Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore.

The branches containing young female one-week-old inflorescence were bagged with polythene covers to avoid pollination. After 2-3 weeks, the polythene covers were removed and the mature unpollinated female inflorescences were collected, washed thoroughly in 5% (v/v) Laboline solution, given a rinse in 70% Ethanol for 30 seconds, surface sterilised in 0.1% Mercuric chloride (HgCl_2) for 3 minutes and rinsed several times in sterile water to remove traces of HgCl_2 . Then, the individual gynoeceum was separated from the mature unpollinated female inflorescence, bracts were removed and were inoculated on LS medium supplemented with BAP (2 mg / l) and Kn (1 mg / l). These cultures were maintained in a culture room at a temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a light intensity of 3000 lux, and a Relative Humidity (RH) between 55-60%.

Root tips from *in vitro* raised gynogenic plants were collected, rinsed in tap water and treated in 0.02% 8-hydroxyquinoline at 4°C for 3 hrs. The roots were fixed in modified Carnoy's fluid, containing absolute alcohol: chloroform: glacial acetic acid (6:4:1) for 24 hrs. The fixed root tips were placed in a mixture of 9 drops of 2% aceto-orcein and 1 drop of 1N HCl in a watch glass and warmed. After cooling, the individual root tips were placed in a drop of aceto-orcein on a glass slide and squashed. The slides were screened to confirm the chromosome number.

Figures showing the production of gynogenic haploid plants of mulberry *Morus indica* L. cv. S54

Figures présentant la production de plants haploïdes gynogéniques chez le mûrier *Morus indica* L. cv. S54.

Fig. 1. The unpollinated gynoeceum explant at culture on LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 1. L'explant du gynécée non pollinisé cultivé sur LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 2. Bulging of unpollinated gynoeceum explant on LSBM + BAP (2 mg/l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 2. Renglement de l'explant du gynécée non pollinisé sur LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 3. Shoot initiation from enlarged ovaries on LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 3. Début de pousse à partir d'ovaires grossis sur LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 4. Gynogenic multiple shoots of Cv. S54 on LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg/l).

Fig. 4. Pousses gynogéniques multiples du Cv. S54 sur LSBM + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l).

Fig. 5. Rooted gynogenic multiple shoots on LSBM + BAP (2 mg / l) + NAA (1 mg / l).

Fig. 5. Pousses gynogéniques multiples racinées sur du LSBM + BAP (2 mg / l) + NAA (1 mg / l).

Fig. 6. Hardening of *in vitro* gynogenic haploid plant.

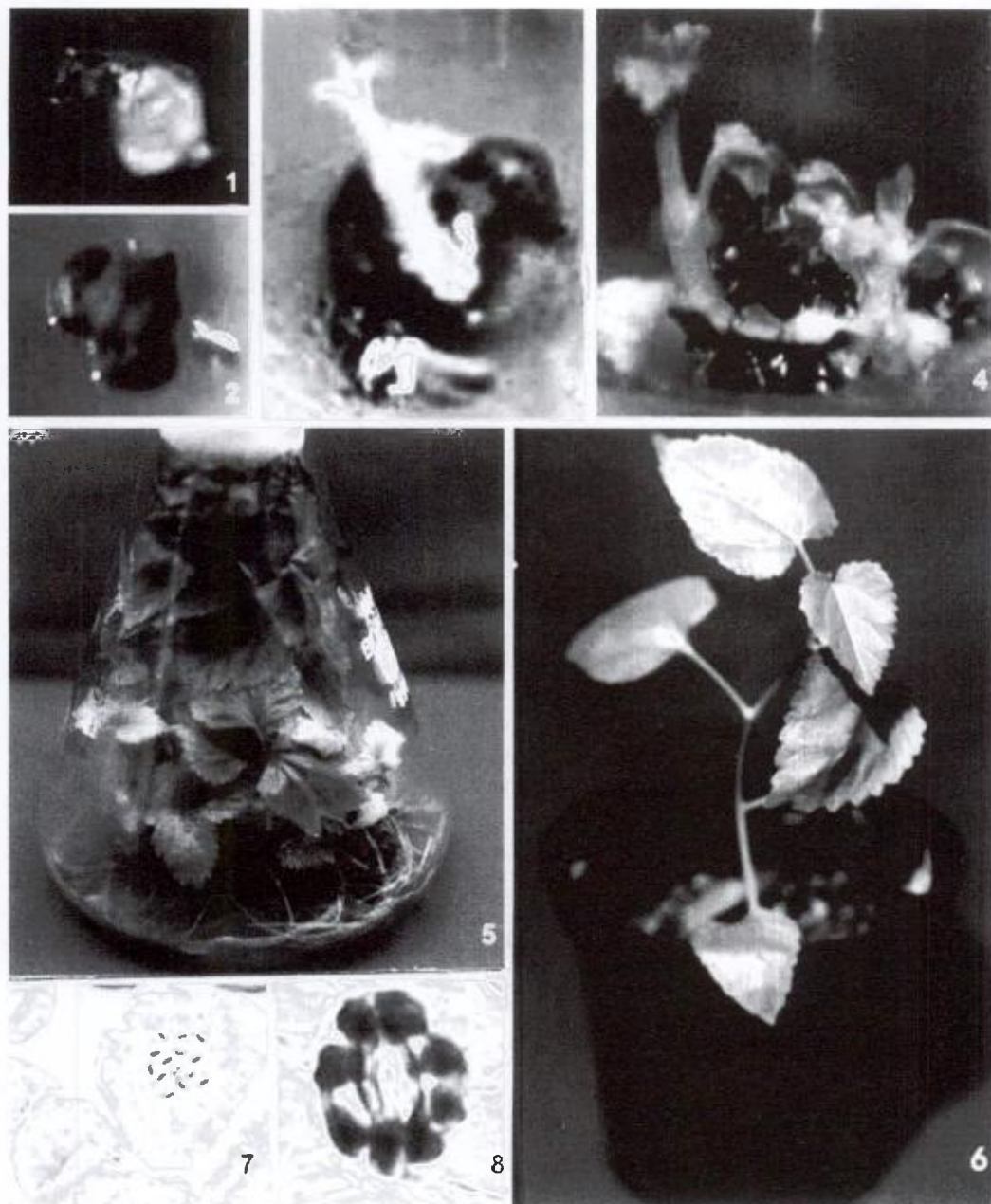
Fig. 6. Durcissement d'une plante haploïde gynogénique *in vitro*.

