

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*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
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*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Mini-revue / Mini-review

- Progress of silkworm breeding in China** 1
 Progrès du *breeding* chez le ver à soie en Chine 13
 ZHAO YUAN

Article scientifique / Scientific paper

- Infection behaviour of conidia of *Myrothecium roridum* on mulberry leaf and cytological changes of leaf cells infected with the fungus** 19
 Comportement d'infestation des conidies de *Myrothecium roridum* sur la feuille de mûrier et changements cytologiques dans les cellules foliaires infestées par le champignon 33
 RITSUKO MURAKAMI, HIROMU KAWAKITA & AKIRA SHIRATA

Rapports techniques / Technical reports

- Root mealy bug (*Paraputo* sp.) of mulberry in Darjeeling hills – its severity, biology and control** 39
 La cochenille de la racine du mûrier (*Paraputo* sp.) dans les collines du Darjeeling : sévérité, biologie et contrôle 49
 SUBRATA BISWAS, D. DAS, S. CHATTOPADHYAY, S. K. DAS & K. MANDAL

- Study on nutrient deficiency in mulberry variety S36 under field conditions** 53
 Etude sur le terrain de la carence en nutriments chez la variété de mûrier S36 59
 N. R. SINGHVI, J. KODANDARAMAIAH, M. MUNIRATHNAM REDDY,
 R. S. KATIYAR, A. SARKAR & R. K. DATTA

- Influence of foliar spray of Daman Penshibao on quality and bio-chemical composition of mulberry** 63
 Effet de la vaporisation foliaire de Daman Penshibao sur la qualité et la composition biochimique du mûrier 71
 B. L. JYOTHI, R. GOVINDAN, R. N. BHASKAR & B. SANNAPA

- In vitro* regeneration of plants from mature nodal segments of *Terminalia arjuna* Bedd.** 75
 Regeneration *in vitro* de plants à partir de segments nodaux de *Terminalia arjuna* Bedd. 81
 M. RAMESH, U. PAVAN, S. SHYAM PRASAD, A. V. RAO & A. SADANANDAM

Notes brèves / Brief notes

- Impact of UV-light on biochemical composition of the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf** 85
 Impact de la lumière UV sur la composition biochimique de la glande séricigène du ver à soie, *Bombyx mori* L. nourri sur de la feuille de mûrier 93
 A. BHARATHI & MIAO YUNGEN

Biological control of uzifly, <i>Blepharipa zebina</i> Walker, (Diptera: Tachinidae) infesting tasar silkworm, <i>Antheraea mylitta</i> Drury	97
Lutte biologique contre la mouche uzi, <i>Blepharipa zebina</i> Walker, (Diptera: Tachinidae) infestant le ver à soie tasar, <i>Antheraea mylitta</i> Drury	103
RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU	

A new microsporidiosis occurring in larvae of <i>Antheraea pernyi</i> (Lepidoptera: Saturniidae) released on an oak tree, <i>Quercus acutissima</i> and a possible insect-vector, <i>Lepidogma kiiensis</i> (Lepidoptera: pyralidae) inhabiting the same plant	107
Une nouvelle microsporidiose chez les larves de <i>Antheraea pernyi</i> (Lepidoptera : Saturniidae) dispersées sur le chêne, <i>Quercus acutissima</i> et un insecte vecteur probable, <i>Lepidogma kiiensis</i> (Lepidoptera: pyralidae) habitant la même plante	113
S. HAYASAKA, M. NOZAKI, C. YASUNAGA-AOKI, N. TERAMOTO, K. IYAMA, Y. HATAKEYAMA, M. HASHIGUCHI & T. KAWARABATA	

Bibliographie / Bibliography	115
Sériciculture générale / General sericulture	117
Mûrier / Mulberry	121
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	125
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	131
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics	133
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry	137
Vers à soie : œufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology	141
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms: silk glands	143
Soie / Silk	145

PROGRESS OF SILKWORM BREEDING IN CHINA

ZHAO YUAN

(Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 212018, Zhenjiang, Jiangsu Province, China)

This paper introduced the progress of silkworm breeding in China since 1950. The status of silkworm hybrids for spring rearing, summer-autumn rearing, spring and autumn rearing and some special characteristic was reviewed. The application of biotechnology in silkworm in China was discussed too.

Keywords: Silkworm (*Bombyx mori*); hybrid; breeding; progress

INTRODUCTION

Sericulture has played an important role in the development of human civilization. China has an over 5000-year history of mulberry cultivation and silkworm raising. During the course of gathering silk from nature, silkworm domestication, then sericulture became one important part of agriculture. In the long history, Chinese people gathered deep knowledge and rich experience on the physiology and inheritance breeding in silkworm. Especially in modern times, along with the development of modern genetics, the breeding technology of the silkworm, namely selection on the bases of hybridization was one of the foundations of science. For example, when the Chinese ancient people domesticated the wild silkworm, its cocoon silk layer rate was only about 7%~8%. After several thousands of years of selection, in fact the West Lake Silkworm Science Gallery was founded in 1897, the cocoon silk layer rate of some local varieties such as Zhugui, Xinyuan, Dayuan etc. had been increased to 15%. When the F1 hybrid was firstly used in the early 1930s, the cocoon silk layer rate of Hanguì, Huagui×Hua5 and Hua6 reached 15~16%. Since then, silkworm breeding in China entered a new era (Xiang, 1995).

Since Sun Benzong (1897~1968), the founder of silkworm breeding in China, began to breed sex-limited silkworm races in 1940s, China had made great progress in the breeding of silkworm races to 1980s. The 1990s were the golden era of silkworm breeding in China. A large number of silkworm races for spring rearing, for summer-autumn rearing and for special using was bred (Xiang, 1995; Shen, 1996; Edited by SRI.CAAS 1996, 2000; Wu, 1999). The system of three-stage multiplication (i.e. original silkworm eggs producing farm, parent eggs producing farm and hybrid producing farm) and four-stage eggs production (i.e. original strain of authorized race, original silkworm eggs, parent eggs and hybrid) was adopted in China to ensure the purity and to expedite the popularization of silkworm races.

This paper introduces the advancement of silkworm breeding in China since 1980 in order to strengthen the cooperation and intercommunion between the sericulturists who engaged in silkworm breeding.

1. Progress in breeding commercial silkworm races:

A great improvement in silkworm breeding has been made since 1950. 80 hybrid combinations were bred successively (Shen, 1996; Edited by SRI.CAAS, 1996, 2000; Wu, 1999; Lu, 1998). The representative races of each period are shown in table I and table II.

In 1950s, the dominant commercial silkworm hybrids for spring rearing in Jiangsu and Zhejiang Province were Hua8×Yinghan and Hua9×Louhan, the hybrid for summer-autumn rearing was Huashi × Yingwen. In Sichuan province, the silkworm race for spring and autumn rearing was Hua10(N)×Chuan1. 9baihai× 115nan was the silkworm race for summer-autumn rearing in Guangdong. These races constituted the first generation of commercial silkworm races since the foundation of People's Republic of China.

In 1960s, Su16×Su17 and Huahe×Dongfei were the dominant commercial silkworm races for spring rearing in Jiangsu and Zhejiang Province, the race for summer-autumn was 306 ×Hua10. Sichuan province began to spread Shu10×Nan6 for spring rearing, and because this hybrid combination was proved to show a high heterosis, a strong disease resistance, a high cocoon production and a high-class merit of silk, it was popularized in production rapidly. These hybrids formed the second generation of the silkworm races in China.

Table I. Economic traits of silkworm races for spring rearing in each period

Tableau I. Caractères économiques des races de vers à soie pour l'élevage de printemps à chaque période.

Year	Hybrid	Cocoon Output Per Box (2000 eggs) (kg)	Cocoon Weight (g)	Cocoon Shell Rate (%)	Filament Length (m)	Size (denier)	Unwinding Ratio (%)	Neatness (%)	Raw Silk Rate (%)
<i>Année</i>	<i>Hybride</i>	<i>Production de cocons par boîte (2000 oeufs) (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre (denier)</i>	<i>Rendement dévidage (%)</i>	<i>Netteté (%)</i>	<i>Taux de soie grège (%)</i>
1958~1963	Huajiu×Yinghan	47.77	2.57	20.31	1102	3.4	79.5	89	15.3
1964~1973	Su17×Su16	44.97	2.29	23.09	1344	2.95	80.9	93	18.2
1966~1975	Huahe×Dongfei	48.44	2.48	23.2	1315	3.29	85.5	95	18.9
1973~1987	Su5×Su6	46.74	2.43	25.1	1448	3.14	70.7	95	19.7
1985~1999	Jingsong×Haoyue	46.37	2.26	24.53	1364	2.89	81.61	95	19.32
1988~1998	Chunlei×Zhenzhu	45.30	2.14	24.95	1377	2.78	74.61	95	19.25
1995~1999	871×872	45.36	2.11	24.32	1332	2.91	83.36	95	18.65

Table II. Economic traits of silkworm races for summer-autumn rearing in each period.

Tableau II. Traits économiques chez les races de vers à soie pour l'élevage d'été-automne pour chaque période.

Year	Hybrid	Cocoon Output Per Box (2000 eggs) (kg)	Cocoon Weight (g)	Cocoon Shell Rate (%)	Filament Length (m)	Size (denier)	Unwinding Ratio (%)	Neatness (%)	Raw Silk Rate (%)
<i>Année</i>	<i>Hybride</i>	<i>Production de cocons par boîte (2000 oeufs) (kg)</i>	<i>Poids du cococon (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre (denier)</i>	<i>Rendement dévidage (%)</i>	<i>Netteté (%)</i>	<i>Taux de soie grège (%)</i>
1944~1955	Huashi×Yingwen	89	23.93	17	750	2.7	79	91	11
1960~1969	306×Huashi	92	25.92	18	820	2.4	74	92	12
1970~1979	Dong34×Su12	93	29.91	19	880	2.5	73	92	13
1980~1995	Su3Qiu3×Su4	93	31.90	20.5	990	2.6	75	93	14
1992~1999	Feng1×54A	94	35.09	21.5	1050	2.45	77	94	16
1985~1998	75xin×7532	94	35.49	21.4	1000	2.94	74	94	16
1996~1999	9-fu×7-xiang	94	34.08	21.4	1070	2.78	73	93	15

In 1970s, Su5×Su6, Hang7×Hang8 and Shu13-Su13×Nan6 began to be used as dominant commercial silkworm hybrids for spring rearing. The hybrids for summer-autumn rearing were Dong34×603, Dong34×Su12, XinJing×8301, Zhenong1×Su12, 137×Qiu303 etc.

He Simei (1981) etc. made use of the inheritance and blood difference of 2 races (the silk quantity was emphasized particularly by the Chinese strain, high disease resistance and silk quality were emphasized particularly by the Japanese strain) on the bases of inheritance complementary character and the high disease resistance race Su3-Qiu3×Su4 for summer-autumn rearing was bred. The hybrid vigor level was improved prominently, and solved the contradiction between disease resistance and quality of cocoon filament. The hybrid combination strengthened the resistance and kept the virtue of a single cross hybrid at the same time. This was the historic breakthrough of the summer-autumn rearing silkworm hybrid in China.

In 1980s, Ministry of Agriculture established the Silkworm Race Examining and Approving Committee (SREAC). Eight appraisal spots were set up at the same time in the country in different provinces to coordinate the silkworm races evaluation. 11 pairs of hybrids for spring rearing qualified to be extended during 20 years (shown in table III). These combinations showed high quantity of silk, high productivity, high quality, and they brought a huge economic benefit. Jingsong×Haoyue, silkworm hybrid for spring rearing, which was bred in the Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRI-CAAS), showed high quantity of silk and began to be extended in production. This combination was a landmark among the silkworm hybrids for spring rearing in China. Since then, new silkworm hybrids have been emerging in endlessly, and Chunlei×Mingzhu, Chun-lei×Zhen-zhu, Zhelei×Chunxiao, Suhua×Chunhui, etc. were given birth subsequently.

Table III. Economic traits of the qualified silkworm hybrids for spring rearing from 1981 to 1999.

Tableau III. Traits économiques des hybrides de vers à soie qualifiés pour l'élevage de printemps de 1981 à 1999.

Qualifi. Year	Hybrid	Larva pupa Rate (%)	Cocoon Weight (g)	Cocoon Shell Rate (%)	Cocoon output Per Box (2000 eggs) (kg)	Filament Length (m)	Non- breaking length of a bave (%)	Unwinding ratio (%)	Raw Silk rate (%)	Neatness (%)
<i>Année de qualification</i>	<i>Hybride</i>	<i>Taux de pupaison (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Production de cocons par boîte (2000 oeufs) (kg)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Longueur sans casse d'une bave (%)</i>	<i>Rendement dévidage (%)</i>	<i>Taux de soie grège (%)</i>	<i>Netteté (%)</i>
1981	Chunlei×Mingzhu	97.5	2.12	25.75	42.18	1424	1131	79.58	20.47	94.48
1981	Jingsong×Haoyue	96.2	72.19	25.32	43.69	1427	1119	78.8	20.45	94.44
1982	Zhelei×Chunxiao	97.06	2.17	24.84	42.84	1402	1047	75.19	19.16	94.95
1988	Suhua×Chunhui	96.52	1.98	25.9	39.44	1425	1092	76.58	19.58	94.56
1990	Chunlei×Zhengzhu	95.46	2.14	24.95	38.83	1377	1024	74.61	19.25	95.46
1992	5-4×24-46	96.85	2.15	24.83	42.10	1378	992	71.04	18.14	94.32
1994	Suzhen×Chunguang	96.6	2.11	25.24	41.79	1402	908	64.52	18.70	94.96
1994	Wan5×Wan6	96.7	2.03	25.13	39.84	1337	912	67.92	19.27	95.94
1994	Chunlei×Xifang	96.07	2.14	24.52	41.86	1380	928	67.03	18.6	95.24
1999	951×952	94.94	2.1	26.81	40.97	1419	991	70.03	19.55	93.72
1999	Jiuhua×Chunzao	98.03	2.21	24.3	43.71	1277	978	76.62	18.22	97.00
	Control 1 Témoin 1	97.28	2.26	23.62	43.63	1247	1022	81.61	19.32	94.92
	Control 2 Témoin 2	96.4	2.02	24.69	39.94	1364	974	70.98	18.36	95.44
	Control 3 Témoin 3	91.77	2.00	24.75	36.76	1266	858	67.94	17.96	93.3

Notes: Control 1 is average achievement of Huahe×Dongfei from 1981 to 1982; Control 2 is average achievement of Jingsong×Haoyue from 1988 to 1994; Control 3 is average achievement of Jingsong×Haoyue from 1995 to 1999. Le témoin 1 est la performance moyenne de Huahe × Dongfei de 1981 à 1982; le témoin 2 est la performance moyenne de Jingsong × Haoyue de 1988 à 1994; le témoin 3 est la performance moyenne de Jingsong × Haoyue de 1995 à 1999.

21 pairs of hybrids for summer-autumn rearing qualified since 1980. Among them, Qiufeng×baiyu, Xinhang×Keming, Furong×Xianghui, Lantian×baiyun, 75xin×7532, Dongting×Bibo, Lu-ping×Qing-guang etc. were not only strongly resistant to disease but also resistant to fluoride to some extent, and their silk quality was preferable too (shown in table-4).

Silkworm breeding in China leaped a new footstep in 1990s. Hybrids for spring rearing such as Suzhen×Chunguang, Wan5×Wan6 etc., and hybrids for spring and autumn rearing such as 871×872, Suju×Minghu etc. were bred. The "Ninth Five year plan" (1996-2000) for silkworm breeding was set up to solve some key problems. The following silkworm races were obtained: 1) silkworm races which were high qualities and easy to propagate; 2) silkworm races for new types of raw silk material; 3) silkworm races with some special characters. The achievements of new silkworm races were shown in table III, table IV and table V.

Due to the adjustment of economy structure and the rapid development of industries in Jiangsu, Zhejiang and Guangdong provinces etc., mulberry leaves were polluted by fluoride because the environment of sericultural districts was damaged seriously. In addition, farmers reared silkworm extensively, and the rearing environment was not disinfected thoroughly. This led to the outbreak of silkworm diseases such as nucleopolyhedrosis and muscardine fungus, which began predominant. At present, the races for autumn rearing were reared in spring in Zhejiang province because of the fluoride pollution. On the contrary, in Jiangsu, the silkworm races that were reared in autumn were races for spring rearing to improve the output and quality of cocoon. Therefore, in the middle of 1980s, the silkworm hybrids for spring and autumn rearing were required to be bred out for rearing in the Changjiang River and the Northern sericultural area of China. Now, silkworm hybrids for spring and autumn rearing such as 57A·57B×24·46, 871×872, 86A·86B×54A, Chuancan11, Suju×Minghu and 873×874 etc. were bred and commercialized. SREAC had approved 7 pairs of silkworm hybrids for spring and autumn rearing (shown in table5).

After 4 generations of silkworm hybrids in the main sericultural areas, the raw silk rate and the silk quality of spring cocoon was obviously improved. In the laboratory, the cocoon shell rate was improved from 20% to 26%, the raw silk rate was improved from 15% to more than 18%, cocoon filament length was improved from 900 meters to 1400 meters, and neatness was improved from 89 cents to 95 cents. Breeding of silkworm races for summer-autumn rearing play the lead in the international scientific community. The gap between China and Japan of silkworm races for special uses has been narrowed.

2. Progress of breeding silkworm races for special use:

Breeding of silkworm races for special use was suitable to the silk market. Starting from 1980s, some advancements have been gained in China after 20 years' effort.

2.1. Silkworm races of fine size filament:

In the middle of 1980s, the third moulting element (a kind of juvenile hormone analogues) was used to induce the four-moulter silkworms turning into three-moulters (Lu,1987), and the fine silk were produced. Its size was lower than 2.2 denier. He Yiyuan (1997) etc. bred the dominant trimoulter race, SG. The offspring of the hybrid of SG and four-moulter silkworm races were all third moulters, and the race was easy to rear and resistant. Its filament size was below 2.0 denier, and its cocoon filament is about 1170 meters long. At the same time, its reelability and neatness were excellent, and it was suited to reel high grade (above 5A) raw silk.

Table IV. Economic traits of the qualified silkworm races for autumn rearing from 1981 to 1999.

Tableau IV. Traits économiques des races de vers à soie qualifiées pour l'élevage d'automne de 1981 à 1999.

Year	Hybrid	Larva -pupa Rate (%)	Cocoon Weight (g)	Cocoon Shell Rate (%)	Cocoon Crop Per Box (2000 eggs) (kg)	Filament Length (m)	Non -breaking length of a bave (m)	Unwinding ratio (%)	Raw silk rate (%)	Neatness (%)
Année	Hybride	Taux de pupaison (%)	Poids du cocon (g)	Richesse soyeuse (%)	Production de cocons par boîte (2000 oeufs) (kg)	Longueur du filament (m)	Longueur sans casse d'une bave (m)	Rendement dévidage (%)	Taux de soie grège (%)	Netteté (%)
1981	Qunfang×Minghui	86.08	1.69	20.75	30.43	960	758	78.84	15.23	93.21
1981	Qunfang×Zaoxia	86.41	1.57	21.57	28.25	1053	757	71.50	15.73	93.99
1981	Xinjing×Zaoxia	90.98	1.57	21.31	29.51	1028	711	68.90	15.55	91.22
1983	Xinhang×Keming	84.26	1.62	20.74	28.37	1004	706	70.82	15.64	94.94
1985	Furong×Xianghui	94.62	1.52	23.32	29.31	1106	883	79.86	17.38	94.34
1986	Yanfang×Rigui	91.4	1.52	24.11	28.55	1175	826	70.52	17.38	94.59
1986	Lantian×Baiyun	90.13	1.64	23.11	30.37	1120	794	71.22	16.65	93.83
1989	Huanghe×Zaoxia	94.34	1.66	22.20	31.67	1082	790	72.92	15.89	94.38
1989	Qinfeng×Baiyu	91.34	1.77	21.51	33.53	1046	752	71.72	14.48	95.13
1990	Xuhua×Qixing	88.13	1.64	21.90	30.10	1005	714	70.76	14.94	97.06
1992	Fuxin×Rixiang	95.45	1.55	23.49	29.59	1084	792	73.54	17.16	95.28
1992	Dong34×7-Xiang	97.12	1.45	22.30	27.66	992	716	72.57	15.81	95.63
1994	Xian1×Xian2	88.81	1.67	22.66	29.86	1076	740	69.26	14.68	93.94
1994	317×318	85.21	1.62	21.96	28.17	1031	713	69.20	14.55	94.12
1994	C497×322	81.89	1.62	23.50	27.80	1070	700	65.61	14.74	93.42
1996	Xiaxi×Qiu-D	94.59	1.71	22.79	32.71	936	681	67.95	15.71	94.2
1996	Lyping×Qingguang	87.04	1.7	23.21	31.47	1115	716	64.18	15.49	96.6
1999	Yueshanx Donghai	91.07	1.88	22.52	35.06	1239	806	64.71	16.3	92.8
1999	953×954	90.58	1.9	22.67	34.43	1178	812	69.09	16.86	91.3
1999	Fu-10×7-11	92.31	1.96	22.22	36.69	1155	788	67.95	16.85	91.8
1999	Dongting×Biho	90.46	1.86	22.63	34.33	1178	784	66.88	15.99	92.2
Control 1		94.64	1.54	19.46	29.53	918	713	77.92	14.54	94.1
Control 2		85.37	1.65	21.56	30.02	984	599	60.71	14.09	94.6
Control 3		93.57	1.77	21.42	33.53	1072	747	69.6	15.8	91.7

Notes : Control 1 is average achievement of Dong34×Su12 from 1981 to 1989, Control 2 is average achievement of Su3qiu3×Su4 from 1990 to 1997, control 3 is average achievement of 7-F×9-xiang from 1998 to 1999. / Le témoin 1 est la performance moyenne de Dong 34 × Su12 de 1981 à 1989, le témoin 2 est la performance moyenne de Su3qiu3 × Su4 de 1990 à 1997, le témoin 3 est la performance moyenne de 7 F × 9xiang de 1998 à 1999.

Table V. Economic traits of the qualified silkworm races for spring and autumn rearing from 1994 to 1999.

Tableau V. Traits économiques des races de ver à soie qualifiées pour l'élevage de printemps et d'automne de 1994 à 1999.

Qualification Year	Hybrid	Larva- pupa Rate (%)	Cocoon Weight (g)	Cocoon Shell Rate (%)	Cocoon Crop per box (2000 eggs) (kg)	Filament length (m)	Non -breaking length of a hawe	Unwinding Ratio (%)	Raw Silk Rate (%)	Neatness
<i>Année de qualification</i>	<i>Hybride</i>	<i>Taux de pupaison (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Récolte de cocons / boîte (2000 oeufs) (kg)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Longueur sans casse d'une hawe (m)</i>	<i>Rendement dévidage (%)</i>	<i>Taux de soie grège (%)</i>	<i>Netteté (%)</i>
1994	871×872	92.37	1.87	23.63	35.23	1259	920	72.88	16.63	94.81
1994	86A-B×54A	92.34	1.82	23.33	34.59	1278	900	70.52	16.42	95.0
1994	Chuancon11	91.1	1.77	23.57	32.67	1093	786	71.9	16.78	94.46
1994	Qiuju×Minghu	89.31	1.83	23.25	33.84	1198	887	74.02	16.62	94.58
1999	873×874	97.26	2.13	25.86	41.78	1378	1154	83.89	19.75	94.5
1999	Qunfeng×Furcun	96.71	2.23	25.39	44.60	1344	1006	74.91	18.7	94.8
1999	HuaGW×XueA	96.05	2.11	25.2	40.96	1419	1020	71.98	19.34	94.43
	Control / Témoin	91.77	2.00	24.75	36.73	1266	858	67.94	17.96	93.3

Notes: Control is average achievement of Jingsong×Haoyue from 1994 to 1999/ Le témoin est la performance moyenne de Jingsong × Haoyue de 1994 à 1999.

2.2. Silkworm races of coarse size filament:

Coarse size silk can be used to weave thick, wrinkle-resistance, stiff and neat clothing ornament. It is a new type of cloth material to expand the silk consumption market, and to promote the continuous development of sericulture and silk industry. At present, coarse size silkworm hybrids in China are 901×902, Xinmiao×Mingri (Xu, 2000) etc., their cocoon filament length is 1100~1300 meters long and their filament size is 4.2~4.8 denier. They have approached the level of Japanese coarse size silkworm races.

2.3. Sex-limited silkworm races:

In 1960s, Chinese silkworm breeding founder, Sun Benzong firstly bred sex-limited marked races, and male and female cocoons were divided to be received, to be dried and to be reeled. Guixian1(Xian539), Guixian2(Xian7532), Guixian3(Xian932) were bred in 1983 by Gu Jiadong. In 1986, Zhongxin1×Rixin1, silkworm hybrids for spring rearing were bred in SRI-CAAS, and male and female silkworms were reared separately to reel silk separately. Since 1980, the outstanding sex limited races, 75xin×Zhaoxia, Shancan3, Qiufeng×Baiyu, (57A·57B)×(24·46) Xian1×Xian2, 317×318, Dongting×Bibo etc. had been bred subsequently in China. Huang Junting (1986) obtained that $+^{sch}$ part of Z chromosome was translocated to W chromosome by means of radiation, the male newly hatched larvae of this system were chocolate, but the females were black.

2.4. Sex- differentiated silkworm races:

Panqingzhong (1992) and Linjianrong (1996) etc. found that the purebred *sch* eggs were sensitive to incubation temperature and humidity. The eggs belonging to the pure bred *sch* (Z^{sch}/Z^{sch} or Z^{sch}/W) would die when they were incubated at high temperature and low humidity, but the hybrid (Z^{sch}/Z^{+sch}) could survive.

Liu Jinquan (1992,1996) etc. bred the silkworm races, Yingguang×Chunyu whose sex could be differentiated by means of fluorescence. The cocoon fluorescent colors of female were white, and those of male were yellow.

2.5. Fluoride-resistant silkworm races:

Mulberry leaves were polluted by fluoride along with the industrial development of the enterprises in villages and towns. Silkworms were seriously poisoned day by day. Feng1×54A (He,1989), Qiufeng×Baiyu, Lvping×Qingguang etc., silkworm races for summer-autumn rearing and Huafeng×Xuesong etc. races for spring and autumn rearing were bred. These hybrids were highly resistant to fluoride, and had been extended in Zhejiang and Jiangsu provinces. They played an important role in stabilizing the production of sericulture.

2.6. High tenacity silkworm races:

The raw silk of normal silkworm races is easy to drop in the silk reeling process so that the silk class is affected, but the high tenacity silk can avoid it. Huang Junting (Edited by SRI.CAAS, 2000) etc. bred the high tenacity silkworm hybrids, Ji×Feng1, its silk tenacity achieves 4.15g/D, stretching rate is 21%, cocoon filament length is 1284m, length of non-broken cocoon filament is 1089 meters and neatness is 96 cents. The comprehensive characters of this hybrid achieved the standard of commercial silkworm races.

2.7. Silkworm races resistant to the Zhenjiang (China) strain denonucleosis virus (DNV-Z). Denonucleosis is one of the three main silkworm virus diseases in China, and causes serious economic damage to sericulture. Chen Keping (Edited by SRI.CAAS, 2000) etc. bred the silkworm hybrid: Shenlong×Tengfei, nonsusceptible to DNV-Z on the bases of the selection of the refractoriness gene, *nsd-Z*, in Chinese silkworm germplasms. This hybrid was high quantity, high quality, easy to multiply. It was uniform in hatching, moulting and mounting. Its silkworms were sturdy and its cocoon shape was even and straight. In one word, its comprehensive character is fine.

2.8. Multiple eggs laying silkworm races.

The silkworm race of multiple laying eggs can provide materials for the commercial hypersilk races to increase eggs, and also can solve the difficulty in multiplication of new hypersilk races with a lower production of eggs. A fundamental multiple eggs laying race, HEK was bred by Chen Keping (Edited by SRI.CAAS, 1996) etc. One female moth of it could lay more than 820 eggs, the highest

one laid 998 eggs, the percentage of good eggs was above 98%. Its cocoon weight was about above 2.1g, and cocoon shell rate was above 22%.

2.9. The male silkworm races:

Lu Cheng (Edited by SRI CAAS, 2000:) etc. transferred the *sch* gene using different systems to Chinese and Japanese commercial silkworm races. The female was used as far as possible to backcross since the male nuclear hereditary material was displaced during the course of transferring. His male-only silkworm race characters had more than 95% of male silkworm rate, and above 26% of cocoon shell rate which beyond 2~3 percentage points to the contrast hybrid *Xiafang* × *qiubai*. This hybrid achieved the standard of commercial silkworm hybrids due to its economic characters.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences introduced the sex linkage balanced lethal strain from Russia. If a male of this strain was crossed to a normal female, females of their offspring would die because there was a lethal gene located on the Z chromosome (Genotype W/Z¹), but males of their offspring would survive by Z¹Z¹ gene. They bred the silkworm races (Edited by SRI CAAS, 2000), Jingsong × Ping2. Its male percentage was 99.13%, cocoon shell rate was 27.79%, and all the other characters were fine.

3. Application of biotechnology in the silkworm breeding:

3.1 The application of transgenesis in silkworm breeding:

Transgenesis can break the obstacles in distant crossing. It is an important method in creating new germplasm. The study of transgenic silkworm began in 1960s. Its development was very rapid in recent years. Chen Yuanlin etc. (1993) has studied the characters variation of silkworm induced by injection of DNA and the complex of DNA and protein isolated from eri-silkworm pupa (*Attacus ricini*) into the eggs or copulatory pouch of *Bombyx mori*. Chen Zhiyi etc. (1996) has worked out the plasmid DNA-rBS2DNA or rBS3DNA containing antibacterial peptide by method of insertion or DNA soaking into the bursa copulatrix of *Bombyx mori*, and got the variation moths with improvement of the amount of laying, larvae viability and cocoon quality.

Li Zhengang (1997) created the yeast artificial chromosome (YAC) of *Antheraea yamamai* Guenee fibroin gene, and transferred it into silkworm fertilized eggs. He found that it had been integrated into silkworm genome and expressed in some transgenic silkworms. Peng Weiping (1998) and Chen Xiu (2000) etc. attempted to transfer the spider fibroin gene into silkworm to alter the structure of silk and improve the silk quality.

3.2 Quantitative trait location (QTL) analysis and use of molecular markers as assistants in silkworm breeding:

QTL analysis was an important research tool on molecular markers as assistants in silkworm breeding which were on the bases of molecular markers linkage map. In recent years, Chinese scholars completed a large number of works on QTL analysis (Lu, 2000; Chen, 1999; Sun, 2000), and made progress in identifying morphological markers, isoenzyme markers, RFLP markers, RAPD markers, SADF's markers, etc. Currently, they obtained the molecular markers linked to DNV-Z-resistance, BmNPV-resistance, fluoride-endurance and knobble. The key lab of Sericulture, Ministry of Agriculture, Silk College of Southwest Agricultural University as the delegate of China, took part in the international research on the RFLP linkage map of silkworm which was presided by Japanese Kyushu University. They aimed at the RFLP linkage map of 11th and 25th chromosome. Academician Xiang Zhonghuai firstly brought forward the plan of constructing the molecular linkage map of the silkworm in China, and brought into effect since 1993. So far, they have constructed a silkworm DNA library, obtained a large number of morphological and molecular markers, and are in the process to set up the molecular marker assisted selection system for silkworm breeding.

REFERENCE

- CHEN KEPING, HE SIMEI, LU CHEN, XIANG ZHONGHUAL. (1999) Molecular linkage map and silkworm breeding. *Jiangsu Sericulture*. 21(3):1~3
- CHEN XIU. (2000) Studies on the transgenic silkworm and the technology of PCR inspection. Ph.D paper, Beijing: Chinese academy of agricultural sciences.
- CHEN YUANLIN etc. (1993) The induction of castor silkworm DNA in the silkworm (*Bombyx mori*). *Journal of Xiamen university*, supplement: 20
- CHEN ZHIYI etc. (1996) Studies on the induction of extraneous DNA in silkworm (*Bombyx mori*). *Agricultural sciences in Guangdong province*, (2): 32. Edited by Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. (1996) The articles collection of tackling key problems of national sciences and technology of the 8th five-year plan, "Breeding of high quality silkworm races". Edited by Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. (2000) The articles collection of tackling key problems of national sciences and technology of the 9th five-year plan, "Breeding of new type of high quality silkworm races"
- HE SIMEI, YAN XIAOYIN, XIA LIANZHI, CAO XIANPU. (1981) Breeding of silkworm races Autumn3 and the combination of triple hybrid for summer and autumn rearing. *Acta sericologica sinica*, 7(3):162~164
- HE SIMEI, YAN XIAOYIN, YANG RUILI. (1989) Breeding of a new silkworm variety "Feng1×54A" for summer-autumn rearing. *Acta sericologica sinica*, 15(2):79~87
- HE YIYUAN, HE SIMEI. (1997) Breeding of a dominant silkworm trimolter SG. *Acta sericologica sinica*, 23(1):24~27
- HUANG JUNTING, etc. (1986) Mutagenesis of the translocation between Z and W chromosomes and analysis of the gene constitution of translocated chromosome in the silkworm (*Bombyx mori*L.) *Acta Genetica Sinica* 13(1):48~55
- LI ZHENGANG, ZHOU CONGZHAO, TANG HENGLI, FAN JIUGE. (1997) YAC—based transfer of fibroin gene from *Autheraea yamamai* to *Bombyx mori*—expression of the YAC clone containing *A. yamamai* fibroin gene in *B. mori*. *Acta insect sinica*, 40(1):1~5
- LIN JIANRONG, CHEN YERONG, YAN LINCHAO. (1996) The female silkworms were controlled not to hatch using *sch* gene. *Sericulture in China*, (2):
- LIU JINGQUAN, CUI YUMEI, YU ZHENCHENG, YU DELIN. (1992) Studies on the breeding of fluorescent cocoon color sex-limited silkworm races. *Acta sericologica sinica*, 18(4): 258~259
- LIU JINGQUAN, YU ZHENCHENG, CUI YUMEI, YU DELIN, DUAN ZHAOXIANG. (1996) Breeding of fluorescence cocoon color sex-limited varieties Yingguang and Chunyu and the preparation of their F1 hybrid. *Acta sericologica sinica*, 22(3):155~159
- LU CHENG, HUANG JUNTING, XIANG ZHONGHUAL. (2000) Fundamental research trends of sericulture in the 21st century. *Acta sericologica sinica*, 26(2): 106~113
- LU HONGSHENG. (1998) The 100 year-history of sericultural sciences in China. *Sericulture in Chinese*, 3:4~7
- LU XUEFANG, LI RONGQI. (1987) Studies on the superfine silk production of induced trimolting silkworm by sm-1. *Acta sericologica sinica*, 13(2):71
- PAN QINGZHONG, CHEN YALIN, CHEN JINGXIN, LIN JIANRONG, HUANG ZIRAN. (1992) Controlling of silkworm sex by means of incubation temperature and humidity. *Chinese science bulletin* 37(12):1133~1136
- PENG WEIPING. (1998) Structure and expression of silk protein gene in the silkworm and spider. *Acta sericologica sinica*, 24(4): 231~243
- SHEN XINGJIA, LI YIREN. (1996) Shallow analysis in examining and approving condition in China. *Chinese sericulture*, 67(3):40~42
- SUN DEBING, LUCHENG. (2000) QTL research and its application prospect in sericulture. *Acta sericologica sinica*, 26(supplement):29~35
- WU YUCHENG, ZHONG BOXIONG. (1999) The germplasms and breeding progress in and out of China. *Sericulture development and silk research*, Chengdu Science and technology university publishing company, p.49~55

- XIANG ZHONGHUAI as the chief editor. (1995) Silkorm breeding in China. Sichuan sciences and technology publishing company
- XU MENKUI, JIANG YONGHUANG, CHEN YUYIN, ZHU CENYIN. (2000) Breeding of practical varieties Xinmiao×Mingri with super thick filament size. *Acta sericologica sinica*, 26(4): 214~218

PROGRES DU *BREEDING* CHEZ LE VER A SOIE EN CHINE

ZHAO YUAN

(Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 212018 - Zhenjiang, Jiangsu Province, Chine).

Cet article présente les progrès du breeding chez le ver à soie en Chine depuis 1950. Nous avons fait le point sur les hybrides de vers à soie pour l'élevage du printemps, l'élevage d'été – automne, l'élevage printemps - automne et sur ceux qui possèdent des caractéristiques particulières. Nous évoquons aussi l'application de la biotechnologie chez le ver à soie en Chine.

INTRODUCTION

La sériciculture a joué un rôle important dans le développement de la civilisation humaine. La Chine a plus de 5000 années d'histoire de culture du mûrier et d'élevage du ver à soie. Au cours de la quête de soie dans la nature, la domestication du ver à soie puis la sériciculture sont devenues une partie importante de l'agriculture. Au cours de cette longue histoire, les Chinois ont acquis une connaissance approfondie et une riche expérience sur la physiologie et l'hérédité chez le ver à soie pour le lignage. La technologie du lignage chez le ver à soie, en l'occurrence la sélection à partir de l'hybridation a été l'un des fondements de la science surtout au cours du développement de la génétique moderne. Par exemple, quand les anciens chinois ont domestiqué le ver à soie sauvage, le taux de soie recueillie n'était que de 7 à 9 %. Après plusieurs milliers d'années de sélection, la West Lake Silkworm Science Gallerie a été fondée en 1897, le taux de soie recueillie chez les variétés locales telles que Zhugui, Xinyuan, Dayuan etc., a augmenté jusqu'à 15 %. Quand le premier hybride F1 a été utilisé au début des années 1930, le taux de soie recueillie à partir du cocon chez Hangui, Huangui × Hua5 et Hua6 a atteint 15 à 16 %. Depuis lors, le lignage chez le ver à soie en Chine est entré dans une ère nouvelle (Xiang, 1995).

Depuis que Sun Benzong (1897 à 1968) le fondateur du *breeding* chez le ver à soie en Chine a commencé à ligner des races de vers à soie limitées au sexe dans les années 1940, la Chine a fait de grands progrès dans le lignage des races de vers à soie jusqu'en 1980. Les années 1980 ont été l'âge d'or du lignage chez le ver à soie en Chine. Un grand nombre de races de vers à soie ont été obtenues pour l'élevage du printemps, l'élevage d'été – automne et pour des usages spéciaux (Xiang, 1995 ; Shen, 1996 ; Edité par SRI, CAAS 1996, 2000 ; Wu, 1999). Le système de multiplication en trois étapes (c'est à dire ferme de production des œufs de vers à soie d'origine, ferme de production des œufs parents et ferme de production des hybrides) et de production des œufs en quatre étapes (c'est à dire la souche d'origine de la race autorisée, les œufs de vers à soie d'origine, les œufs parents et les hybrides) ont été adoptés en Chine pour s'assurer de la pureté et pour accélérer la vulgarisation des races de vers à soie.

Cet article présente les progrès sur le lignage du ver à soie en Chine depuis 1980 de manière à renforcer la coopération et la communication entre les sériculteurs travaillant sur le lignage du ver à soie.

1. Progrès du *breeding* chez les races de vers à soie commerciales :

Depuis 1950, il y a eu de grandes améliorations du *breeding* chez le ver à soie. 80 combinaisons d'hybrides ont été lignées avec succès (Shen, 1996 ; édité par le SRI CAAS, 1996, 2000 ; Wu, 1999 ; Lu, 1998). Les races représentatives de chaque période sont présentées dans le Tableau I et le Tableau II.

En 1950, les hybrides de vers à soie commerciaux dominants pour l'élevage du printemps dans la province de Jiangsu et de Zhejiang étaient Hua8 × Yinghan et Hua9 × Louhan, l'hybride pour l'élevage d'été – automne était Huashi × Yingwen. Dans la province de Sichuan, la race de ver à soie pour l'élevage du printemps et de l'automne étaient Hua10(N) × Chuan1, et 9baihai × 115nan était la race de ver à soie pour l'élevage d'été – automne à Guangdong. Ces races constituent la première génération de vers à soie commerciaux depuis le fondement de la République Populaire de Chine.

En 1960, Su16 × Su17 et Huahe × Dongfei étaient les races de vers à soie commerciales dominantes pour l'élevage de printemps dans la province de Jiangsu et de Zhejiang, la race pour l'été – automne était 306 × Hua10. La province de Sichuan a commencé à diffuser Shu10 × Nan6 pour l'élevage du printemps et parce que cette combinaison hybride s'est avérée présenter une hétérosis élevée, une résistance élevée à la maladie, une production de cocons élevée et de la soie de haute qualité, elle a été rapidement vulgarisée dans la production. Ces hybrides ont formé la deuxième génération de races de vers à soie en Chine.

En 1970, Su5 × Su6, Hang7 × Hang8 et Shu13.Su13 × Nan6 ont commencé à être utilisés comme hybrides commerciaux dominants pour l'élevage de printemps. Les hybrides pour l'élevage d'été – automne étaient Dong 34 × 603, Dong 34 × Su12, XinJing × 8301, Zhenong1 × Su12, 137 × Qiu 303 etc.

He Simei (1981) a utilisé l'hérédité et la différence sanguine de 2 races (la souche chinoise ayant un effet particulièrement par rapport à la quantité de soie, la souche japonaise ayant un effet particulièrement par rapport à la résistance élevée à la maladie et à la qualité de la soie) sur les bases du caractère complémentaire de l'hérédité et la race très résistante à la maladie Su3.Qiu3 × Su4 pour l'élevage d'été – automne a été lignée. Le niveau de vigueur hybride s'est considérablement amélioré et a résolu la contradiction entre la résistance à la maladie et la qualité du filament du cocon. La combinaison hybride renforce la résistance et conserve le mérite d'un hybride à croisement unique. C'est la percée historique en matière d'élevage hybride pour l'été – automne chez le ver à soie en Chine.