Fig. 7. Root tip cell showing haploid number of chromosomes $n = 14$.

Fig. 7. Cellule du sommet de la racine présentant un nombre haploïde de chromosomes $n = 14$.

Fig. 8. Stomatal guard cells showing 8 chloroplasts.

Fig. 8. Cellules stomatales de garde présentant 8 chloroplastes.



The ploidy level was determined by counting the number of chloroplasts in stomatal guard cells. The lower epidermis of young leaves were stripped and stained with Lugol's iodine solution. The number of chloroplasts was counted in each guard cell.

RESULTS

The unpollinated gynoeceium explant (Fig. 1) bulged within 2 weeks on LS medium supplemented with BAP (2 mg/l) and Kn (1 mg/l) (Fig. 2). The maximum response of shoot initiation from the enlarged ovaries was observed after 4 weeks of culture (Fig. 3). The 4 weeks old cultures were transferred to fresh medium and by 8 weeks the ovaries produced gynogenic multiple shoots (Fig. 4). The well-developed gynogenic multiple shoots were transferred for rooting on LS medium supplemented with BAP (2 mg/l) and NAA (1 mg/l) (Fig. 5). After successful rooting the gynogenic plantlets were transferred to net pots containing potting mixture peat:perlite:sand in the ratio 50:25:25 for hardening (Fig. 6). Hardened gynogenic plants were transferred to soil. Of the 25 gynogenic plants transferred to soil, 16 survived (64%).

It was observed in the responding cultures that the plantlets emerged from the ovaries after 4 weeks of individual gynoeceium culture. The ovary wall had turned brown and shrivelled without any callus phase. It was observed that the shoot buds originate from the unfertilised ovules.

The gynogenic plants were used for ploidy determination. The chromosome counts were made using root tip of each gynogenic plant. Of the 16 plants which survived, 12 plants showed haploid number of chromosomes $n = 14$ (Fig. 7). In the other 4 plants the chromosome number varied in different cells. None of the plants showed diploid number of chromosomes in their root tips.

The ploidy level was determined by counting the number of chloroplasts in stomatal guard cells. The gynogenic haploids of Cv S54 have 8 chloroplasts in the two guard cells of the stomata (Fig. 8) whereas diploids have 12-14 chloroplasts.

DISCUSSION

In the last two decades, efforts have been made in the field of *in vitro* induction of haploids in many crop species, vegetables, angiospermic and gymnospermic trees (Prakash and Suresh Chand, 1999). *In vitro* cultures of ovaries and ovules showed tremendous impact in successful production of haploid plants. The first report on *in vitro* induction of gynogenic haploids was achieved in Barley by San Nœum (1976). This approach to produce haploids has gained merit over anther culture for the plants where the latter techniques has been non productive (Bhojwani and Razdan, 1996). Further, few reports are available on gynogenic haploids in angiospermic tree species. (Wu and Xu, 1984; Chen *et al.*, 1987; Lakshmisita and Ravindran, 1991; Dennis Thomas *et al.*, 1999).