En 1980, le Ministère de l'Agriculture a établi le Silkworm Race Examining and Approving Committee (SREAC). Huit lieux d'évaluation ont été conçus au même moment dans le pays dans différentes provinces pour coordonner l'évaluation des races de vers à soie. 11 paires d'hybrides pour l'élevage de printemps se sont qualifiées pour être prolongées pendant 20 ans (présentés dans le tableau III). Ces combinaisons donnent une quantité de soie élevée, une productivité élevée, ont une qualité élevée et elles ont apporté un bénéfice économique énorme. Jingxong × Haoyue, un hybride de ver à soie pour l'élevage du printemps qui a été obtenu au Sericultural Research Institute, de la Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRI-CAAS) présente une quantité de soie élevée et a commencé à être diffusé pour la production. Cette combinaison a fait date parmi les hybrides de vers à soie pour l'élevage du printemps en Chine. Depuis de nouveaux hybrides de vers à soie émergent continuellement et par la suite on a obtenu Chunlei × Mingzhu, Chun.lei × Zhen.zhu, Zhelei × Chunxiao, Suhua × Chunhui, etc..

21 paires d'hybrides pour l'élevage été – automne ont été qualifiés depuis 1980. Parmi eux, Qiufeng × baiyu, Xinhang × Keming, Furong × Xianghui, Lantian × baiyun, 75xin × 7532, Dongting × Bibo, Lu.ping × Qing.guang etc. étaient non seulement très résistants à la maladie mais aussi résistants au fluor jusqu'à un certain degré et leur qualité de soie est aussi intéressante (présentés dans le tableau IV).

Le lignage chez le ver à soie en Chine a franchi une nouvelle étape en 1990. Les hybrides pour l'élevage du printemps tels que Suzhen × Chunguang, Wan5 × Wan6 etc. et les hybrides pour l'élevage

du printemps et de l'automne tels que 871 × 872, Suju × Minghu etc. ont été obtenus. Le "9^{ème} Plan de cinq ans" (1996 – 2000) pour le lignage du ver à soie a été conçu pour résoudre les problèmes majeurs. On a obtenu les races de vers à soie suivantes : 1) des races de vers à soie qui ont des qualités élevées et sont faciles à multiplier ; 2) des races de vers à soie pour les nouveaux types de soie grège ; 3) des races de vers à soie avec des caractères spéciaux. Les réussites avec les nouvelles races de vers à soie sont présentées dans le Tableau III, le Tableau IV et le Tableau V.

En raison de l'ajustement de la structure économique et du développement rapide des industries dans les provinces de Jiangsu, Zhejiang et Guangdong, etc., les feuilles de mûrier sont polluées par le fluor parce que la qualité de l'environnement dans les zones séricicoles s'est sérieusement dégradée. De plus, les fermiers ont abondamment élevé les vers à soie et l'environnement d'élevage n'a pas été soigneusement désinfecté. Cela a entraîné l'éruption de maladies du ver à soie telles que la polyédrose nucléaire et le champignon de la muscardine qui sont devenus prédominants. A présent, les races pour l'élevage d'automne sont élevées au printemps dans la province de Zhejiang en raison de la pollution au fluor. Au contraire, à Jiangsu, les races de vers à soie qui sont élevées en automne sont des races pour l'élevage de printemps pour améliorer la production et la qualité du cocon. Donc, au milieu des années 1980, il a fallu ligner des hybrides de vers à soie pour l'élevage du printemps et de l'automne pour la zone séricicole de la rivière Changjian et du nord de la Chine. Maintenant, les hybrides de vers à soie pour l'élevage du printemps et de l'automne tels que 57A.57B × 24.46, 871 × 872, 86A.86B × 54A, Chuancan11, Suju × Minghu et 873 × 874 etc. ont été lignés et commercialisés. Le SREAC a approuvé 7 paires hybrides de vers à soie pour l'élevage du printemps et de l'automne (présentés dans le tableau V).

Après 4 générations d'hybrides dans les principales zones séricicoles, le taux de soie grège et la qualité de la soie des cocons de printemps se sont notablement améliorées. En laboratoire, le taux de richesse soyeuse est passé de 20 à 26 %, le taux de soie grège est passé de 15 à plus de 18 % ; la longueur du filament de cocon s'est améliorée de 900 mètres à 1400 mètres et la netteté est passée de 89 % à 95 %. Le lignage de races de vers à soie pour l'élevage d'été – automne domine dans la communauté scientifique internationale. Le fossé entre la Chine et le Japon par rapport aux races de vers à soie destinées à des usages spéciaux a diminué.

2. Progrès dans le lignage de races de vers à soie destinées à des usages spéciaux :

Le lignage de races de vers à soie destinées à des usages spéciaux convient au marché de la soie. A partir des années 1980, des progrès ont été faits en Chine après 20 ans d'efforts.

2.1. Races de vers à soie avec un filament fin :

Au milieu des années 1980, on a utilisé un analogue d'hormone juvénile pour que les vers à soie à quatre mues n'aient plus que trois mues (Lu, 1987) et on a produit de la soie fine. Son titre est inférieur à 2,2 deniers. He Yiyuan (1997) a ligné la race à trois mues dominantes, SG. Les descendants de l'hybride SG avec les races de vers à soie à quatre mues avaient tous trois mues et la lignée est facile à élever et résistante. Le titre de son filament est en-dessous de 2 deniers et le filament du cocon fait environ 1170 mètres. Sa dévidabilité et sa netteté sont excellents et elle convient au dévidage de soie grège de qualité élevée (au-dessus de 5A).

2.2. Races de vers à soie avec un filament de soie épais :

La soie à titre épais peut être utilisée pour filer des accessoires vestimentaires épais, qui ne se froissent pas, sont raides et nets. C'est un nouveau type d'étoffe pour élargir le marché de consommation de la soie et pour promouvoir le développement continu de la sériciculture et de l'industrie soyeuse. A présent, les hybrides de vers à soie à titre épais en Chine sont 901 × 902, Xinmiao × Mingri (Xu, 2000) etc, la longueur du filament du cocon est de 1100 à 1300 mètres et le titre de leur

filament est de 4,2 à 4,8 deniers. Ils sont proches du niveau des races de vers à soie japonaises à titre épais.

2.3. Races de vers à soie limitées au sexe :

En 1960, le fondateur chinois du lignage chez le ver à soie, Sun Benzong a en premier obtenu des races de vers à soie limitées au sexe et on a séparé les cocons mâles et femelles pour les récolter, les sécher et les dévider. Guixian1 (Xian539), Guixian2 (Xian 7532), Guixian3 (Xian 932) ont été obtenus en 1983 par Gu Jiadong. En 1986, Zhongxin1 × Rixin1, des hybrides de vers à soie pour l'élevage de printemps ont été lignés au SRI-CAAS et les vers à soie mâles et femelles ont été élevés séparément afin de dévider la soie séparément. Depuis, 1980, les races remarquables limitées au sexe 75xin × Zhaoxia, Shancan3, Qiufeng × Baiyu, (57A.57B) × (24.46), Xian1×Sian2, 317×318, Dongting × Bibo ont été lignées en Chine. Huang Junting (1986) a réussi à transférer la partie^{sch} du chromosome Z sur le chromosome W par irradiation, les larves mâles nouvellement écloses avec ce système étaient chocolat et les femelles étaient noires.

2.4. Races de vers à soie différenciées par le sexe :

Panqingzhong (1992) et Linjianrong (1996) ont trouvé que les œufs *sch* lignés de manière pure sont sensibles à la température d'incubation et à l'humidité. Les œufs appartenant au *sch* ligné de manière pure (Z^{sch} / Z^{sch} ou Z^{sch} / W) meurent quand ils sont incubés à une température élevée et avec une faible humidité, mais l'hybride (Z^{sch} / Z^{+sch}) survit.

Liu Jinquan (1992, 1996) a ligné les races de vers à soie, Yingguang × Chunyu dont le sexe peut être différencié au moyen de la fluorescence. Les cocons fluorescents du cocon femelle sont blancs et ceux des mâles sont jaunes.

2.5. Races de vers à soie résistantes au fluor :

Les feuilles de mûrier sont polluées par le fluor à cause du développement industriel et des entreprises dans les villages et dans les villes. Les vers à soie sont sévèrement empoisonnés jour après jour. Feng1 × 54A (He, 1989), Qiufeng × Baiyu, Luping × Qingguang etc., des races de vers à soie pour l'élevage d'été – automne et Huafeng × Xuesong, des races pour l'élevage du printemps et de l'automne ont été lignées. Ces hybrides sont très résistants au fluor et ont été étendu aux provinces de Zhejiang et Jiangsu. Ils jouent un rôle important pour stabiliser la production de la sériciculture.

2.6. Races de vers à soie à ténacité élevée :

La soie grège des races de vers à soie normales se casse facilement pendant le processus de dévidage de la soie de sorte que cela a un effet sur la classification de la soie, mais avec la soie à ténacité élevée on peut éviter cela. Huang Junting (édité par SRI, CAAS, 2000) a ligné les hybrides de vers à soie à ténacité élevée, Ji×Feng1, la résistance de leur soie atteint 4,15 g/D, le taux d'étirement est de 21 %, la longueur du filament du cocon est de 1284 m, la longueur du filament du cocon sans casse est de 1089 mètres et la netteté de 96 pourcents. Les caractères globaux de cet hybride atteignent le niveau des races de vers à soie commerciales.

2.7. Races de ver à soie résistantes au virus de la denso-nucléose de souche Zhenjiang (Chine) (DNV-Z) :

La denso-nucléose est l'une des trois principales maladies virales chez le ver à soie en Chine et entraîne de sérieux dégâts économiques pour la sériciculture. Chen Keping (édité par la SRI, CAAS, 2000) a ligné l'hybride de ver à soie : Shenlong × Tengfei, insensible à DNV-Z sur la base de la sélection du gène réfractaire, *nsd-Z*, dans les germoplasmes de vers à soie chinois. Cet hybride donne une quantité élevée de soie avec une qualité élevée et est facile à multiplier. Il donne une éclosion, une mue et une montée uniformes. Ses vers à soie sont robustes et la forme de son cocon est régulière et droite. En un mot, ses caractères sont globalement excellents.

2. 8. Races de vers à soie à pontes élevées :

La race de ver à soie à pontes élevées peut fournir des matériaux pour les races commerciales à soie abondante et peut aussi résoudre le problème de multiplication des nouvelles races à soie abondante et à faible production d'œufs. Une race de base à pontes multiples, HEK a été lignée par Chen Keping (édité par SRI.CAAS, 1996). Le papillon femelle peut pondre plus de 820 œufs, la ponte la plus élevée est de 998 œufs, le pourcentage d'œufs de bonne qualité est de plus de 98 %. Le poids de son cocon est de plus de 2,1 g et le taux de richesse soyeuse est de plus de 22 %.

2. 9. Races de vers à soie mâles :

Lu Cheng (édité par la SRI CAAS, 2000) a transféré le gène *sch* en utilisant différents systèmes chez les races de vers à soie commerciales chinoises et japonaises. La femelle est utilisée le plus possible pour le croisement de retour puisque le matériel nucléaire héréditaire mâle est déplacé au cours du transfert. Ses caractères " mâle seul " correspondent à plus de 95 % de taux de vers à soie mâle et plus de 26 % de richesse soyeuse qui est au-delà de 2 à 3 pour-cent supérieur à l'hybride *Xiafang* × *qiubai*. Cet hybride atteint le niveau des hybrides de vers à soie commerciaux par ses caractères économiques.

Le Sericultural Research Institute, de Zhejiang Academy of Agricultural Sciences a introduit une souche létale balancée à liaison sexuelle de Russie. Si un mâle de cette souche est croisé à une femelle normale, les femelles de leur descendance meurent parce qu'il y a un gène létal situé sur le chromosome Z (génotype W/Z^1) mais les mâles de leur descendance survivent avec le gène $Z^{+1} Z^1$. La race de vers à soie Jingsong × Ping2 est éditée par le SRI.CAAS, (2000). Son pourcentage de mâles est de 99,13 %, son taux de richesse soyeuse est de 27,79 % et tous les autres caractères sont excellents.

3. Application de la biotechnologie au lignage de ver à soie :

3.1. Application de la transgénèse pour le lignage du ver à soie :

La transgénèse peut rompre les obstacles dans le croisement distant. C'est une méthode importante pour créer un nouveau germoplasme. L'étude du ver à soie transgénique a commencé dans les années 1960. Son développement a été très rapide au cours de ces récentes années. Chen Yuanlin etc. (1993) a étudié la variation des caractères de vers à soie induite par l'injection d'ADN et du complexe d'ADN et de protéines isolés de la nymphe de ver à soie eri (*Attacus ricini*) dans les œufs ou dans la bursa copulatrice de *Bombyx mori*. Chen Zhiyi (1996) a trouvé que le plasmide ADN-rBS2AADN ou rBS3AADN contenant un peptide antibactérien par la méthode d'insertion ou de trempage de l'ADN dans la bursa copulatrice de *Bombyx mori* donnait des papillons avec une amélioration de la quantité de ponte, de la viabilité des larves et de la qualité des cocons.

Li Zhengang (1997) a obtenu un chromosome artificiel de levure (YAC) contenant le gène de la fibroïne de *Antheraea yamamai* Guence et l'a transféré dans des œufs de vers à soie fertilisés. Il a trouvé qu'il avait été intégré dans le génome du ver à soie et exprimé dans certains vers à soie transgéniques. Peng Weiping (1998) et Chen Xiu (2000) ont essayé de transférer le gène de la fibroïne de l'araignée dans le ver à soie pour altérer la structure de la soie et améliorer la qualité de la soie.

3.2. Analyse de la position des caractères quantitatifs (QTL) et utilisation de marqueurs moléculaires comme assistants dans le lignage du ver à soie :

L'analyse QTL est un outil de recherche important sur les marqueurs moléculaires comme assistants dans le lignage du ver à soie sur la base de la carte de liaison des marqueurs moléculaires. Récemment, les scientifiques chinois ont réussi un grand nombre de travaux sur l'analyse QTL (Lu, 2000 ; Chen, 1999 ; Sun, 2000) et fait des progrès pour identifier les marqueurs morphologiques, les marqueurs des isoenzymes, les marqueurs RFLP, les marqueurs RAPD, les marqueurs SADF, etc.. A présent, ils ont obtenu les marqueurs moléculaires liés à la résistance à DNV-Z, à la résistance au BmNPV, à l'endurance au fluor et à la gibosité etc.. Le laboratoire élé en matière de sériciculture, celui du Ministère de l'Agriculture, Silk College of Southwest Agricultural University a pris part en

tant que représentant de la Chine dans la recherche internationale sur la carte de liaison RFLP chez le ver à soie, présidée par la Japanese Kyushu University. Ils travaillent sur la carte de liaison du 1^{ème} et du 25^{ème} chromosome. L'académicien Wang Zhonghuai a le premier conçu un plan de construction de carte de liaison moléculaire chez le ver à soie en Chine et l'a appliqué depuis 1993. Jusqu'à présent, les chercheurs ont construit une bibliothèque d'ADN du ver à soie, obtenu un grand nombre de marqueurs morphologiques et moléculaires et sont en train d'installer un système de sélection assisté grâce aux marqueurs moléculaires pour le lignage du ver à soie.

INFECTION BEHAVIOUR OF CONIDIA OF *MYROTHECIUM RORIDUM* ON MULBERRY LEAF AND CYTOLOGICAL CHANGES OF LEAF CELLS INFECTED WITH THE FUNGUS

RITSUKO MURAKAMI*, HIROMU KAWAKITA & AKIRA SHIRATA

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-8634, Japan.

*Conidial germination behaviour, infection timing of **Myrothecium roridum** and mulberry cells applied with the toxins or infected with the fungus were examined. Germination percentage and growth of germination tubes of conidia suspended in water on intact upper surface (US) leaf were low and the conidia did not infect. The conidia suspended in potato sucrose broth on intact US leaf had high germination percentage, growth of germination tubes and infection percentage. Conidia suspended in water on lower surface (LS) leaf infected at 21 hours after inoculation and those put on punctured US or LS leaves infected at 7 hours. At sites developing lesions caused by **M. roridum**, toxins produced by the fungus spread ahead of hyphal growth from the inoculum to the healthy parts. In mulberry cells infected by **M. roridum**, areas of low electron density in the cell walls and elongations of the cuticle of leaf were observed. In mulberry cells browned by the toxins of **M. roridum**, fibrosed or granulated organs followed by broken organs or cell walls were observed.*

Keywords: Host responses, *Myrothecium roridum*, mulberry, toxins.

INTRODUCTION

Myrothecium roridum Tode ex Fries was reported as pathogenic fungus causing the mulberry leaf spot disease in 1994 (Takahashi *et al.*, 1994). There have been some reports concerning conidial germination of *M. roridum* on media with various nutritional components or incubated at various temperatures (Jamaluddin and Tandon, 1976; Karwasra and Chand, 1983; Kutti *et al.*, 1989) but no reports concerning conidial germination of *M. roridum* on plants and the time required for infection. Therefore, infection behaviour of conidia of this fungus on mulberry leaves was examined.

Fungal genera *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* and *Trichothecium* produce trichothecenes, sesquiterpenoid epoxides (Ueno, 1980). *M. roridum* produces toxins on mulberry leaves (Murakami and Shirata, 1998) and toxins as trichothecenes on medium (Murakami *et al.*, 1999). Therefore the toxins produced on mulberry leaves by this fungus may belong to trichothecenes. Trichothecenes are potent inhibitors of protein synthesis (Ueno, 1980). However, the role of trichothecenes in ecology of the fungi that produce them is unclear. Moreover, there have been many reports on the reaction of host plant cells to infection with pathogens (James and Herbert, 1976; Kouno *et al.*, 1980; Ando and Hamaya, 1986), but no reports on the reaction of mulberry leaf cells to infection by *M. roridum*. There were no reports on changes in mulberry cells damaged by the toxins produced by the fungus. Therefore, behaviour of the toxins and *M. roridum* in mulberry leaves and reactions of mulberry leaf cells infected with the fungus are examined in this report to contribute to clear possible functions of the toxins in pathogenicity of this fungus.

* National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohsawashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

MATERIALS AND METHODS

Inocula:

M. roridum (M9403) isolated from a mulberry field in Kagoshima Prefecture, Japan (Murakami and Shirata, 1998), was used. M9403 was grown on potato sucrose agar medium (PSA: 2% sucrose and 1.8% agar in 20% potato broth) at 25° C for 2 weeks. Formed conidia were washed with distilled water 3 times to remove the toxins secreted by the fungus in the culture, and then the washed conidia were used for inoculation tests.

Examination of behaviour of germination and infection of *M. roridum*:

A conidial suspension (10 µl at a concentration of 10^5 conidia / ml in water) was put on each of intact or punctured using 10 needles 3 upper surface (US) leaves. Conidia were suspended (10^5 conidia / ml) in potato sucrose medium (PS: 2% sucrose in 20% potato broth) and 10 µl of the suspension was also put on intact 3 US leaves. The leaves were treated following the method of Yoshida and Shirata (Yoshida and Shirata, 1997). The treated leaves were incubated at 25° C from 1 to 25h. At sampling time, the treated leaves were prefixed in 2% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 6.9) overnight at 5° C, postfixed in 2% osmium acid for 3 h at 5° C, dehydrated with ethanol series, displaced by isoamyl acetate, dried in a critical dryer (HCP-1, Hitachi Koki, Tokyo, Japan) vapor-deposited gold particles by a quick coater (SC-701, Sanyu electron, Tokyo, Japan) and observed under a scanning electron microscope (SEM: JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan). The percentage of conidial germination and the length of the germination tubes were examined in 100 conidia for each treatment at 3 repetitions and the average germination rate and length of the germination tubes were calculated.

To investigate the infection percentage of the conidia suspended in water, the suspension of conidia in water (10 µl at 10^5 conidia / ml) was put on each of intact or punctured 10 US leaves and conidia suspended in PS (10 µl at 10^5 conidia / ml) were put on the intact 10 US leaves. The inoculated leaves were incubated at 25° C. Each treatment was repeated 3 times. Appearance of lesion on each leaf within 7 days after inoculation was taken as the criterion for evaluating infection of the leaves by each inoculum.

Examination of infection timing:

A conidial suspension in water (10 µl at 10^5 conidia / ml) was put on each of intact or punctured 10 US or 10 lower surface (LS) leaves and then incubated at 25° C from 1 to 72h. The leaves were treated following method of Yoshida and Shirata (Yoshida and Shirata, 1997). At sampling time, the conidial suspension on the leaf was airdried. The leaves were coated with clear nail polish, dried and the nail polish was then peeled off. This treatment was repeated 3 times. The leaves were incubated. Then appearance of lesions on each leaf within 7 days after inoculation was taken as the criterion for evaluating infection of the leaves by each inoculum.

Examination of spread of toxins and hyphal growth from inoculum in developing lesion:

To examine the browning of cells by the toxins produced by *M. roridum*, the toxins (10 µl at 100 ppm) were dropped on the punctured 3 US leaves. The toxins were produced by *M. roridum* on PSA at 25° C for 1 month, and then the culture was dried.

The toxins in the culture were extracted with methanol and the extract was evaporated. The residue was used as the toxins. Browened areas with browning within 7 days after treatment were used. From the browened leaves, series of pieces (2 × 5 mm) from the site where the toxins were dropped, to the healthy part of the leaf (as shown in Figure 1) were used.

To examine cells in areas of developing lesions, lesions were used as inoculum in this experiment to avoid introducing any of the toxins secreted by the fungus in the culture. A culture of *M. roridum* on PSA was put on 3 US leaves and then lesions were formed. The pieces of the lesion (3 × 3 mm)

were put on 3 US leaves again. Series of pieces (2×5 mm, as in Figure 2) were cut from new lesions at 10 days after inoculation. The cut pieces were examined under the microscope and looked for hyphae of *M. roridum* or indications of toxin effect.

The cut pieces were treated following method of Koga and Kobayashi (1980) to prepare them for microscopic observation. The pieces were boiled in latophenol-alcohol [0.1% phenol (w/v), 11.1% lactic acid (w/v), 88.9% ethanol (v/v)] for 5 min and then boiled for 5 min in distilled water with 0.75% sodium chloride (w/v) and 0.25% acetic acid (v/v). The pieces were dehydrated with ethanol series, soaked in methyl, dyed with 0.2% crystal violet (in methyl salicylate), decolorized with methyl salicylate and observed under an optical microscope (OPTIPHOT-2, Nikon, Tokyo, Japan).

Examination of mulberry infected by *M. roridum* cells and growth of hyphae in the cells:

To investigate the changes in cells infected by *M. roridum*, cells in developing lesions were observed under a transmission electron microscope (TEM: JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan). The preparation of the sample for TEM followed the method of Kawakita *et al.*, (Kawakita *et al.*, 2000). A culture of *M. roridum* on PSA was put on the mulberry leaf and then a lesion formed. The lesion was put on US leaves again as inoculum. Pieces (2×5 mm) from the edges of the new lesion at 10 days after the inoculation (as in Figure 2) were prefixed in 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) for 2 h at 4° C, postfixed in 1% osmium acid for 1.5 h 4° C, dehydrated with ethanol series and embedded in Epon 812 resin. Ultrathin sections were made with an ultramicrotome (LKB 4800, LKB Products, Bromma, Sweden) after staining with uranyl acetate and lead citrate.

Cytological changes in cells damaged by the toxins:

Toxins produced by *M. roridum* (10 µl at 100 ppm) were dropped onto mulberry leaves. Pieces (2×5 mm, see Figure 1) from browning at 7 days after the treatment were cut from the browned leaf for examination of changes in the cells damaged by the toxins. The leaves were observed under TEM. As controls, leaves that were not supplied with the toxins were treated in the same manner.

RESULTS

Behaviour of germination or infection of *M. roridum*:

The germination percentage and growth of the germination tubes of conidia suspended in water on intact leaf were the lowest, and the germination percentage and growth of the germination tubes of conidia suspended in PS on intact leaf were the highest (Fig. 3). At 15 h after inoculation, the germination rate of conidia suspended in water on punctured leaf was over 90%, and the length of the germination tubes of these conidia suspended in PS on intact leaf was over 90% and the length of the germination tubes was over 100 µm. At 10 h after inoculation, the germination rate of conidia suspended in PS on intact leaf was over 90% and the length of the germination tubes was over 100 µm. In contrast, the germination rate of conidia suspended in water on intact leaf was only 47.8% and the length of the germination tubes was only 73 µm at 25 h after the inoculation.

Conidia suspended in water did not infect intact US mulberry leaf but did infect punctured US leaf at 25%. Conidia suspended in PS infected intact US leaves at 100%.

Thus, conditions that cause high germination rates and growth of the germination tubes of conidia may cause high infection rates by the conidia.

Infection timing:

Within 21 h after inoculation, conidia suspended in water did not infect the intact US leaf but infected the intact LS leaf (Table I). Within 7 h after inoculation, conidia of *M. roridum* infected the punctured US and LS leaves.

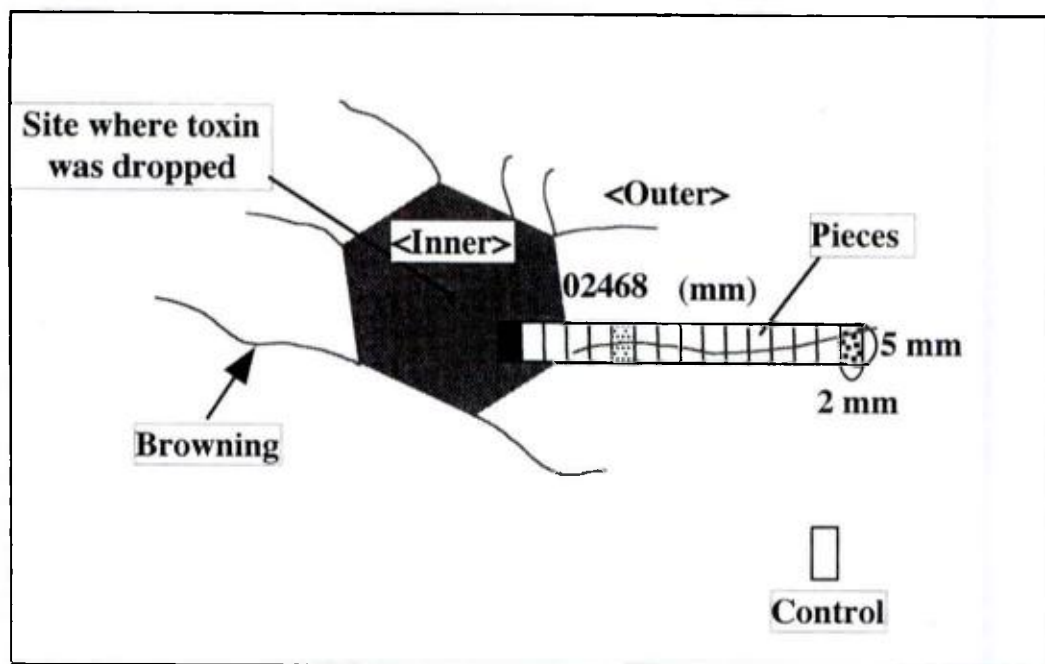


Figure 1. Sampling sites (series of 2×5 mm pieces) for browned areas with browning caused by the toxins produced by *M. roridum*.

- : Cells in this piece were observed under a transmission electron microscope (TEM) (Fig. 10).
- ▣ : Cells in this piece were observed under an optical microscope (Fig. 4) and a TEM (Fig. 11).
- : Cells in this piece were observed under a TEM (Fig. 12).

Figure 1. Sites d'échantillonnage (série de morceaux de 2×5 mm) pour les zones marron avec un brunissement provoqué par les toxines produites par *M. roridum*

- : Les cellules de cet échantillon sont observées sous un microscope électronique à transmission (TEM) (Fig. 10).
- ▣ : Les cellules de cet échantillon sont observées sous un microscope optique (Fig. 4) et un TEM (Fig. 11).
- : Les cellules de cet échantillon sont observées sous un TEM (Fig. 12).

Growth of hyphae and spread of toxins of *M. roridum* in developing lesions:

With the method of Koga and Kobayashi (1980), the hyphae of *M. roridum* and the toxin effect in mulberry leaves were detectable easily.

When toxins were dropped on the US leaf, browning was induced (Fig. 4 left) and brown particles were detected in the cleared leaves (Fig. 4 right). The brown particles were not detected when the toxins were not dropped onto the leaves. The brown particles were induced by application of toxins at less concentration than the lowest concentration inducing of the browning to mulberry leaves and they were detected quicker than detection of browning. Therefore, the brown particles were useful for an indication of the toxin effect. The brown particles were detected along bascular bundles or idioblasts by application of the toxins at low concentrations. When $10 \mu\text{l}$ of 0.25 to 100 ppm of the toxins were applied on leaves, browning began to appear at 2 days after the application by 100 ppm

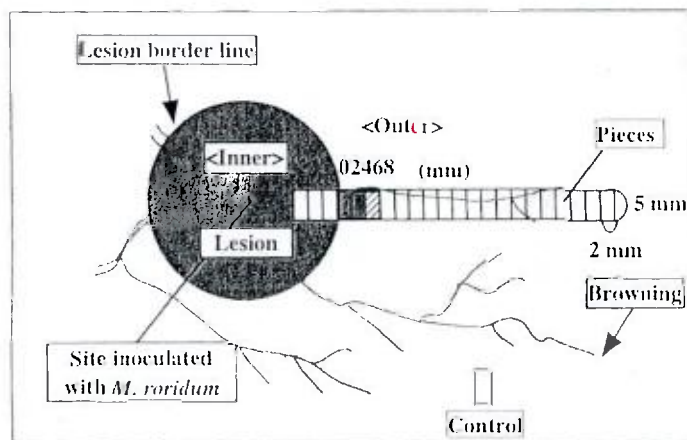


Figure 2. Sampling sites (series of 2 × 5 mm pieces) for lesion caused by *M. roridum*.

▨ : Cells in this piece were observed under an optical microscope (Fig. 5) and a TEM (Figs 6 and 7).

□ : Cells in this piece were observed under a TEM (Fig. 8).

Figure 2. Sites d'échantillonnage (série de morceaux de 2 × 5 mm) pour la lésion provoquée par *M. roridum*.

▨ : Les cellules de cet échantillon sont observées sous un microscope optique (Fig. 5) et un TEM (Figs. 6 et 7).

□ : Les cellules de cet échantillon sont observées sous un TEM (Fig. 8).

Table I. Percentage and timing of infection of *M. roridum*.

Tableau I. Pourcentage et étapes de l'infestation par *M. roridum*.

Hour 1) / Heure 1)	Intact Intactes		Punctured Perforées	
	US	LS	US	LS
1	0 ²⁾	0	0	0
3	0	0	0	0
5	0	0	0	0
7	0	0	10	10
9	0	0	10	10
11	0	0	10	10
13	0	0	20	30
15	0	0	10	10
17	0	0	10	10
19	0	0	20	10
21	0	10	10	10
23	0	10	10	20
25	0	20	20	30
48	0	10	30	10
72	0	30	20	40

Conidia of each fungus were put on the intact or punctured upper surface (US) or lower surface (LS) of each of 10 leaves. 1) Hours after inoculation. 2) Infection percentage. / Les conidies de chaque champignon sont mises sur la surface supérieure (US) ou inférieure (LS) intacte ou perforée de chacune des 10 feuilles. 1) Heures après l'inoculation. 2) Taux d'infestation.

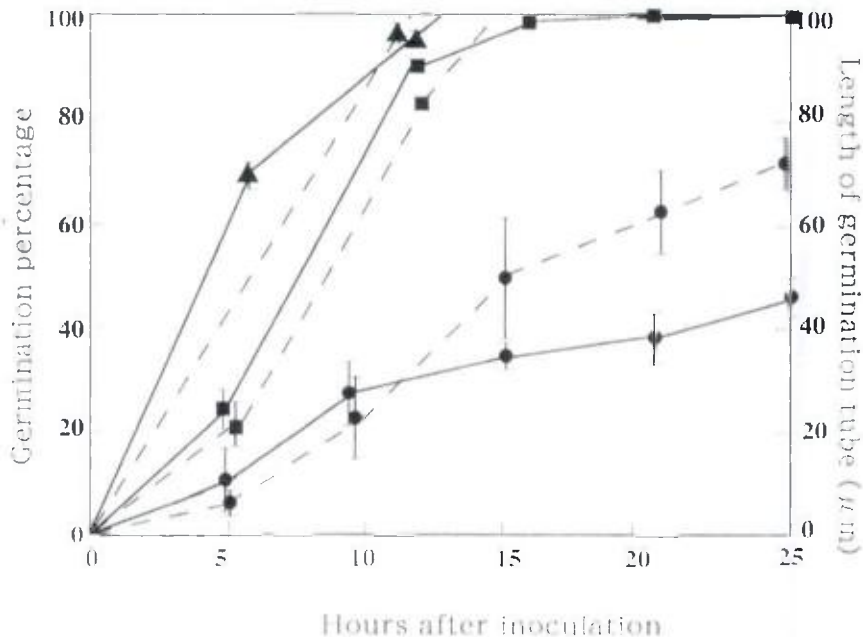


Figure 3. Germination percentage and lengths of germination tubes of conidia of *M. roridum* on mulberry leaves.

Solid lines show germination percentage of conidia in water inoculated on intact (●) and punctured mulberry leaves (■) and conidia in potato sucrose medium (PS) inoculated on intact leaves (▲).

Broken lines show length of germination tube of conidia in water and inoculated on intact (●) and punctured mulberry leaves (■) and conidia in PS inoculated on intact leaves (▲).

Bars show standard errors of mean of germination percentage and length of germination tube.

Figure 3. Pourcentage de germination et longueur des tubes germinatifs des conidies de *M. roridum* sur les feuilles de mûrier.

Les lignes continues présentent le pourcentage de germination des conidies dans de l'eau inoculées sur des feuilles de mûrier intactes (●) et perforées (■) et les conidies dans le milieu de sucrose de pomme de terre (PS) inoculées sur les feuilles de mûrier intactes (▲).

Les pointillés montrent la longueur du tube germinatif des conidies dans l'eau et inoculées sur des feuilles de mûrier intactes (●) et perforées (■) et les conidies dans le PS inoculées sur des feuilles intactes (▲).

Les barres présentent les écarts types de la moyenne du pourcentage de germination et de la longueur du tube germinatif.

of the toxins, 3 days by 50 or 25 ppm and 5 days by 10 ppm. The browning was not induced by less than 5 ppm. The brown particles were induced 20 min after the inoculation by 100 or 50 ppm of the toxins, 1h by 25 ppm, 3h by 10 ppm, 9h by 5 ppm, 11h at 1 ppm and 15h at 0.5 or 0.25 ppm. The brown particles were not induced by less than 0.125 ppm of the toxins. The brown particles were used as indication of toxin effects.

The occurrence of hyphae of *M. roridum* and the brown particles in pieces cut from developing leaf lesions is shown in Table II. When *M. roridum* was inoculated on the US leaf, the red hyphae and brown particles were detected in leaf lesions. Hyphae and brown particles were detected in leaves in the inner parts of the lesion and from 0 to 2 mm from the border of the lesion. In pieces taken from 2 to 4 mm from the border of the lesion (Fig. 5 left), tips of hyphae of *M. roridum* and brown particles were detected in leaves (Fig. 5 right). At sites beyond 4 mm from the border, only brown particles

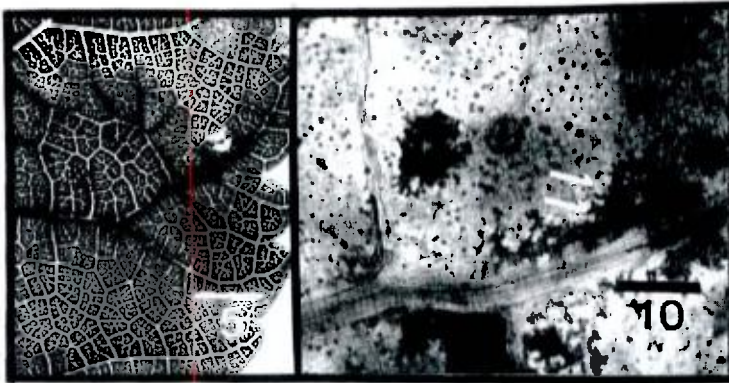


Figure 4. Browned mulberry leaves by the toxins (left) and optical microscope image of the area (right).
The magnified view (right) is part at >> in left Figure (piece [] of browned area in Figure 1) and shows brown particles (double arrows).
Bar in left Figure: 5 mm. Bar in right Figure: 10 μ m.

Figure 4. Les feuilles de mûrier brunies par les toxines (à gauche) et l'image au microscope optique de la zone (à droite).

L'agrandissement (à droite) est la partie >> dans la figure de gauche (le morceau [] de la zone marron dans la figure 1) et présente des particules marron (double flèches).
Barre dans la figure de gauche : 5 mm. Barre dans la figure de droite : 10 μ m.

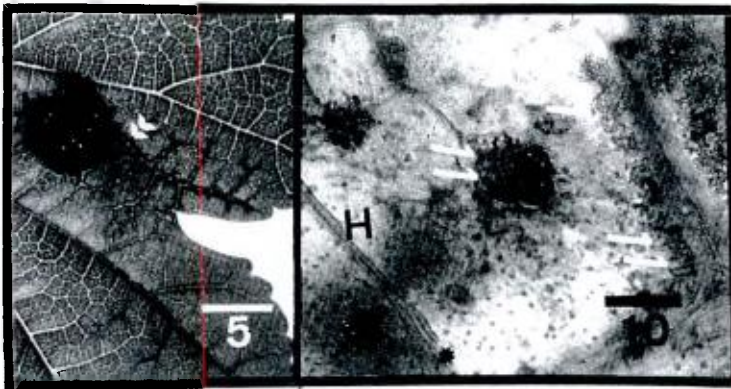


Figure 5. Lesion caused by *M. roridum* (left) and optical microscope image of the area (right).
The magnified view (right) is part at >> in left Figure (piece [] in the lesion in Figure 2) and shows the fungal hyphae (H, *: tip of hyphae) of *M. roridum* and brown particles (double arrows). Bar in left Figure: 5mm. Bar in right Figure: 10 μ m.

Figure 5. Lésion provoquée par *M. roridum* (à gauche) et image au microscope optique de la zone (à droite).

L'agrandissement (à droite) est la partie >> de la figure de gauche (le morceau [] dans la lésion dans la figure 2) et présente les hyphes fongiques (H, *: bout des hyphes) de *M. roridum* et les particules marron (double flèches). Barre à gauche de la figure : 5mm. Barre à droite de la figure : 10 μ m.

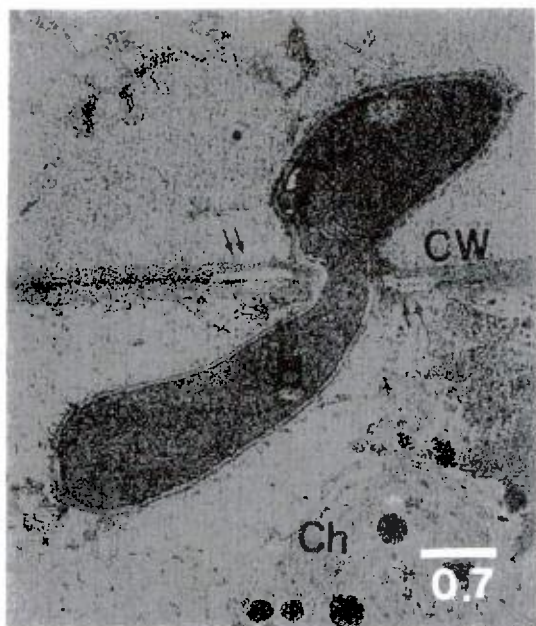


Figure 6. Transmission electron microscope images of changes in mulberry leaf cells infected with *M. roridum*.

Areas of low electron density (double arrows) were detected in the cell wall (CW) of mulberry cells infected with *M. roridum* (H), from piece [X] in Figure 2. Ch: Chloroplast in mulberry cell.

Figure 6. Images au microscope électronique à transmission des changements dans les cellules de la feuille de mûrier infestée par M.roridum.

Les zones de faible densité électronique (doubles flèches) sont détectées dans la paroi cellulaire (CW) des cellules de mûrier infestées par *M. roridum* (H), à partir du morceau [X] dans la Figure 2. Ch: Chloroplaste dans la cellule de mûrier.

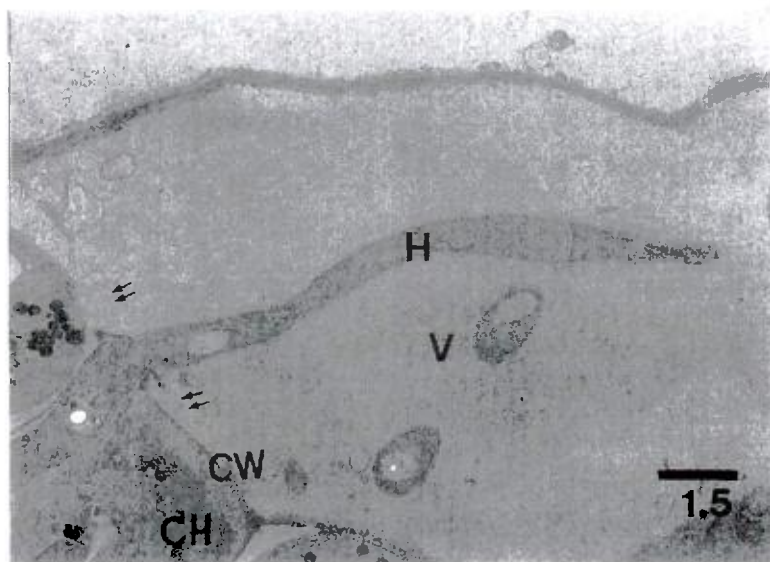


Figure 7. Transmission electron microscope images of growth of hyphae of *M. roridum* in the cells (piece [X] in Figure 2).

Double arrows: areas of low electron density, Ch: Chloroplast in mulberry cell, CW: cell wall of mulberry cells, H: hyphae of *M. roridum*, V: vacuole.

Figure 7. Images au microscope électronique de la croissance des hyphes de M. roridum dans les cellules (morceau [X] dans la Figure 2).