In the present study, the *in vitro* cultures of individual *in vivo* unpollinated gynoeceium of *Morus indica* L. Cv S54 revealed fast growth of the ovary and by 8 weeks the ovary give rise to gynogenic multiple shoots. This agrees with the findings of Dennis Thomas *et al.*, (1999) who reported the gynogenic plants from *in vitro* inflorescence in *Morus alba* Cv Kanva-2.

They have also suggested, that for the female clones of mulberry cultivars this is the only possible approach to raise haploids because inbreeding and anther cultures are not applicable.

The gynogenic plants were screened cytologically, none of the gynogenic plants were found to be diploids $2n = 28$, they were either haploids with 14 chromosomes or aneuploids with 13 or 17 chromosomes. This agrees with the findings of Dennis Thomas *et al.*, (1999) in Cv Kanva-2.

The above findings were further supported by the number of chloroplasts in stomatal guard cells. It was found in Cv S54 gynogenic haploids have 8 chloroplasts in the 2 guard cells of the stomata (each guard cell contain 4 chloroplasts) whereas diploids have 12-14 chloroplasts. This agrees with the findings of Marylise Doctrinal *et al.*, (1989) in *Beta vulgaris*.

In conclusion, the protocol described in this paper is reproducible and we have been able to produce a large number of haploid gynogenic plants as described in the study and it will definitely facilitate the utilisation of this technique in mulberry breeding programmes.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial assistance given by Council for Scientific and Industrial Research (CSIR) to one of the authors Kavyashree R., is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BHOJWANI S. S. & RAZDAN M. K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, A revised edition, Elsevier, Amsterdam, pp 767.
- CAPPADOCIA M. & VIETH J. (1990) *Gerbera Jamesonii* H. Bolus ex Hook : *In vitro* production of Agriculture and Forestry: Haploids in crop improvement 1, Vol. 12, Y. P. S. Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin pp. 417-427.
- CHEN Z., WENBIN L., LIHUA Z., XUEN X. & SHIJIE Z. (1987) Production of haploid plantlets in cultures of unpollinated ovule of *Hevea brasiliensis* Muell-Arg In: Somatic Cell Genetics of Woody Plants, M. R. Ahuja (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 39-42.
- DENNIS THOMAS T., BHATNAGAR A. K., RAZDAN M. K. & BHOJWANI S. S. 1999. A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba* L. Euphytica 110 : 169-173.
- JAIN A. K., SARKAR A., & DATTA R. K. 1996. Induction of haploid callus and embryogenesis in *in vitro* cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 143-147.
- LAKSHMISITA G. & RAVINDRAN S. (1991) Gynogenic plants from ovary cultures of mulberry (*Morus indica*). In: Horticulture: New Technologies and Applications, J. Prakash & Pirek, R. L. M. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 225-229.
- MARYLISE DOCTRINAL, RAJBIR S. SANGWAN & BRIGITTE S. SANGWAN-NORREEL. 1989 *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 17: 1-12.
- PRAKASH D.V.S.S.R. & SURESH CHAND 1999. Gynogenic haploids – Problems and perspectives: Ovary culture of *Boswellia serrata* Roxb. (Burseraceae). In: Irfan A. Khan & Atiya Khanum (Eds). Role of biotechnology in medicinal and aromatic plants. Vol. II, Ukaaz publications, 185-197.
- SAN NOEUM L. H. 1976. Haploids de *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* non fécondes. Ann Amélior Plant 26: 751-754.
- SETHI M., BOSE S., KAPUR A. & RANGASWAMY N. S. 1992. Embryo differentiation in anther cultures of mulberry. Ind J. Exp. Biol 30: 146-148.

UN PROTOCOLE REPRODUCTIBLE DE PRODUCTION DE PLANTS GYNOGENIQUES HAPLOIDES CHEZ LE MURIER

R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH*

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

Nous avons obtenu pour la première fois des plants haploïdes à partir du gynécée d'une variété de mûrier non pollinisée S54 cultivé in vitro. Les ébauches de pousses et les pousses multiples apparaissent après 4 et 8 semaines de culture des explants respectivement sur LS + BAP (2 mg / l) + Kn (1 mg / l). Le cal ne se forme à aucune étape du processus. Les pousses gynogéniques multiples bien développées ont été transférées dans un milieu de racinement LS + BAP (2 mg / l) + NAA (1 mg / l). Les plants gynogéniques ont été plantés dans le sol. Les plants gynogéniques ont été triés cytologiquement et ils présentent le nombre haploïde de chromosomes $n = 14$ aux extrémités des racines. Le compte du nombre des chloroplastes dans les cellules stomatiques qui présentent 8 chloroplastes confirme le niveau de ploïdie.