Double flèches : zones de faible densité électronique, Ch : chloroplaste dans la cellule de mûrier, CW: paroi cellulaire des cellules de mûrier, H: hyphes of *M.*

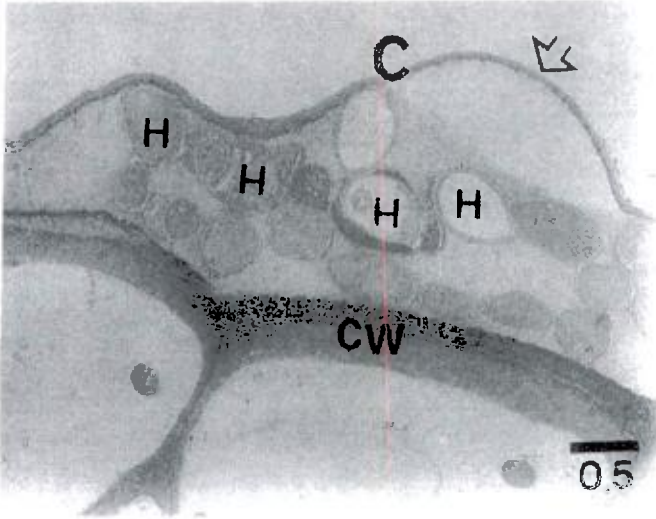


Figure 8. Transmission electron microscope images of changes in mulberry leaf cells infected with *M.*

Elongation (single arrow) of cuticle (C) of mulberry leaf with thriving hyphae from picce in Figure 2.

Ch: chloroplast, CW: cell wall of mulberry, H: hyphae of *M. roridum*.

Figure 8. Images au microscope électronique à transmission des changements dans les cellules de la feuille de mûrier infestée par M.

Allongement (flèche simple) de la cuticule (C) de la feuille de mûrier avec des hyphes robustes du morceau dans la figure 2.

Ch : chloroplaste, CW : paroi cellulaire du mûrier, H : hyphes de *M. roridum*.

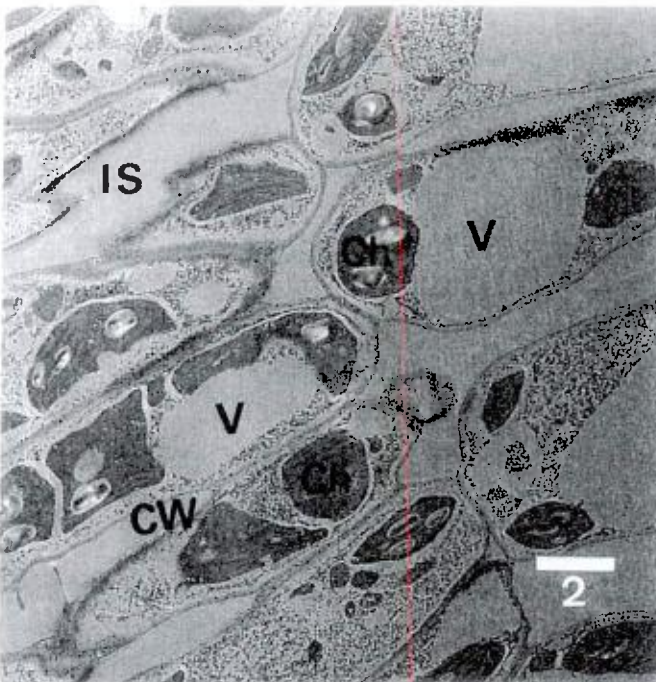


Figure 9. Transmission electron microscope image of palisade cells of mulberry.

The chloroplast (Ch), cell wall (CW), vacuole (V) and intercellular space (IS) are clear.

Figure 9. Image au microscope électronique à transmission des cellules en palissade du mûrier.

Le chloroplaste (Ch), la paroi cellulaire (CW), la vacuole (V) et l'espace intercellulaire (IS) sont clairs.

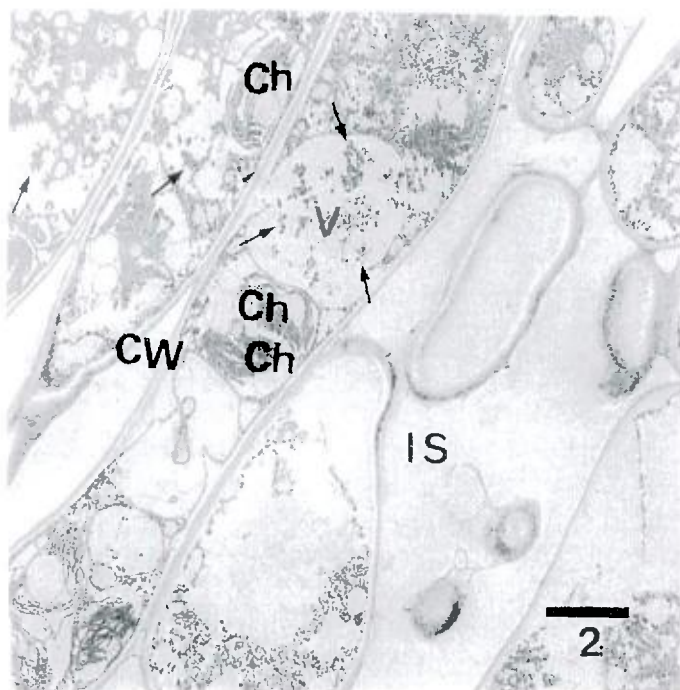


Figure 10. Transmission electron microscope image of palisade cells damaged by toxins produced by *M. roridum* (piece  in figure 2)

Granules (arrow) can be seen in the vacuoles (V) and fibrosed chloroplasts were detected. IS: intercellular space, CW: cell wall.

Figure 10. Image au microscope électronique à transmission des cellules de palissade abimées par les toxines produites par M. roridum (morceau  dans la Figure 2).

Les granules (flèche) peuvent être vus dans les vacuoles (V) et les chloroplastes fibrosés sont détectés. IS: espace intercellulaire, CW: paroi cellulaire.

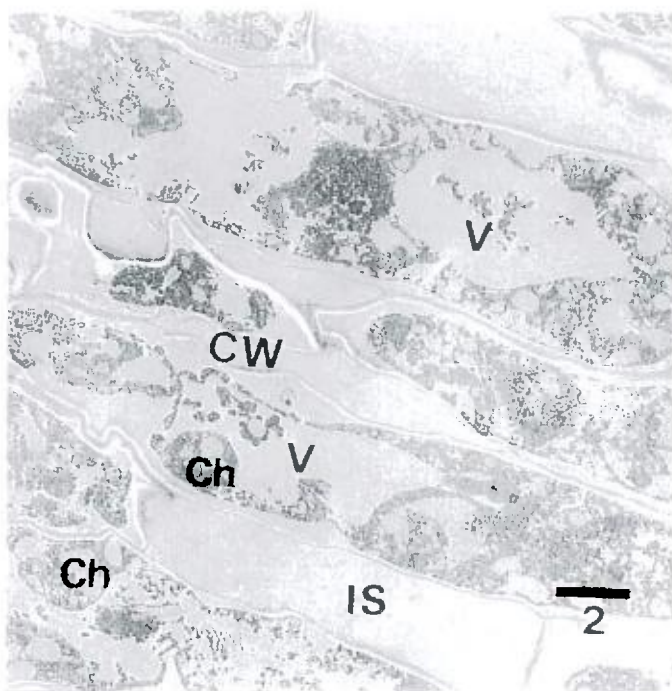


Figure 11. Transmission electron microscope image of palisade cells damaged by toxins produced by *M. roridum* (piece  in Figure 2).

The cell organs are not well demarcated. Arrow: granules, Ch: chloroplast, CW: cell wall, IS: intercellular space, V: vacuole.

Figure 11. Image au microscope électronique à transmission des cellules de palissade abimées par les toxines produites par M. roridum (morceau  dans la Figure 2).

Les organes cellulaires ne sont pas bien démarqués. Flèche: granules. Ch: chloroplaste, CW: paroi cellulaire, IS: espace intercellulaire, V: vacuole.

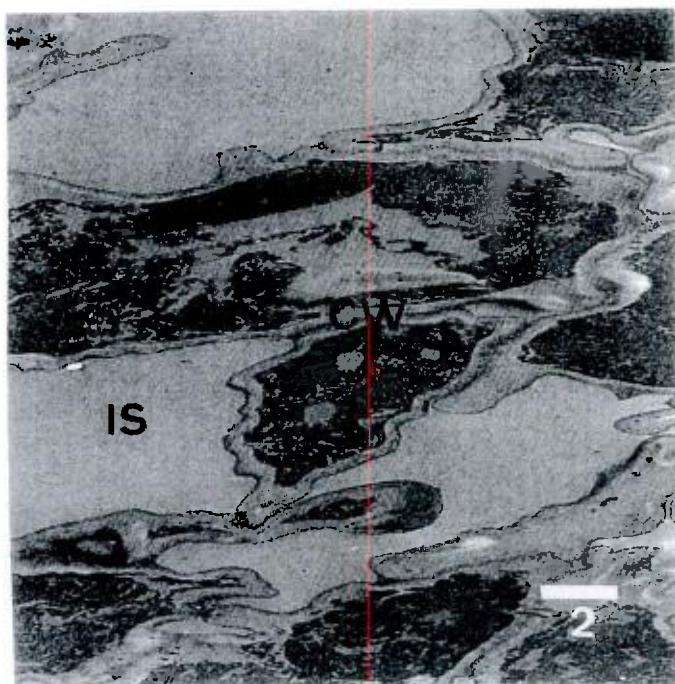


Figure 12. Transmission electron microscope image of palisade cells damaged by toxins produced by *M. roridum* (piece ■ in Figure 2).

The cell wall and intercellular space are not well demarcated and the cells were destroyed.

*Figure 12. Image au microscope électronique à transmission des cellules de palissade abîmées par les toxines produites par *M. roridum* (morceau dans la Figure 2).*

La paroi cellulaire et l'espace intercellulaire ne sont pas bien démarqués et les cellules sont détruites.

were detected in leaves. These results show that the toxins produced by *M. roridum* spread ahead of the hyphal growth of the fungus from the inoculum.

Changes in mulberry leaf cells infected by *M. roridum*:

In TEM images of mulberry cells infected by *M. roridum* in pieces taken from 0 to 4 mm from the border of the lesion, hyphae of *M. roridum* were detected in the cells (Figs 6 and 7). In cells infected by *M. roridum*, areas of low electron density appeared in the cell walls and small particles were begun to be detected in cytoplasts (double arrows in Figures 6 and 7). Elongations of the cuticle of leaf were detected in areas where the hyphae were thriving (Fig. 8).

Cytological changes in cells damaged by toxins produced by *M. roridum*:

In leaves on which no toxins had been dropped, browning was not detected and the cell organs in the palisade cells were distinct. Shape of areas of low electron density in chloroplasts was oval and the areas of low electron density had gradation of electron density (Fig. 9). When the toxins were dropped on a leaf, browning appeared and fibrosed chloroplasts, granulated organs and granules in vacuoles were observed. Especially, chloroplasts were heavily damaged. Shape of areas of low electron density in chloroplasts was round and electron density did not have the gradation of electron density (Fig. 10). The organs in these cells were not well demarcated (Fig. 11) and then cells were destroyed (Fig. 12). Similar trends were observed in spongy cells.

spread ahead of the hyphal growth of *M. roridum*. This result suggests that the spreading toxins damage the mulberry leaf cells and then the hyphae may infect the cells.

Table II. Detection of hyphae of *M. roridum* and brown particles in mulberry cells of lesions or browning induced by the fungus.

Tableau II. Détection des hyphes de M. roridum et des particules marron dans les cellules de mûrier des lésions ou du brunissement induit par le champignon.

		Distance from border of lesion (mm)			
	Inner lesion	0-2	2-4	4-6	6-8
		Distance à partir du bord de la lésion (mm)			
	Lésion interne	0-2	2-4	4-6	6-8
Hyphae / Hyphes	+	+	+	-	-
Particles / Particules	+	+	+	+	+

See lower figure in Figure 3 / Voir figure du bas dans la Figure 3. + Detected / Détecté, - Not detected / Non détecté.

There are many reports on the reactions of plant cells to infections with pathogens (James and Herbert, 1976; Kouno *et al.*, 1980; Ando and Hayama, 1986). Papilla, which is produced as a reaction of host plants to infection with pathogens, is formed in cells of barley infected with *Erysiphe graminis* (James and Herbert, 1976; Kouno *et al.*, 1980). However, the hyphae of *M. roridum* are distinct and no papilla was observed near the hyphae but the appearance of areas of low electron density in parts of the cell wall, as well as elongations of the cuticle were observed in mulberry cells infected with *M. roridum*.

Comparing TEM images of cells infected with *M. roridum* and applied of the toxins, organs in cells of the former were clearer than those of the latter because concentration of the toxins might differ. TEM image of processes of mulberry cell destruction applied with the toxins were cleared: appearances of fibrosis or granulated organs and destructions of organs and cell. Trichothecenes inhibit protein synthesis in mammal (Ueno, 1980). Therefore, the toxins may also inhibit protein synthesis of the organs in mulberry cells.

The cleared behaviour of germination and infection of the fungus in this paper contribute to control the disease and the cleared actions of toxins in infection or developing lesions by *M. roridum* are useful for clarification of mechanisms of the toxins in infection of the fungus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr H. Koga at the Agricultural College of Ishikawa Prefecture, Mr T. Ashizawa of the National Agricultural Research Organization, National Agricultural Research Center for Tohoku

Region, Dr S. Yoshida of the National Institute of Agro-Environmental Sciences and T. Inoue of the National Institute for Agrobiological Sciences for their valuable comments.

REFERENCES

- ANDO Y. & HAMAYA E. (1986) Defense reaction of tea plant against infection of the tea anthracnose fungus. *Study of tea* 69: 35-44.
- JAMALUDDIN & TANDON M. P. (1976) Utilization of polysaccharides by *Myrothecium roridum* and *Alternaria alternata*. *Indian Phytopathol.* 29: 78-79.
- JAMES R. A. & HERBERT, W. I. (1976) Papilla formation: Timing and significance during penetration of barley coleoptiles by *Erysiphe graminis hordei*. *Phytopathology* 67: 455-461.
- KARWASRA S. S. & CHAND J. N. (1983) Effect of nutrition and temperature on spore germination of *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. *Haryana Agric. Univ. J. Res.* 13: 476-477.
- KAWAKITA H., SAIKI T., WEI W., MITUHASHI W., WATANABE K. & SATO M. (2000) Identification of mulberry dwarf phytoplasma in genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatifomis*. *Bacteriology* 90: 909-914.
- KOUNO M., ISHIZAKI H. & KUNHOH H. (1980) Cytological studies on rust fungi (VIII) infection of *Puccinia horiana* P. Hennings on three chrysanthemum cultivars of different resistance levels. *Bull. Univ. Mie* 61: 1-9.
- KOGA H. & KOBAYASHI T. (1980) A whole-leaf clearing and staining technique to observe the invaded hyphae of blast fungus and host response in rice leaves. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46: 679-681.
- KUTI J. O., NG J. T., GROSS K. C. & MOLINE H. E. (1989) Cell wall monosaccharide composition and muskmelon resistance to *Myrothecium roridum* J. *Phytopathol.* 126: 293-304.
- MURAKAMI R. & SHIRATA A. (1998) The toxic components produced by *Myrothecium roridum*, causal fungus of leaf spot of mulberry, and its influence on the pathogenicity. *J. Sci. Jpn.* 67: 57-64.
- MURAKAMI R., YASUI H. & SHIRATA A. (1999) Production of myrotoxin B by *Myrothecium roridum* isolated from *Myrothecium* leaf spot of mulberry in Japan. *J. Sci. Jpn.* 68: 469-477.
- TAKAHASHI K., SEGAWA H. & KOBAYASHI H. (1994) *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium roridum* Tode: Fries. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 60: 122-127.
- UENO Y. (1980) Trichothecene mycology, chemistry and toxicology. *Adv. Nutr. Sci.* 3: 301-353.
- YOSHIDA S. & SHIRATA A. (1997) Effect of mulberry leaf components on conidial germination of mulberry anthracnose fungi, *Colletotrichum dematium* and observation of early infection processes on the mulberry leaf. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.* 18: 79-96.

COMPORTEMENT D'INFESTATION DES CONIDIES DE *MYROTHECIUM RORIDUM* SUR LA FEUILLE DE MURIER ET CHANGEMENTS CYTOLOGIQUES DANS LES CELLULES FOLIAIRES INFESTEES PAR LE CHAMPIGNON

RITSUKO MURAKAMI*, HIROMU KAWAKITA & AKIRA SHIRATA

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-8634, Japon.

Nous avons examiné le comportement de germination conidien, les étapes d'infestation par Myrothecium roridum et les cellules de mûrier auxquelles on a appliqué des toxines ou qui ont été infestées par le champignon. Le pourcentage de germination et la croissance des tubes germinatifs des conidies en suspension dans l'eau sur la surface supérieure intacte (US) de la feuille sont faibles et les conidies ne provoquent pas d'infestation. Les conidies en suspension dans un bouillon de saccharose de pomme de terre sur la surface supérieure intacte de la feuille donnent un pourcentage de germination, une croissance des tubes germinatifs et un pourcentage d'infestation élevés. Les conidies en suspension dans l'eau appliquées sur la surface inférieure (LS) de la feuille infestent 21 heures après l'inoculation et celles appliquées à la surface supérieure ou inférieure des feuilles perforées, infestent 7 heures après l'inoculation. Aux endroits où des lésions provoquées par M. roridum se développent, les toxines produites par le champignon se propagent par la croissance hyphale de l'inoculum jusqu'aux parties saines. Dans les cellules de mûrier infestées par M. roridum, on observe des zones de faible densité électronique dans les parois cellulaires et des allongements de la cuticule de la feuille. Dans les cellules de mûrier bruniées par les toxines de M. roridum, on observe des organes fibrosés ou granulés et par la suite des organes ou des parois cellulaires rompus.

INTRODUCTION

On a signalé *Myrothecium roridum* Tode ex Fries comme un champignon pathogène responsable de la maladie de la tache de la feuille chez le mûrier en 1994 (Takahashi et coll., 1994). Il existe des rapports concernant la germination conidiale de *M. roridum* sur des milieux avec des composants nutritifs variés ou incubés à des températures variées (Jamaluddin et Tandon, 1976 ; Karwasra et Chand, 1983 ; Kutti et coll., 1989) mais pas de rapports concernant la germination conidiale de *M. roridum* sur des plantes et le temps nécessaire à l'infestation.

Nous avons donc examiné le comportement d'infestation des conidies de ce champignon sur les feuilles de mûrier.

Les genres fongiques *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* et *Trichothecium* produisent des époxydes trichothécènes et sesquiterpénoïdes (Ueno, 1980). *M. roridum* produit des toxines sur les feuilles de mûrier (Murakami et Shirata, 1998) et des toxines comme les trichothécènes sur le milieu (Murakami et coll., 1999). Ainsi les toxines produites sur les feuilles de mûrier par ce champignon pourraient appartenir aux trichothécènes. Les trichothécènes sont des inhibiteurs puissants de la synthèse des protéines (Ueno, 1980). Cependant, le rôle des trichothécènes dans l'écologie des champignons qui les produisent n'est pas clair. De plus, il y a eu de nombreux rapports

* National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.

sur la réaction des cellules de la plante hôte à l'infestation par les pathogènes (James et Herbert, 1976 ; Kouno et coll., 1980 ; Ando et Hamaya, 1986) mais pas de rapport sur la réaction des cellules de la feuille de mûrier à l'infestation par *M. roridum*. Il n'y a pas eu de rapport sur les changements dans les cellules de mûrier abimées par les toxines produites par le champignon. Nous avons donc examiné les effets des toxines et de *M. roridum* dans les feuilles de mûrier et les réactions des cellules de la feuille de mûrier infestées par le champignon pour contribuer à l'éclaircissement des fonctions probables des toxines par rapport à la pathogénicité de ce champignon.

MATERIELS ET METHODES

Inoculum :

On utilise *M. roridum* (M9403) isolé dans une mûraie de la Préfecture de Kagoshima, au Japon (Murakami et Shirata, 1998). M9403 est cultivé sur un milieu agar de saccharose de pomme de terre (PSA : 2 % de saccharose et 1,8 % d'agar dans 20 % de bouillon de pomme de terre) à 25° C pendant deux semaines. Les conidies formées sont lavées trois fois avec de l'eau distillée pour enlever les toxines sécrétées par le champignon dans la culture et puis elles sont utilisées pour des tests d'inoculation.

Examen du comportement de germination et d'infestation de *M. roridum* :

Une suspension conidiale (10 µl à raison d'une concentration de 10^5 conidies / ml d'eau) est mise sur la surface supérieure (US) de 3 feuilles intactes ou perforées en utilisant 10 aiguilles. Les conidies sont suspendues (10^5 conidies / ml) dans un milieu de saccharose de pomme de terre (PS : 2 % de saccharose dans un bouillon de pomme de terre à 20 %) et 10 µl de la suspension est aussi mise sur la surface supérieure de 3 feuilles intactes. Les feuilles sont traitées en suivant la méthode de Yoshida et Shirata (Yoshida et Shirata, 1997). Les feuilles traitées sont incubées à 25° C de 1 h à 25 h. Au moment de l'échantillonnage, les feuilles traitées sont pre-fixées dans de la glutaraldehyde à 2 % (0,1 M de tampon phosphate, pH 6,9) pendant la nuit à 5° C, postfixées dans de l'acide osmique à 2 % pendant 3 h à 5° C, déshydratées avec une série éthanol, déplacée par de l'acétate isoamyl, séchées dans un séchoir critique (HCP-1, Hitachi Koki, Tokyo, Japon) et on dépose des particules d'or par la vapeur avec un enducteur rapide (SC-701, Sanyu electron, Tokyo, Japon) et on les observe sous un microscope électronique à balayage (SEM : JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japon). Le pourcentage de germination conidiale et la longueur des tubes germinatifs sont examinés dans 100 conidies pour chaque traitement avec 3 répétitions et le taux de germination moyen et la longueur moyenne des tubes de germination sont calculés.

Pour étudier le pourcentage d'infestation des conidies en suspension dans l'eau, la suspension des conidies (10 µl à raison de 10^5 conidies / ml) est mise sur la surface supérieure de 10 feuilles intactes ou perforées et les conidies suspendues dans du PS (10 µl pour 10^5 conidies / ml) sont mises sur la surface supérieure de 10 feuilles intactes. Les feuilles inoculées sont incubées à 25° C. Chaque traitement est répété 3 fois. L'apparition de lésion sur chaque feuille 7 jours après l'inoculation est prise comme le critère d'évaluation de l'infestation des feuilles par chaque inoculum.

Examen du moment de l'infestation :

On met une suspension conidiale dans l'eau (10 µl à raison de 10^5 conidies / ml) sur la surface supérieure ou inférieure de 10 feuilles intactes ou perforées et puis on les incube à 25° C pendant 1 à 72 h. Les feuilles sont traitées en suivant la méthode de Yoshida et Shirata (Yoshida et Shirata, 1997). Au moment de l'échantillonnage, la suspension conidiale sur la feuille est séchée à l'air. Les feuilles sont recouvertes avec un vernis à ongles clair, séchées et on décolle ensuite le vernis. Ce traitement est répété 3 fois. Les feuilles sont incubées. Puis l'apparition de lésions sur chaque feuille 7 jours après l'inoculation est prise comme le critère d'évaluation de l'infestation des feuilles par chaque inoculum.

Examen du développement des toxines et de la croissance hyphale à partir de l'inoculum dans le développement de la lésion :

Pour examiner le brunissement des cellules par les toxines produites par *M. roridum*, les toxines (10 µl à 100 ppm) sont déposées sur la surface supérieure de 3 feuilles perforées. Les toxines sont produites par *M. roridum* sur PSA à 25° C pendant 1 mois avant de déshydrater la culture.

Les toxines sont extraites de la culture avec du méthanol et l'extrait est évaporé. Le résidu est utilisé comme toxines. Les zones brunies 7 jours après le traitement sont utilisées. On utilise des séries de morceaux provenant des feuilles brunies (2 × 5 mm) à l'endroit où les toxines ont été déposées et de parties saines de la feuille (comme le montre la Figure 1).

Pour examiner les cellules dans les zones de développement des lésions, les lésions sont utilisées comme inoculum dans cette expérience afin d'éviter l'introduction de n'importe lesquelles des toxines sécrétées par le champignon dans la culture. Une culture de *M. roridum* sur du PSA est mise sur la surface supérieure de 3 feuilles jusqu'à la formation des lésions. Les morceaux de la lésion (3 × 3 mm) sont à nouveau mis sur la surface supérieure de 3 feuilles. Des morceaux (2 × 5 mm comme dans la Figure 2) sont découpés sur les nouvelles lésions 10 jours après l'inoculation. Les morceaux découpés sont examinés sous un microscope et on regarde les hyphes de *M. roridum* ou les indications de l'effet des toxines.

Les morceaux découpés sont traités en suivant la méthode de Koga et Kobayashi (1980) pour les préparer pour l'observation microscopique. Les morceaux sont bouillis dans de l'alcool latophénol [0,1 % de phénol (p/v), 11,1 % d'acide lactique (p/v), 88,9 % d'éthanol (v/v)] pendant 5 minutes puis bouillis pendant 5 minutes dans de l'eau distillée avec 0,75 % de chlorure de sodium (p/v) et 0,25 % d'acide acétique (v/v). Les morceaux sont déshydratés avec une série éthanol, trempés dans du méthyl, colorés avec 0,2 % de violet de méthyle (dans du salicylate de méthyl), décolorés avec du salicylate de méthyl et observés sous un microscope optique (OPTIPHOT-2, Nikon, Tokyo, Japon).

Examen du mûrier infesté par les cellules de *M. roridum* et croissance des hyphes dans les cellules :

Pour étudier les changements dans les cellules infestées par *M. roridum*, les cellules dans les lésions en développement sont observées sous un microscope électronique à balayage (TEM : JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japon). On suit la méthode de Kawakita et coll. pour la préparation de l'échantillon pour le microscope électronique à transmission (Kawakita et coll., 2000). Une culture de *M. roridum* sur du PSA est mise sur la feuille de mûrier jusqu'à ce qu'une lésion se forme. La lésion est mise à nouveau sur la surface supérieure des feuilles comme inoculum. Des morceaux (2 × 5 mm) sur les bords de la nouvelle lésion 10 jours après l'inoculation (comme dans la Figure 2) sont préfixés dans du glutaraldéhyde (0,1 M de tampon phosphate, pH 7,3) pendant 2h à 4° C, postfixés dans 1 % d'acide osmique pendant 1,5 h à 4° C, déshydratés dans une série éthanol et inclus dans de la résine Epon 812. On réalise des sections ultra-fines avec un ultramicrotome (LKB 4800, LKB Products, Bromma, Suède) après coloration avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb.

Changements cytologiques dans les cellules abîmées par les toxines :

Les toxines produites par *M. roridum* (10 µl à 100 ppm) sont déposées sur des feuilles de mûrier. Des morceaux (2 × 5 mm, voir Figure 1) ayant brunie 7 jours après le traitement sont retirés de la feuille brunie pour l'examen des changements dans les cellules abîmées par les toxines. Les feuilles sont observées sous un microscope électronique à transmission. Les feuilles qui n'ont pas été enduites de toxines, sont traitées de la même manière comme témoins.

RESULTATS

Comportement de germination ou d'infestation de *M. roridum* :

Le pourcentage de germination et la croissance des tubes germinatifs des conidies en suspension dans l'eau sur la feuille intacte sont les plus faibles, et le pourcentage de germination et la croissance des tubes des conidies en suspension dans du PS sur la feuille intacte sont les plus élevés (Fig. 3). quinze heures après l'inoculation, le taux de germination des conidies en suspension dans l'eau sur une feuille perforée dépasse 90 % et la longueur des tubes germinatifs de ces conidies en suspension dans du PS sur une feuille intacte est de plus de 90 % et la longueur des tubes fait plus de 100 μ m. Dix h après l'inoculation, le taux de germination des conidies en suspension dans du PS sur une feuille intacte est supérieur à 90 % et la longueur des tubes est supérieure à 100 μ m. Par opposition, le taux de germination de conidies en suspension dans l'eau sur la feuille intacte n'est que de 47,8 % et la longueur des tubes germinatifs ne fait que 73 μ m 25h après l'inoculation.

Les conidies en suspension dans l'eau n'infestent pas la surface supérieure de la feuille de murier intacte mais infestent la surface supérieure de la feuille perforée à 25 %. Les conidies en suspension dans du PS infestent la surface supérieure des feuilles intactes à 100 %.

Ainsi, les conditions qui entraînent des taux de germination et de croissance des tubes germinatifs des conidies élevés pourraient entraîner des taux d'infestation élevés par les conidies.

Période d'infestation :

21h après l'inoculation, les conidies en suspension dans l'eau n'infestent pas la surface supérieure de la feuille intacte mais infestent la surface inférieure de la feuille intacte (Tableau I). 7 heures après l'inoculation, les conidies de *M. roridum* infestent la surface supérieure et inférieure des feuilles perforées.

Croissance des hyphes et développement des toxines de *M. roridum* dans les lésions en développement :

Avec la méthode de Koga et Kobayashi (1980), les hyphes de *M. roridum* et l'effet des toxines dans les feuilles de murier sont facilement détectables.

Quand les toxines sont déposées sur la surface supérieure des feuilles, cela induit un brunissement (Fig. 4 à gauche) et on détecte des particules marron dans les feuilles claires (Fig 4 à droite). On ne détecte pas de particules marron quand on ne dépose pas de toxines sur les feuilles. Les particules marron sont induites par l'application des toxines à une moindre concentration que la concentration la plus faible induisant le brunissement des feuilles de murier et elles sont détectées plus vite que le brunissement. Donc, les particules marron sont utiles comme indication de l'effet des toxines. Les particules marron sont détectées le long des idioblastes avec l'application de toxines à de faibles concentrations. Quand 10 μ l de toxines sont appliquées sur les feuilles, un brunissement commence à apparaître 2 jours après l'application de 100 ppm de toxines, 3 jours avec 50 ou 25 ppm et 5 jours avec 10 ppm. Le brunissement n'est pas induit par moins de 5 ppm. Les particules marron sont induites 20 minutes après l'inoculation avec 100 ou 50 ppm des toxines, 1 h avec 25 ppm, 3h avec 10 ppm, 9h avec 5 ppm, 11h avec 1 ppm et 15h à 0,5 ou 0,25 ppm. Les particules marron ne sont pas induites par moins de 0,125 ppm de toxines. Les particules marron sont utilisées comme indicateur des effets des toxines.

La présence d'hyphes de *M. roridum* et de particules marron dans les morceaux découpés sur les lésions foliaires en développement est présentée dans le Tableau II. Quand *M. roridum* est inoculé sur la surface supérieure de la feuille, on détecte une hyphe rouge et des particules marron dans les lésions foliaires. Les hyphes et les particules marron sont détectés dans les feuilles dans les parties intérieures de la lésion et de 0 à 2 mm du bord de la lésion. Dans les morceaux pris à 2 et à 4mm du bord de la lésion (Fig. 5 à gauche), on détecte les extrémités de l'hyphe de *M. roridum* et les particules marron dans les feuilles (Fig. 5—à droite). A 4 mm du bord de la lésion, on ne détecte que des particules marron dans les feuilles. Ces résultats montrent que les toxines produites par *M. roridum* se répandent à partir de la croissance hyphale du champignon de l'inoculum.

Changements dans les cellules de la feuille de mûrier infestées par *M. roridum* :

Dans les images TEM des cellules de mûrier infestées par *M. roridum* des morceaux pris de 0 à 4 mm du bord de la lésion, on détecte les hyphes de *M. roridum* dans les cellules (Figs 6 et 7). Dans les cellules infestées par *M. roridum*, des zones de faible densité électronique apparaissent dans les parois cellulaires et on commence à détecter de petites particules dans les cytoplasmes (double flèches dans les Figures 6 et 7). Les allongements de la cuticule de la feuille sont détectés dans les zones où les hyphes sont florissantes Fig. 8).

Changements cytologiques dans les cellules abîmées par les toxines produites par *M. roridum* :

Dans les feuilles sur lesquelles on n'a pas déposé de toxines, on ne détecte pas de brunissement et les organites des cellules palissadiques sont distincts. La forme des zones de faible densité électronique dans les chloroplastes est ovale et les zones de faible densité électronique montrent une gradation de la densité électronique (Fig. 9). Quand les toxines sont déposées sur une feuille, un brunissement apparaît et on observe des chloroplastes fibrosés, des organites granulés et des granules dans les vacuoles. Les chloroplastes surtout sont très sévèrement abîmés. La forme des zones de faible densité électronique dans les chloroplastes est ronde et il n'y a pas de gradation de la densité électronique (Fig. 10). Les organites dans ces cellules ne sont pas bien démarqués (Fig. 11) et les cellules sont détruites (Fig. 12). On observe des tendances similaires dans les cellules spongieuses.

DISCUSSION

Certaines conidies de *M. roridum* en suspension dans l'eau sur la surface supérieure de la feuille intacte germent mais ne provoquent pas d'infestation. Les conidies dans du PS sur la surface supérieure intacte de la feuille donnent un pourcentage de germination, une croissance des tubes germinatifs et un pourcentage d'infestation élevés. *M. roridum* (M9403) produit des toxines qui promeuvent l'infestation par le champignon (Murakami et Shirata, 1998 ; Murakami et coll., 1999). Les conidies suspendues dans du PS infestent les feuilles parce que les conidies pourraient produire des toxines dans le PS. Nous considérons que les conidies lavées pourraient n'infester les feuilles perforées que quand elles peuvent produire assez de toxines pour le faire. Nous avons déterminé que les toxines se développent à partir de la croissance hyphale de *M. roridum*. Ce résultat suggère que les toxines qui se répandent abîment les cellules de la feuille de mûrier avant que les hyphes n'infestent les cellules.

Il y a eu de nombreux rapports sur les réactions des cellules des plantes aux infestations par les pathogènes (James et Herbert, 1976 ; Kouno et coll., 1980 ; Ando et Hayama, 1986). Les papilles qui sont produites comme une réaction des plantes hôtes à l'infestation par les pathogènes, se forment dans les cellules de l'orge infestée par *Erysiphe graminis* (James et Herbert, 1976 ; Kouno et coll., 1980). Cependant, les hyphes de *M. roridum* sont distincts et on n'observe pas de papille près des hyphes mais on observe l'apparition de zones de faible densité électronique dans la paroi cellulaire, ainsi que les allongements de la cuticule dans les cellules de mûrier infestées par *M. roridum*.

En comparant les images TEM des cellules infestées par *M. roridum* et celles auxquelles on a appliqué des toxines, les organites cellulaires des premières sont plus clairs que ceux des dernières parce que la concentration des toxines doit différer. L'image TEM des processus de destruction de la cellule de mûrier à laquelle on a appliqué des toxines a été éclairci : apparitions de fibrose ou d'organites granulés et destructions des organites et de la cellule. Les trichothécènes inhibent la synthèse des protéines chez les mammifères (Ueno, 1980). Donc, les toxines pourraient aussi inhiber la synthèse des protéines des organites dans les cellules de mûrier.

L'éclaircissement du comportement de germination et d'infestation du champignon apporté par ce travail contribue à lutter contre la maladie et l'éclaircissement des actions des toxines dans l'infestation ou le développement des lésions par *M. roridum* est utile pour comprendre les mécanismes d'action des toxines dans l'infestation par ce champignon.

ROOT MEALY BUG (*PARAPUTO* SP.) OF MULBERRY IN DARJEELING HILLS—ITS SEVERITY, BIOLOGY AND CONTROL

SUBRATA BISWAS*, D.DAS, S. CHATTOPADHYAY**, S.K.DAS** & K.MANDAL

Regional Sericultural Research Station, 7th Mile, Kalimpong—734 301, West Bengal, India.

Paraputo sp. (Pseudococcidae : Homoptera) was found to affect mulberry (*Morus alba* L.) in all the sericultural areas of Darjeeling hills of West Bengal, India during the period 1998 – 2000. However, of the places, Pedong was found to be the most affected one. The affected mulberry became vulnerable to the attack of several fungal pathogens, viz, *Fusarium solani*, *F.concolor*, *Phomopsis mori* and *Colletotrichum gloeosporoides*. The mealy bug occurred throughout the year, although its population decreased simultaneously with the fall in atmospheric temperature in winter months. Sometimes the bug infested roots of common weeds like, *Bidens pilosa*, *Artemisia vulgaris* and *Cyperus* sp. in mulberry garden.

In vitro the root mealy bug grew well on sprouted potato tuber. Bee honey and jaggery were found as its alternate food for rearing. The adult female gave birth directly to nymphs under laboratory conditions. The number of nymphs given birth to was 30 ± 9.30 per female. The nymphs developed into both male and female adults. Male required 29.25 to 39.5 days to complete its life cycle while female required 33.5 to 43.73 days.

Root mealy bug was effectively controlled with the use of 100ml. solution of Endosulfan (0.01% a.i.) at the base of mulberry plant. Bioassay study with silkworm rearing indicated that the use of Endosulfan had no residual toxicity in leaf due to its non-systemic action.

Keywords: Root mealy bug, *Paraputo* sp., mulberry, *Morus alba*, severity, secondary infection, alternate hosts, biology, control, bioassay.

INTRODUCTION

Paraputo sp. (List no. 11870 Asia, Collection No. 23010, IIE, London) popularly known as “Root mealy bug” has been found to be a noxious pest of mulberry damaging root system of the young ones in Darjeeling hills of West Bengal, India. The affected mulberry becomes yellow and stunted in growth (Misra et al., 1996). Wang (1982) identified *P. speciosus* from *Camellia oleifera* (Oleosa) in China. Gaume et. al.(2000) observed a mutual relationship of *P. anomala* with ant (*Aphomyrmex* *affer*) for its dispersal. Perusal of literature indicates that, so far, very less work has been done on *Paraputo* sp., particularly on that affecting mulberry. Hence, in the present investigation an attempt has been made to understand the severity of *Paraputo* sp. in mulberry of Darjeeling hills, its biology and control measures.

* Research Extension Centre, Central Silk Board, Bagmara, India.

** Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India.

MATERIALS AND METHODS

Study of severity of root mealy bug:

Severity of root mealy bug (*Paraputo* sp.) in mulberry (*Morus alba* L.) was studied by a survey conducted for three years (1998 – 2000) during four seasons [Early Spring (March), Spring (April – May), Rainy (June – July) and Autumn (Sept. – Oct.)] in seven major sericultural areas, viz. Bijonbari (altitude : 2500 ft. MSL), Gitdabbling (4592 ft. MSL), Gorubathan (500 ft. MSL), Kalimpong (4100 ft. MSL), Kurseong (4860 ft. MSL), Lingsey (3900 ft. MSL) and Pedong (4700 ft. MSL) of Darjeeling hills of West Bengal, India. The soil at the base of the mulberry was dug upto 23 cm. depth at 10 different sites in each of 5 farmers' field for every area. Root mealy bug infestation was visually estimated to determine percent infestation of plant and number of mealy bug per plant. A separate study was done at 3 sites in Kalimpong to understand monthwise severity trends of root mealy bug. In each site 15 plants (Var.- BC259) of five farmers' field was considered for root mealy bug study, as described. Simultaneous occurrence of root mealy bug in common weeds of mulberry field was noted. Meteorological data were recorded regularly for correlation study.

Study of Biology of root mealy bug :

Biology of root mealy bug was studied in vitro. The mealy bug reared on sprouted potato tuber under laboratory condition ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) following the method of Gautam and Kataria (1986). Single newborn nymph was reared on sprouted bud kept by trimming other buds. Inoculated potato was kept in rearing cage covered with muslin cloth. Regular observation was made under a stereomicroscope (Wild M8, Leica, Heerbrugg, AG., Switzerland) to determine nymphal stage and period. Food habit was studied separately on petri dishes, keeping in rearing cage. Same aged nymphs (2nd instar) were provided with direct supply of bee honey, jaggery (a dark crude sugar made from the sap of sugarcane) and sucrose (10%) solution on a folded filter paper and observed the growth, visually by hand lens. Associates of root mealy bug were studied in laboratory. The infested plant parts were brought to laboratory for isolation of secondary pathogens followed by inoculation in potato dextrose agar medium, aseptically and observation was done on them both visually and under diaplan microscope (Leitz Diaplan, Wild Leitz GmbH, D-6330, Wetzlar, Germany). The fungal culture and infected portion of mulberry were sent to Indian Type Culture Collection (Fungi), Division of Plant Pathology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi for identification.

Study of efficacy of pesticides on mulberry tree:

To study the efficacy of pesticide, a field experiment was conducted with one year old plants of BC259 variety, arranging them in Randomised Block Design in four replicated plots. Each plot, consisted of 20 plants, was maintained following fertilizer schedule (N-150 Kg., P-50 Kg. and K-50Kg./h/y), as recommended for hills. Pesticides of four different groups, viz., Carbofuran (Carbamate), Dimethoate (Organophosphorus), Endosulfan (Organochlorine) and Neem oil cake (Natural) were applied to the basal soil after digging for evaluation. The root mealy bug infestation was estimated on the same day just before pesticide application for determining initial status and after 1, 3 and 6 months of pesticide application. Different concentrations (0.01%, 0.05%, 0.1% and 0.2% a.i.) of the most effective pesticide (Endosulfan) were applied at the basal soil @ 100 ml. solution/plant in a similar separate experiment. Observation on root mealy bug status was made as described. A check without pesticide application was kept for each set of experiments. The replicated raw data were subjected to analysis of variance. Critical difference at 5% level was determined to test the significance of difference between two treatment means.

Study of the effect of pesticides on the silkworm:

To understand the residual toxicity level in leaves for silkworm feeding, a bioassay study was conducted. Bivoltine silkworm (hybrid – NB4D2 x KA) was reared upto the completion of first two

instars following the method of Krishnaswami et al., 1973. Leaves of pesticide applied variety (Var.-BC259) were fed to silkworm after 10 days of its application. Two disease free layings were reared for each treatment. Number of eggs and hatched worms were counted soon after hatching. Further, when most of the larvae reached 3rd instar, stage wise larval counts were noted.

RESULTS AND DISCUSSION

Paraputo sp. affected mulberry (*Morus alba* L.) in all the sericultural areas of Darjeeling hills with high degree of infestation during the period 1998 – 2000 (Table I).