Abréviations :

LS – Milieu Lindsmaier & Skoog.

BAP –6 – Benzyl Amino Purine.

Kn – Kinétine.

NAA –1 –Acide naphthalène acétique.

HgCl₂ –Chlorure de mercure.

HCL – Acide chlorhydrique.

INTRODUCTION

Le mûrier est une plante ligneuse dont l'importance économique est considérable pour l'industrie séricicole à cause de son feuillage, qui constitue la nourriture principale du ver à soie *Bombyx mori* L. La nature vivace très hétérozygote du plant associée à une période juvénile prolongée limite la vitesse d'amélioration de cette culture. De plus, avec les techniques d'hybridation conventionnelles chez les plants multipliés de manière végétative, cela prend des années pour mettre au point un clone avec des traits économiques et commerciaux désirables (Ravindran et coll., 1988). La production de lignées homozygotes du mûrier par croisements consanguins n'est pas possible à cause de sa nature dioïque, les lignées mâles et femelles étant génétiquement différentes (Dennis Thomas et coll., 1999). La culture des anthères a échoué ou donné des résultats peu satisfaisants pour produire des haploïdes dans les cultures d'arbres (Cappadocia et Vieth, 1990 ; Sethi et coll., 1992 ; Jain et coll., 1996). Dans cet article, nous présentons un protocole pouvant être répété pour la production d'haploïdes gynogéniques d'un cultivar à haut rendement (S54) de *Morus indica* L. utilisant le gynécée d'inflorescences développées *in vivo* pour pouvoir l'utiliser dans un programme d'amélioration du mûrier dans le futur.

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

MATERIEL ET METHODES

Les inflorescences matures et non pollinisées du Cv. S54 de *Morus indica* L., un mutant populaire favorable portant des fleurs dioïques, sont utilisées comme matériau source recueilli à la banque des germoplasmes du mûrier, au Département de Sériciculture de l'Université de Bangalore, à Bangalore.

Les branches contenant de jeunes inflorescences femelles d'une semaine sont enveloppées avec des enveloppes en polyéthylène pour éviter la pollinisation. Après 2 à 3 semaines, les enveloppes en polyéthylène sont enlevées et les inflorescences femelles matures non pollinisées sont recueillies, lavées soigneusement dans une solution de Laboline à 5 % (v/v), rincées dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, stérilisées en surface dans du chlorure de mercure à 0,1 % (HgCl₂) pendant 3 minutes et rincées plusieurs fois dans de l'eau stérile pour enlever les traces d'HgCl₂. Puis, le gynécée individuel est séparé de l'inflorescence mature non pollinisée, les bractées sont enlevées et sont inoculées sur du milieu LS additionné avec du BAP (2 mg / l) et du Kn (1 mg / l). Ces cultures sont maintenues dans une pièce de culture à une température de 25 ± 2° C avec une intensité lumineuse de 3000 lux et une humidité relative (RH) entre 55-60 %.

Les extrémités des racines des plants gynogéniques cultivés *in vitro* sont recueillies, rincées dans de l'eau du robinet et traitées avec de l'hydroxyquinoléine-8 à 0,02 % à 4° C pendant 3 h. Les racines sont fixées dans du Carnoy modifié, contenant de l'alcool absolu, du chloroforme et de l'acide acétique glacial (6 : 4 : 1) pendant 24 hrs. Les bouts des racines fixés sont placés dans un mélange de 9 gouttes d'orcéine acétique à 2 % et 1 goutte de HCl 1N dans un verre puis chauffés. Après refroidissement, les bouts des racines sont placés dans une goutte d'orcéine acétique sur une lame de verre et écrasés. Les lames sont observées pour confirmer le nombre de chromosomes.

Le niveau de ploïdie est déterminé en comptant le nombre de chloroplastes dans les cellules stomatiques. L'épiderme le plus bas des feuilles jeunes est retiré et coloré avec une solution de iodure de Lugol. Le nombre de chloroplastes est compté dans chaque cellule stomatique.