Table I. Root mealy bug infestation in mulberry (*Morus alba*) at different sericultural areas of Darjeeling hills during different years. *

*Tableau I. Infestation par la cochenille de la racine chez le mûrier (*Morus alba*) dans différentes zones sérícolas des collines de Darjeeling au cours de différentes années. **

Sericultural area	1998		1999		2000		Mean Moyenne	
Zone séricole	PI	Number Nombre	PI	Number Nombre	PI	Number Nombre	PI	Number Nombre
Bijonbari	44.73 (±6.08)	6.62 (±1.64)	27.45 (±4.53)	5.25 (±3.88)	24.17 (±13.64)	1.62 (±0.91)	32.11 (±4.99)	4.50 (±1.67)
Gitdabbling	24.05 (±17.86)	4.62 (±2.0)	33.66 (±7.33)	7.94 (±3.21)	66.41 (±17.01)	19.63 (±11.65)	41.37 (±1.44)	10.73 (±4.99)
Gorubathan	ND	ND	20.81 (±20.88)	4.33 (±5.87)	47.92 (±17.11)	19.71 (±16.32)	34.37 (±8.12)	11.52 (±5.76)
Kalimpong	60.63 (±36.48)	9.30 (±5.90)	55.02 (±38.43)	9.43 (±9.89)	38.93 (±13.24)	2.91 (±1.92)	51.52 (±20.85)	7.21 (±4.44)
Kurscong	29.17 (±6.57)	2.38 (±1.95)	33.0 (±11.41)	2.79 (±0.90)	38.03 (±13.70)	2.65 (±1.64)	33.40 (±5.82)	2.61 (±0.95)
Lingsey	59.55 (±9.59)	2.90 (±1.18)	40.27 (±8.91)	15.96 (±5.72)	66.85 (±5.45)	5.71 (±2.44)	55.56 (±5.73)	8.19 (±2.56)
Pedong	80.0 (±24.49)	12.71 (±10.14)	73.55 (±21.24)	14.21 (±13.28)	64.0 (±5.66)	5.81 (±3.23)	72.52 (±9.19)	10.91 (±6.93)

* Data incorporated in the table are the mean value of four seasons with SD in parentheses. **PI** – Percent plant infested, **Number** – Number of root mealy bug per plant.

* Les données incorporées dans le tableau sont la valeur moyenne de quatre saisons avec l'écart type entre parenthèses. **PI** – Pourcentage de plants infestés, **Nombre** – Nombre de cochenilles par plant.

ND – Not determined / Non déterminé.

Table II. Root mealy bug infestation in mulberry during different months.

Tableau II. Infestation par la cochenille de la racine chez le mûrier au cours de différents mois.

Month/Year	Root mealy bug infestation		Meteorological data				Total Rainfall (mm)
	Plant infested (%)	No. of bug / plant	Temperature (° C)		RH (%)		
			Max.	Min.	Max.	Min.	
Mois / Année	Infestation par la cochenille		Données météorologiques				Précipitations totales (mm)
	Plante infestée (%)	Nbre de cochenilles / plant	Temperature (° C)		HR (%)		
			Max.	Min.	Max.	Min.	
Aug.'1999	54.2	15.1	26.7	20.6	96	71	609.7
Sep.'1999	50.0	24.0	27.4	19.8	96	70	273.8
Oct.'1999	41.7	9.3	26.0	17.5	95	50	131.0
Nov.'1999	41.6	7.79	22.7	14.7	95	55	31.0
Dec.'1999	40.92	2.83	20.04	9.52	89	38	2.5
Jan.'2000	37.92	1.75	17.68	8.84	94	45	5.5
Feb.'2000	41.96	0.42	17.3	9.0	94	28	18.6
Mar.'2000	45.83	2.99	22.7	12.6	94	26	5.6
Apr.'2000	52.08	2.75	25.71	16.71	95	39	58.9
May' 2000	47.92	6.45	26.64	19.84	96	62	69.8
Jun.'2000	54.17	10.62	27.2	21.2	100	65	263.8
Jul.'2000	62.50	12.77	26.2	21.8	100	70	297.0
Aug.'2000	60.42	23.27	26.54	21.62	100	71	358.19
Sep.'2000	64.58	23.30	25.71	19.88	100	53	228.2
Oct.'2000	62.42	7.54	25.7	17.6	100	38	44.5
Nov.'2000	62.50	7.98	21.6	14.4	100	45	3.5
Dec.'2000	52.08	8.70	19.6	10.2	88	46	0
Jan.'2001	62.50	7.44	17.6	9.36	100	46	0
Feb.'2001	41.66	3.99	19.3	11.5	100	40	9.7
Mar.'2001	54.17	4.62	23.3	13.1	90	33	0
Apr.'2001	52.08	9.75	27.0	16.6	91	52	29.3

Table III. Fungal associates with root mealy bug infested mulberry.

Tableau III. Champignons associés chez le mûrier infesté par la cochenille de la racine.

Fungal pathogen	Type of damage
Pathogène fongique	Type de dégât
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Damage mainly occurred on the aerial parts of root mealy bug infested plant. Severe anthracnose disease symptoms appeared on the leaf until the plant died. <i>Les dégâts se produisent principalement sur les parties aériennes de la racine du plant infesté par la cochenille. Des symptômes sévères d'anthracnose apparaissent sur la feuille jusqu'à ce que la plante meure.</i>
<i>Fusarium concolor</i>	Pinnatal bodies appeared on outside surface of stem barks. <i>Des corps pinnotaux apparaissent sur la surface extérieure de l'écorce de la racine.</i>
<i>Fusarium solani</i>	Root and stem barks of underground portion became rotten. Necrotic lesions on leaf appeared during aerial part infection. <i>L'écorce de la racine et de la tige de la partie sous-terrainne pourrit. Des lésions nécrotiques apparaissent sur la feuille pendant l'infestation de la partie aérienne.</i>
<i>Phomopsis mori</i>	Inside surface of stem bark decayed. <i>La surface intérieure de l'écorce de la tige pourrit.</i>

However, of the places, Pedong was found to be the most affected one with mean percent infestation of plant 72.52 and mean number of bugs per plant 10.91. The mealy bug occurred on mulberry throughout the year although its population decreased with the fall in temperature during winter months (Table II). The infested mulberry showed vulnerability to the attack of several fungal pathogens (Table III). Pathogens, like, *Fusarium solani* (Ref. No. 3923.99, IARI, New Delhi), *F. concolor* (Ref.No. 4384.2K., IARI), *Phomopsis mori* (Ref.No. 4384.2K., IARI) and *Colletotrichum gloeosporioides* (Ref. No. 3920.99, IARI) were identified from the root mealy bug affected plant. The root and stem bark decayed with simultaneous severe anthracnose disease, incited by *C.gloeosporioides*, on aerial parts until the plant died. Misra et al. (1996) reported encasement of white fungal mycelia at the root mealy bug affected mulberry stump and root regions. Hill (1987) suggested that citrus mealy bug (*Planococcus citri*) made the plant weak at first by feeding, and then the debilitated plant became susceptible to fungal attack. In this study, root mealy bug was found to occur on the roots of common weeds like *Bidens pilosa*, *Artemisia vulgaris* and *Cyperus* sp. in mulberry garden during different times (months). Of the weeds, *Bidens pilosa* was found to be the most infested one where number of bug per plant was observed 0.45 ± 0.95 . This suggests that *Paraputo* sp. is a polyphagous pest like other root mealy bugs of various plants (Hill, 1987).

Table IV. Life cycle of *Paraputo* sp. infesting mulberry of Darjeeling hills.Tableau IV. Cycle de vie de *Paraputo* sp. infestant le mûrier des collines de Darjeeling.

Particular	Number/Period (in days)
Caractère	Nombre / Période (en jours)
Number of egg layings/female <i>Nombre de pontes / femelle</i>	0
Number of nymph layings/female <i>Nombre de pontes de nymphes / femelle</i>	30.0 ± 9.30
Number of instars / <i>Nombre d'âges</i>	
Female / <i>Femelle</i>	3
*Male / <i>Mâle</i>	4
Period of 1 st instar / <i>Durée du 1er âge</i>	10.13 ± 2.39 to 13.27 ± 2.66
Female / <i>Femelle</i>	
*Male / <i>Mâle</i>	-do-
Period of 2 nd instar / <i>Durée du 2ème âge</i>	8.4 ± 3.18 to 10.87 ± 3.42
Female / <i>Femelle</i>	
*Male / <i>Mâle</i>	-do-
Period of 3 rd instar / <i>Durée du 3ème âge</i>	
Female / <i>Femelle</i>	15.0 ± 3.05 to 20.0 ± 3.85
Male / <i>Mâle</i>	4.5 ± 1.20 to 6.4 ± 1.60
Period of 4th instar / <i>Durée du 4ème âge</i>	
Female / <i>Femelle</i>	Nil / <i>Nul</i>
Male / <i>Mâle</i>	7.63 ± 1.51 to 10.25 ± 2.12

* No distinction observed between male and female during 1st and 2nd instars. Data with SD are of the mean of 15 completed life cycles as studied during two periods August to September and December to February.

* Pas de distinction observée entre les mâles et les femelles pendant les 1^{er} et 2^{ème} âges. Les données avec l'écart type sont la moyenne de 15 mesures aux deux périodes d'août à septembre et de décembre à février.

Root mealy bug of mulberry grew well on sprouted potato tuber although its colonization was to some extent slow. Amongst the other foods, bee honey and jaggery were preferred by it. In bee honey and jaggery, although vigorous growth was observed for the nymphs of 2nd instar onwards upto the stage of delivery of adult female, new born nymphs did not survive long. *Paraputo* sp. under laboratory condition (24 ± 2° C) gave birth directly to nymphs (crawlers). They remained congregated and protected underneath the mother's body for a day or two before developing waxy covering on them.

Table V. Evaluation of pesticides in root mealy bug control during different times after application in mulberry.

Tableau V. Evaluation de pesticides pour lutter contre la cochenille de la racine à différentes périodes après l'application sur le mûrier.

Pesticide & dose	Percent infestation of plant				Number of root mealy bug/plant			
	Initial status	1 month	3 month	6 month	Initial status	1 month	3 month	6 month
	<i>Statut initial</i>	<i>1er mois</i>	<i>3ème mois</i>	<i>6ème mois</i>	<i>Statut initial</i>	<i>1er mois</i>	<i>3ème mois</i>	<i>6ème mois</i>
	<i>Pourcentage d'infestation de la plante</i>				<i>Nombre de cochenilles de la racine / plant</i>			
Carbofuran (3% a.i.) 2g /plant	97.5	11.45	46.16	36.34	37.76	0.35	4.90	3.15
Dimethoate (0.2% a.i.) 100 ml/ plant	97.23	55.56	81.70	80.56	41.11	5.31	28.83	25.28
Endosulfan (0.2% a.i.) 100 ml / plant	89.38	3.13	0	15.63	32.51	0.03	0	0.57
Ncem oil cake 100g / plant <i>Huile de margousier</i> 100g / plant	85.0	77.5	85.0	82.5	28.48	25.15	23.93	30.93
Control (without pesticide) <i>(Témoin sans pesticide)</i>	95.83	88.54	89.38	90.83	32.22	20.40	29.21	23.83
CD at 5%	NS	36.65	21.54	28.45	NS	5.46	11.04	21.91

The present findings suggests that *Paraputo* sp. is ovoviviparous or viviparous but not an oviparous insect. Beardsley (1959, 1965) reported that pineapple mealy bug (*Dysmicoccus brevides*) gave birth to young and suggested as ovoviviparous. Further, *Pseudococcus odonidum* (= *P. longisporium*) does not form an egg sac and gave birth to nymphs, indicating viviparity (Metcalf and Flint, 1973). In the present investigation mealy bug was found as bisexual. Nymphs developed into both male and female adults. Males were characterized by one pair of wings, shorter in size than female and very few in numbers. While, females were plump and convex in body shape covered with white waxy mealy substances. Female adult went through three nymphal stages before becoming an adult, while male went through four stages. Gautam and Kataria (1986) also reported 3 – 4 instars incase of white tailed mealy bug *Ferrisia virgata*.

Table VI. Efficacy of different concentrations of Endosulfan solution in root mealy bug control during different times after application in mulberry.

Tableau VI. Efficacité de différentes concentrations de solution d'Endosulfan chez la cochenille de la racine pendant différentes périodes après l'application chez le mûrier.

Concentration (% a.i.)	Percent infestation of plant				Number of root mealy bug / plant			
	Initial	1	3	6	Initial	1	3	6
		month	month	month		month	month	month
	<i>Pourcentage d'infestation de la plante</i>				<i>Nbre de cochenilles de la racine / plant</i>			
	<i>Début</i>	<i>1^{er} mois</i>	<i>3^{ème} mois</i>	<i>6^{ème} mois</i>	<i>Début</i>	<i>1^{er} mois</i>	<i>3^{ème} mois</i>	<i>6^{ème} mois</i>
0.2	76.25	4.38	6.38	15.60	32.50	0.06	0.08	0.33
0.1	92.5	10.0	7.50	10.63	30.13	1.08	0.70	0.95
0.05	97.5	5.0	8.75	10.63	42.35	0.58	0.90	0.90
0.01	83.75	29.29	18.57	12.32	26.98	1.41	0.91	0.86
Control / Témoin	95.83	88.54	92.71	90.83	32.22	20.40	29.31	23.83
CD at 5%	NS	18.92	12.02	16.09	NS	2.22	4.56	6.03

The present study showed, that, for completion of life cycle female required 33.53 to 43.73 days, while, male required 29.25 to 39.5 days (Table IV). Instar time-period of nymph was found to be influenced by the seasonal variations and amongst the individuals. Field evaluation of pesticides of four different groups indicated that both Endosulfan and Carbofuran were effective to control root mealy bug in mulberry for longer period (Table V).

However, the former one was better than the latter. The Organophosphorus insecticide, Dimethoate was able to control root mealy bug for a shorter period (upto 1 month after application) only. Moreover, it was observed that Endosulfan at very low concentration (0.01% a.i.) was effective as usual, as with high concentration, to control root mealy bug significantly for a period of 6 months (Table VI). This high efficacy of Endosulfan was due to its long persistent and stable nature in soil and under sunlight (Pedigo, 1989).

Table VII. Bioassay with silkworm (hybrid – NB4D2 × KA) rearing with the leaves used from mulberry plant grown on pesticides applied soil during root mealy bug control.

Tableau VII. Evaluation biologique par l'élevage du ver à soie (hybride NB4D2 × KA) des feuilles de mûriers cultivés avec des pesticides contre la cochenille de la racine.

Pesticide & dose	Period after pesticide treatment	No of eggs/ 2 dfls	No. of hatched worms	Date & time of 1 st feeding	Stage wise number of larvae counted on 4.9.2000				Survivability (%)
					1 st instar	2 nd instar	3 rd instar	Total	
	<i>Période après le traitement au pesticide</i>	<i>Nbre d'œufs / ponte saine</i>	<i>Nbre de vers éclos</i>	<i>Date & heure du 1^{er} repas</i>	<i>Nbre de larves en fonction du stade comptées le 4.09.2000</i>				<i>Survie (%)</i>
					<i>1er âge</i>	<i>2ème âge</i>	<i>3ème âge</i>	<i>Total</i>	
Carbofuran (3% a.i.) 2g / plant	10	855	804	28.8.2000 10 am	20	408	0	428	53.23*
Endosulfan (0.1% a.i.) 100 ml/plant 10 am	10	939	908	28.8.2000 10 am	0	0	840	840	92.51
Control / Témoin	-	1139	1116	28.8.2000 10 am.	0	0	823	823	73.75

*The larvae were of different sizes, showed tendency to go out from the rearing tray and leaf was not consumed properly. / Les larves sont de tailles différentes, tendent à s'échapper du plateau d'élevage et la feuille n'est pas consommée correctement.

Bioassay study with silkworm rearing indicated that Endosulfan had no residual toxicity in leaf, while, Carbofuran applied mulberry plant showed residual toxicity when that used after 10 days of pesticide application (Table VII). This was due to non-systematic and root uptake systemic action of Endosulfan and Carbofuran, respectively (Hassal, 1990).

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Dr. B. Saratchandra, Director, CSR&TI, Berhampore for his inspiration in doing this work. Deep sense of gratitude are also due to the Head, Division of Plant Pathology, IARI, New Delhi for his kind cooperation in identifying the fungal pathogens.

REFERENCES

- BEARDSLEY J.W. (1959), On the taxonomy of pineapple mealy bugs in Hawaii, with a description of a previously unnamed species (Homoptera: Pseudococcidae). Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 17 (1), 29–37.
- BEARDSLEY J.W. (1965), Notes on the pineapple mealy bug complex with descriptions of two new species (Homoptera: Pseudococcidae). Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 19(1), 55–68.
- GAUMEL L., MATILE-FERRERO D., MCKEY D. (2000), Colony foundation and acquisition of coccoid trophobionts by *Aphomomyrmex afer* (Formicidae): Co-dispersal of queens and phoretic mealy bugs in an ant-plant-homopteran mutualism. Insects Sociaux., 47(1), 84-91.
- GAUTAM R.D., KATARIA B.S. (1986), Feasibility of mass-multiplication of white tailed mealy bug, *Ferrisia virgata* (Cockerell) (Pseudococcidae: Homoptera), its parasitoid – predator complex together with bibliography. J.Ent.Res., 10(1), 1-18.
- HASSALL K.A. (1990), The biochemistry and uses of pesticides. 2nd Edition, English Language Book Society/Macmillan, Hong Kong, P-536.
- HILL D.S. (1987), Agricultural insect pests of the tropics and their control. Cambridge University press, New York, P-746.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYAN S.K., KUMARAJ S. (1973), Sericulture manual 2 – silkworm rearing. FAO Agriculture Service bulletin 15/2, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, P-131.
- METCALF G.L., FLINT W.P. (1973), Destructive and useful insects their habits and control. Tata Mcgraw Hill publishing company Ltd., New Delhi, P-1087.
- MISRA A.K., DAS B.K., AHSAN M. M. (1996), New record of *Paraputo* sp.(Pseudococcidae: Homoptera) as a pest of mulberry (*Morus alba* L.). Sericologia, 36(2), 369-371.
- PEDIGO L. P. (1989), Entomology and pest management. Macmillan Publishing Company, New York, P-646.
- WANG T.C. (1982), A study on the Chinese *Paraputo* and *Heliococcus* with description of new species (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). Acta. Entomologia Sinica, 25(3), 315–320.

LA COCHENILLE DE LA RACINE DU MURIER (*PARAPUTO* SP.) DANS LES COLLINES DU DARJEELING : SEVERITE, BIOLOGIE ET CONTROLE

SUBRATA BISWAS*, D.DAS, S. CHATTOPADHYAY**, S. K. DAS** & K. MANDAL

Regional Sericultural Research Station, 7th Mile, Kalimpong – 734 301, West Bengal, Inde.

Il s'est avéré que *Paraputo* sp. (Pseudococcidae : Homoptera) a affecté le mûrier (*Morus alba* L.) dans toutes les zones séricicoles des collines de Darjeeling, dans l'ouest du Bengale, en Inde pendant la période allant de 1998 à 2000. Pedong s'avère être l'endroit le plus affecté. Le mûrier touché devient sensible à l'attaque de plusieurs pathogènes fongiques, *Fusarium solani*, *F. concolor*, *Phomopsis mori* et *Colletotrichum gloeosporoides*. La cochenille est présente pendant toute l'année bien que sa population baisse de manière simultanée avec la baisse de la température atmosphérique pendant les mois d'hiver. Parfois, la cochenille infeste les racines de mauvaises herbes courantes comme *Bidens pilosa*, *Artemisia vulgaris* et *Cyperus* sp. dans la mûraie.

La cochenille de la racine s'élève bien *in vitro* sur un tubercule de pomme de terre germé. Le miel d'abeille et le jagrè s'avèrent être une nourriture alternative pour l'élevage. La femelle adulte donne directement naissance aux nymphes en laboratoire. Le nombre de nymphes auquel une femelle donne naissance est de $30 \pm 9,30$ par femelle. Les nymphes se développent en adultes à la fois mâles et femelles. Les mâles ont besoin de 29,25 à 39,5 jours pour finir leur cycle de vie tandis que la femelle a besoin de 33,5 à 43,73 jours.

On peut lutter efficacement contre la cochenille de la racine en utilisant 100 ml de solution d'Endosulfan (0,01 % a. i.) à la base du plant de mûrier. L'évaluation biologique grâce à l'élevage du ver à soie indique que l'utilisation d'Endosulfan ne donne pas de toxicité résiduelle sur la feuille en raison de son action non systémique.

INTRODUCTION

On a trouvé que *Paraputo* sp. (List no. 11870 Asia, Collection No. 23010, IIE, Londres) connu populairement sous le nom de "cochenille de la racine" est un parasite nuisible du mûrier qui fait des dégâts sur le système racinaire des jeunes mûriers dans les collines du Darjeeling dans le Bengale de l'ouest, en Inde. Le mûrier affecté devient jaune et rabougri (Misra et coll., 1996). Wang (1982) a identifié des espèces de *Paraputo* sur *Camelia oleifera* (Oleosa) en Chine. Gaume et coll., (2000) ont observé une relation mutuelle entre *P. anomala* et la fourmi (*Aphomyrmex afer*) par rapport à sa dispersion. L'étude de la littérature indique que très peu de travaux ont été faits jusqu'à présent sur *Paraputo* sp. particulièrement sur l'espèce qui affecte le mûrier. Ainsi, nous avons essayé d'étudier ici la sévérité de *Paraputo* sp. chez le mûrier dans les collines du Darjeeling, sa biologie et les mesures de lutte qui existent.

* Research Extension Centre, Central Silk Board, Bagmara, India.

** Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India

MATERIELS ET METHODES

Etude de la sévérité de l'infestation par la cochenille de la racine :

Nous avons étudié la sévérité de l'infestation par la cochenille de la racine (*Paraputo sp.*) chez le mûrier (*Morus alba L.*) grâce à une mesure réalisée pendant trois ans (1998–2000) pendant quatre saisons [début du printemps (mars), printemps (avril–mai), saison des pluies (juin–juillet) et automne (sept. – oct.)] dans sept zones séricicoles principales, c'est à dire à Bijonbari (altitude : 750 m au dessus du niveau de la mer), à Girdabaling (1377 m), à Gorubathan (150 m), à Kalimpong (1230 m), à Kurseong (1458 m) à Lingsey (1170 m au dessus du niveau de la mer) et à Pedong (1410 m) dans les collines du Darjeeling dans le Bengale ouest en Inde. Le sol à la base du mûrier a été creusé à 23 cm de profondeur à 10 endroits différents dans 5 mûraies de chaque zone. L'infestation par la cochenille est visuellement estimée pour déterminer le pourcentage d'infestation de la plante et le nombre de cochenilles par plant. Une étude séparée est faite à 3 endroits à Kalimpong pour comprendre les tendances de sévérité de la cochenille en fonction des mois. A chaque endroit on prend 15 plants (Var. – BC259) dans cinq mûraies considérées pour l'étude de la cochenille de la racine (voir description plus haut). On observe aussi la présence simultanée de cochenilles de la racine sur les mauvaises herbes courantes dans les mûraies. Les données météorologiques sont enregistrées régulièrement pour l'étude de corrélation.

Etude de la biologie de la cochenille de la racine :

On a étudié la biologie de la cochenille de la racine *in vitro*. La cochenille est élevée sur un tubercule de pomme de terre germé en laboratoire ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) en suivant la méthode de Gautam et Kataria (1986). Une nymphe unique venant de naître est élevée sur un bourgeon germé pendant que les autres bourgeons sont taillés. La pomme de terre inoculée est conservée dans une cage d'élevage recouverte d'un tissu de mousseline. On procède à une observation régulière avec un stéréomicroscope (Wild M8, Leica, Heerbrugg, AG, Suisse) pour déterminer le stade et la période nymphale. On étudie l'habitude de nourriture séparément sur des boîtes de Petri, conservées dans la cage d'élevage. Des nymphes de même âge (2^{ème} âge) sont alimentées avec du miel d'abeille, du jagré (un sucre brut foncé fait à partir de la sève de canne à sucre) et une solution de saccharose (à 10 %) sur un papier filtre plié et on observe la croissance visuellement avec une loupe. Les associés de la cochenille sont étudiés en laboratoire. Les parties infestées sont amenées au laboratoire pour l'isolement des pathogènes secondaires, leur inoculation dans du milieu agar et dextrose de pomme de terre de manière aseptique, et pour les observer à la fois visuellement et au microscope (Leitz Diaplan, Wild Leitz GmbH, D-6330, Wetzlar, Allemagne). La culture fongique et la partie affectée du mûrier sont envoyées à la Collection de Cultures de type Indien (champignons), Service de Pathologie des Plantes, de l'Institut de Recherche Agricole Indien à New Delhi pour l'identification.

Etude de l'efficacité des pesticides sur le mûrier :

Pour étudier l'efficacité des pesticides, on réalise une expérience sur le terrain avec des plants d'un an de la variété BC259, en les arrangeant de manière aléatoire en quatre parcelles répétées. Chaque parcelle comprend 20 plants et est entretenue en suivant un calendrier d'engraisage (N-150 kg, P-50 kg et K-50 Kg / ha / a) d'après les recommandations pour les collines. Les pesticides de quatre groupes différents, du Carbofuran (carbamate), du diméthoate (phosphore organique), de l'endosulfan (chlore organique) et de la tourte de margousier (naturel) sont appliqués dans le sol basal après avoir creusé pour l'évaluation. On estime l'infestation par la cochenille le jour même juste avant l'application du pesticide pour déterminer l'état initial et après 1, 3 et 6 mois d'application du pesticide. Différentes concentrations (0,01 %, 0,05 %, 0,1 % et 0,2 % a. i) du pesticide le plus efficace (Endosulfan) sont appliquées dans le sol basal à raison de 100 ml de solution / plant dans une expérience similaire séparée. L'observation sur l'état de la cochenille de la racine est faite d'après la description précédente. On conserve un témoin sans application de pesticide pour chaque lot

d'expériences. Les données brutes répétées sont soumises à une analyse de variance. On détermine la différence critique à un seuil de 5 % pour tester la signification de la différence entre deux moyennes de traitement.

Etude de l'effet des pesticides sur le ver à soie :

Pour connaître le niveau de toxicité résiduelle sur les feuilles pour le nourrissage du ver à soie, on réalise une évaluation biologique. L'hybride du ver à soie bivoltin (NB4D2 × KA) est élevé jusqu'à la fin des deux premiers âges en suivant la méthode de Krishnaswami et coll., 1973. Les feuilles de la mûraie où le pesticide a été appliqué (variété BC259) sont données en nourriture au ver à soie après 10 jours d'application. Deux pontes saines sont élevées pour chaque traitement. On compte le nombre d'œufs et de vers à soie éclos. De plus, quand la plupart des larves ont atteint le 3^{ème} âge, on compte les larves par rapport à chaque âge.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le mûrier est affecté par *Paraputo* sp. (*Morus alba* L.) dans toutes les zones sérícicoles des collines de Darjeeling avec un degré élevé d'infestation pendant la période allant de 1998 à 2000 (Tableau I). Cependant, on trouve que Pedong, est la zone la plus affectée avec un pourcentage moyen d'infestation des plants de 72,52 et un nombre moyen de cochenilles par plant de 10,91. La cochenille est présente sur le mûrier pendant toute l'année bien que sa population diminue avec la baisse de la température pendant les mois d'hiver (Tableau II). Le mûrier infesté présente une vulnérabilité à l'attaque de plusieurs pathogènes fongiques (Tableau III). Les pathogènes, comme, *Fusarium solani* (No. de ref. 3923.99, IARI, New Delhi), *F. concolor* (No. de ref. 4384.2K, IARI), *Phomopsis mori* (No. de Ref. 4384.2K, IARI) et *Colletotrichum gloeosporioides* (No. de ref. 3920.99, IARI) ont été identifiés sur les plants infestés par la cochenille de la racine. Les écorces de sa racine et de sa tige pourrissent simultanément avec une anthracnose sévère, provoquée par *C. gloeosporioides*, sur les parties aériennes jusqu'à ce que la plante meure. Misra et coll., (1996) ont observé le recouvrement par des mycéliums fongiques des zones racinaires chez la souche de mûrier affectée par la cochenille de la racine. Hill (1987) a suggéré que la cochenille du citron (*Planococcus citri*) affaiblit d'abord la plante en se nourrissant, puis la plante affaiblie devient sensible à l'attaque fongique. Dans cette étude, on trouve que la cochenille de la racine sévit sur les racines de mauvaises herbes courantes comme, *Bidens pilosa*, *Artemisia vulgaris* et *Cyperus* sp. dans la mûraie pendant différentes périodes (mois). Parmi les mauvaises herbes on trouve que *Bidens pilosa* est la plus infestée, avec un nombre de cochenilles par plant de 0.45 ± 0.95 . Cela suggère que *Paraputo* sp. est un parasite polyphage comme d'autres cochenilles de la racine de plantes variées (Hill, 1987).

La cochenille de la racine de mûrier se développe bien sur un tubercule de pomme de terre germé bien que sa colonisation soit assez lente. Parmi les autres nourritures, elle préfère le miel d'abeille et le jagré. Avec du miel d'abeille et du jagré, bien qu'on observe une croissance vigoureuse des nymphes à partir du 2^{ème} âge jusqu'au stade de naissance, les nymphes nouvelles nées ne survivent pas longtemps. *Paraputo* sp. en laboratoire ($24 \pm 2^\circ$ C) donne directement naissance aux nymphes (rampantes). Elles demeurent rassemblées et protégées sous le corps de la mère pendant un jour ou deux avant de se recouvrir d'une couche cireuse.

Ces observations suggèrent que *Paraputo* sp. est ovovivipare ou vivipare mais qu'il n'est pas un insecte ovipare. Beardsley (1959, 1965) a signalé que la cochenille de l'ananas (*Dysmicoccus brevipes*) donne naissance à de jeunes larves, ce qui suggère qu'elle est ovovivipare. Par ailleurs, *Pseudococcus odonidum* (= *P. longispurium*) ne forme pas d'oothèque et donne naissance à des nymphes, ce qui indique sa viviparité (Metcalfe et Flint, 1973). Dans cette étude, la cochenille de la racine s'avère bisexuelle. Les nymphes se développent à la fois en mâles et en femelles. Les mâles se caractérisent par une paire d'ailes, de taille plus courte que celles des femelles et sont très peu nombreux. Tandis que les femelles sont rondes et de forme convexe et recouvertes par des substances

cireuses et farineuses. La femelle passe par trois stades nymphaux avant de devenir adulte, tandis que le mâle passe par quatre stades. Gautam et Kataria (1986) ont aussi signalé 3 à 4 âges chez la cochenille à queue blanche *Ferrisia virgata*.

Cette étude montre que pour accomplir son cycle la femelle a besoin de 33,53 à 43,73 jours, tandis que le mâle a besoin de 29,5 à 39,5 jours (Tableau IV). La durée des âges larvaires de la nymphe est influencée par les variations saisonnières et varie entre les individus. L'évaluation sur le terrain de pesticides de quatre différents groupes indique que l'Endosulfan et le Carbofuran sont tous les deux efficaces pour lutter contre la cochenille de la racine chez le mûrier pendant une période plus longue (Tableau V).

Cependant, le premier est meilleur que le second. L'insecticide organophosphoré, le diméthoate permet de lutter contre la cochenille de la racine pendant une période plus courte (jusqu'à un mois après son application). De plus, on observe que l'Endosulfan à une très faible concentration (0,01 % a. i.) est efficace comme avec une concentration élevée pour lutter contre la cochenille de la racine de manière significative pendant une période de 6 mois (Tableau VI). Cette efficacité élevée de l'Endosulfan est due à sa nature stable et à sa longue persistance dans le sol et sous le soleil (Pedigo, 1989).

L'évaluation biologique par l'élevage du ver à soie indique que l'Endosulfan ne laisse pas de toxicité résiduelle sur la feuille, tandis que le plant de mûrier auquel on a appliqué du carbofuran montre une toxicité résiduelle 10 jours après l'application du pesticide (Tableau VII). Cela est dû à l'action respectivement non-systémique et systémique avec l'Endosulfan et le Carbofuran en ce qui concerne l'absorption par la racine (Hassal, 1990).

STUDY ON NUTRIENT DEFICIENCY IN MULBERRY VARIETY S36 UNDER FIELD CONDITIONS

N.R. SINGHVI, J. KODANDARAMAIAH, M. MUNIRATHNAM REDDY,

R.S. KATIYAR, A. SARKAR & R.K. DATTA.

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

Tissue analysis revealed that chlorotic symptoms observed on the leaves of mulberry variety S36 were due to nutrient imbalance caused by deficiency of manganese and iron. Nutrient imbalance has impaired metabolic activities, reduced pigment content and deteriorated leaf quality. Leaf yield loss in chlorosis affected plants were to the tune of 12.76–21.99% and could be retrieved by "Seriboost" application @ 0.25%.

Key words: Mulberry, chlorosis symptom, nutrient imbalance, leaf yield, quality, pigment content.

INTRODUCTION

Agriculture system differs from natural system in one fundamental aspect: while there is net out flow of nutrients by crop harvests from soils in the first, there is no such thing in the second (Sanchez, 1994). Hence the crucial element of sustainability of crop production is the nutrient factor. But of all the factors, the nutrient factor is the least resilient (Fresco and Kroonenberg, 1992). With the introduction of high yielding mulberry varieties and improved package of practices, the demand of nutrients for achieving maximum production per unit area per unit time at a unit cost has increased tremendously, leading to depletion of nutrients consequently causing nutritional disorders. A common response to nutrient deficiency stress is a decline in growth rate and a decline in rate at which all resources are acquired (Chapin, 1991). Inadequate supply of nutrition ultimately reflects upon the growth of the plant and manifests its symptoms on the foliage (Balakrishnan, 1999). Deficiency symptoms frequently occur first only on a few trees or even a few shoots in an entire orchard, thus giving a warning of potentially serious deficiency in the future (Wutscher and Smith, 1993). Diagnosis of a plant deficiency is rarely definitive when it is solely based on foliar symptoms (Wallace, 1943; Bennett, 1993). Plant analyses are often required to confirm the cause of visual symptoms. Extensive literature on nutritional disorders of a number of cereals and plantation crops is available (Chapman, 1975; Kitchen, 1985; Chapin, 1991) both under controlled as well as field conditions. However, similar information on mulberry is scanty for plants grown under field conditions (Shankar, 1997). Visual symptoms of nutritional disorder were noticed in leaves of S36 mulberry plants, which however remained undiagnosed for want of relevant literature. Appearance of visual symptoms of nutritional disorders in mulberry should be treated as an important warning signal of problems and their recognition, thus, remains an important facet of mulberry management. The present investigation was therefore, carried out to diagnose visual symptoms caused by nutritional disorder in mulberry- variety S36.

MATERIALS AND METHODS

The leaf samples were collected from S36 mulberry plants, showing chlorotic symptoms, cultivated on red loamy soil (pH of 7.35 to 7.75, electrical conductivity of 0.15 to 0.131 millimhos/cm, 151 to 161 kg/ha total nitrogen, 11.1 to 13.2 kg/ha P_2O_5 , 190 to 200 kg/ha available K_2O , 0.2 to 0.27% Ca, 0.13 to 0.26 % Mg, 12 to 17 ppm S and 4.6 to 9.0 ppm, 1.18 to 1.93 ppm, 1.0 to 1.45 ppm and 0.78 to 1.04 ppm of Fe, Cu, Zn and Mn, respectively) at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. Soil nutrients content were analysed as per Tandon (1993). Parallel leaf samples were collected from healthy plants of the same mulberry garden and also from other mulberry gardens for comparison. Leaf samples were dried at 60 °C, powdered, sieved and used for analysis of nitrogen by following microkjeldahl method (Piper, 1942) using Tecator make Kjeltac system, and phosphorus & potassium by following the methodology of Jackson (1973). Calcium, magnesium, iron, zinc and copper were estimated using atomic absorption spectrophotometer (AS GBC 902) as per Tandon (1993). Chlorophyll 'a', 'b', total chlorophyll and carotenoids were estimated by DMSO method (Ronen and Galun, 1984). Leaf yield of healthy and chlorotic plants were recorded by leaf plucking method following 70 days crop schedule. Leaf yield was also recorded separately in cases where less than 25 % or more than 25 % of leaves were chlorosis affected. For studies on amelioration of deficiency symptoms, foliar spray of seriboost @ 0.25 % was tried. Three sprays at weekly intervals were made. Spray volume was fixed at 500 liters of aqueous solution per hectare. Leaf yield was also recorded in case of chlorotic affected plants that received three sprays of seriboost. Data were subjected to statistical analysis using standard methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Visual symptoms:

The chlorosis symptoms generally first appeared in younger leaves and then spread to older leaves as well (Fig. 1). Deficiency symptoms appeared on few leaves to whole shoot(s) of the same plant. At times whole plant got affected. The principal leaf veins as well as the smaller veins remained green while the interveinal portion became yellowish. Chlorotic leaves remain smaller, thin and papery (compared to healthy leaves). At times the leaf margins roll upwards turning into a boat shaped structure. Deficiency affected plants show stunted growth and slender stem. At advanced stage marginal necrosis (starting from tip) was observed.

Leaf tissue analysis:

Data on the analysis of leaf tissue (Table I) revealed that the magnesium and manganese contents were distinctly lower in chlorotic leaves. Zinc and iron values were also slightly lower in deficiency-affected leaves compared to the normal leaves. Nitrogen, phosphorus and potassium content were higher in chlorotic leaves compared to normal ones indicating that nutritional imbalance has severely impaired the metabolic activities resulting in deteriorated leaf quality. The pigment content was also found to be lower in chlorotic leaves (Table II), leading to reduced photosynthetic efficiency, concurring the poor leaf yield and quality.

Leaf yield:

Leaf yield in chlorosis affected plants varied from 550-615 g/plant compared to 705 g/plant in healthy ones showing yield loss to the extent of 12.76 to 21.99% (Table III).

Table I. Nutrient content in chlorotic and healthy leaves.**Tableau I. Contenu en nutriments des feuilles chlorotiques et saines.**

Nutrient	Chlorotic	Healthy	"t" value
<i>Nutriment</i>	<i>Chlorotiques</i>	<i>Saines</i>	<i>Valeur "t"</i>
Nitrogen / Azote (%)	5.100 ± 0.071	4.862 ± 0.157	1.547 ^{NS}
Phosphorus / Phosphore (%)	0.491 ± 0.003	0.453 ± 0.007	6.882*
Potassium (%)	2.975 ± 2.722	1.712 ± 0.059	1.423 ^{NS}
Calcium (%)	2.030 ± 0.063	2.065 ± 0.025	0.937 ^{NS}
Sulphur (%)	1.560 ± 0.025	1.680 ± 0.017	4.188*
Magnesium (%)	0.180 ± 0.183	0.200 ± 0.012	0.616 ^{NS}
Iron / Fer (ppm)	144.00 ± 1.059	180.00 ± 1.654	18.44*
Copper / Cuivre (ppm)	19.75 ± 0.171	21.000 ± 0.795	5.451*
Zinc (ppm)	104.08 ± 0.128	107.220 ± 0.715	4.267*
Manganese (ppm)	42.97 ± 0.170	67.000 ± 1.037	22.92*

* = Significant at $P < 0.05$ / *Significatif à $P < 0.05$.*NS = Non significant / *Non significatif.***Table II. Pigment content in chlorotic and healthy leaves.****Tableau II. Teneur en pigments dans les feuilles chlorotiques et saines.**

Pigment (mg/g fresh wt.)	Chlorotic	Healthy	"t" value
<i>Pigment (mg / g poids frais)</i>	<i>Chlorotiques</i>	<i>Saines</i>	<i>Valeur "t"</i>
Chlorophyll "a"	0.502 ± 0.008	3.212 ± 0.092	29.82*
Chlorophyll "b"	0.412 ± 0.008	1.934 ± 0.030	49.64*
Total chlorophyll	0.914 ± 0.007	5.147 ± 0.029	142.82*
Carotenoids	0.581 ± 0.015	1.877 ± 0.026	44.61*

* = Significant at $P < 0.05$ / *Significatif à $P < 0.05$.***Amelioration of deficiency symptoms:**

Foliar spray of "Seriboost", a triacontanol containing multinutrient formulation @ 0.25%, thrice at weekly intervals, was found effective in ameliorating deficiency symptoms. Leaf yield retrieval due to seriboost application was of the order of 65-124 g/plant (Table III).



Figure 1. Symptoms of chlorosis in mulberry- variety S36

A. Plant with chlorotic leaves and healthy leaves. B. Chlorotic leaves

Figure 1. Symptômes de la chlorose chez la variété S 36 du mûrier.

A. Plante avec des feuilles chlorotiques et des feuilles saines. B. Feuilles chlorotiques

Table III. Leaf yield of (a) healthy plants, (b) chlorotic affected plants and (c) treated chlorotic plants, which were treated with 3 foliar sprays of seriboost @ 0.25 %.

Tableau III. Rendement en feuilles de plantes saines (a), de plantes chlorotiques (b) et de plantes traitées contre la chlorose avec 3 vaporisations foliaires de "seriboost" à raison de 0,25 %.

Parameter	Leaf yield / plant (g)			"t" value
	Healthy	Chlorotic	Treated	
	<i>Rendement en feuilles / plante (g)</i>			
Paramètre	Saines	Chlorotiques	Traitées	Valeur "t"
A. Plants with < 25 % chlorotic leaves <i>Plantes avec moins de 25 % de feuilles chlorotiques</i>	-	615.10 ± 25.93	680.00 ± 11.50	6.93*
B. Plants with > 25 % chlorotic leaves <i>Plantes avec plus de 25 % de feuilles chlorotiques</i>	-	550.00 ± 17.11	674.20 ± 13.39	6.67*
Average of A and B <i>Moyenne de A et B</i>	-	582.55 ± 20.72	677.10 ± 7.48	7.76*
	705.30 ± 15.08	582.55 ± 20.72	-	7.34*
	705.30 ± 15.08	-	677.10 ± 7.48	1.007 ^{NS}

* = Significant at $P < 0.05$ / *