RESULTATS

L'explant du gynécée non pollinisé (Fig. 1) gonfle en l'espace de deux semaines sur du milieu LS additionné de BAP (2 mg / l) et de Kn (1 mg / l) (Fig. 2). On observe une réponse maximum pour l'initiation des cultures à partir des ovaires agrandies après 4 semaines de culture (Fig. 3). Les cultures de 4 semaines sont transférées dans un milieu frais et au bout de 8 semaines les ovaires produisent des pousses multiples gynogéniques (Fig. 4).

Les pousses multiples gynogéniques bien développées sont transférées pour le racinement sur du milieu LS additionné avec du BAP (2 mg / l) et du NAA (1 mg / l) (Fig. 5). Après un racinement réussi, les plantules gynogéniques sont transférés dans des pots contenant un mélange de tourbe : perlite : sable dans un rapport 50 : 25 : 25 pour le durcissement (Fig. 6). Les plants gynogéniques durcis sont transférés dans du sable. Sur les 25 plants gynogéniques transférés dans le sable, 16 ont survécu (64 %).

On observe dans les cultures répondantes que les plants émergent des ovaires après 4 semaines de culture individuelle du gynécée. La paroi de l'ovaire devient marron et se ratatine sans phase de cal. On observe que les bourgeons des pousses proviennent des ovules non fertilisés.

Les plants gynogéniques sont utilisés pour la détermination de la ploïdie. Les comptes de chromosomes sont faits en utilisant le bout de la racine de chaque plant gynogénique. Sur les 16 plants qui survivent, 12 plants présentent un nombre haploïde de chromosomes $n = 14$ (Fig. 7). Chez les 4 autres plants, le nombre de chromosomes varie dans différentes cellules. Aucune des plantes ne montre un nombre diploïde de chromosomes au bout de leurs racines.

Le niveau de ploïdie est déterminé en comptant le nombre de chloroplastes dans les cellules stomatiques. Les haploïdes gynogéniques du Cv S54 ont 8 chloroplastes dans les deux cellules gardes des stomates (Fig. 8) tandis que les diploïdes ont 12 à 14 chloroplastes.

DISCUSSION

Pendant les dernières décennies, des efforts ont été faits dans le domaine de l'induction *in vitro* d'haploïdes chez de nombreuses espèces de cultures, de légumes, d'arbres angiospermes et gymnospermes (Prakash et Suresh Chand, 1999). Les cultures *in vitro* des ovaires et des ovules ont un impact très important par rapport à la production réussie de plants haploïdes. La première induction *in vitro* d'haploïdes gynogéniques a été réalisée chez l'orge par San Noeum (1976). Cette approche pour produire des haploïdes a pris le pas sur la culture d'anthères chez les plants où ces dernières techniques ne sont pas productives (Bhojwani et Razdan, 1996). De plus, il existe peu de rapports sur les haploïdes gynogéniques chez les espèces d'arbres angiospermes (Wu et Xu, 1984 ; Chen et coll., 1987 ; Lakshmisita et Ravindran, 1991 ; Dennis Thomas et coll., 1999).

Dans l'étude actuelle, les cultures *in vitro* du gynécée non pollinisé *in vivo* de *Morus indica* L. du cv. S54 révèlent une croissance rapide de l'ovaire et au bout de 8 semaines l'ovaire donne naissance à des pousses multiples gynogéniques. Cela confirme les observations de Dennis Thomas et coll., (1999) qui ont observé des plants gynogéniques à partir d'inflorescences *in vitro* du Cv. Kanva-2 de *Morus alba*.

Ils ont aussi suggéré que les clones femelles des cultivars de mûrier sont la seule façon de cultiver des haploïdes parce qu'on ne peut pas avoir recours à la culture consanguine et aux cultures d'anthères.

Les plants gynogéniques screenés cytologiquement ne montrent aucun plant gynogénique qui soit diploïde $2n = 28$; ils sont soit haploïdes avec 14 chromosomes ou aneuploïdes avec 13 ou 17 chromosomes. Cela confirme les observations de Dennis Thomas et coll., (1999) chez le Cv. Kanva-2.

Les observations ci-dessus sont de plus confirmées par le nombre de chloroplastes dans les cellules stomatiques. Il s'avère que chez le Cv. S54 les haploïdes gynogéniques ont 8 chloroplastes dans les 2 cellules gardes des stomates (chaque cellule de garde contient 4 chloroplastes) tandis que les diploïdes ont 12 à 14 chloroplastes. Cela confirme les observations de Marylise Doctrinal et coll., (1989) chez *Beta vulgaris*.

En conclusion, le protocole décrit dans cet article peut être reproduit et nous avons pu produire un grand nombre de plants gynogéniques haploïdes tels qu'ils sont décrits dans l'étude. Cela facilitera manifestement l'utilisation de cette technique dans les programmes de lignage du mûrier.

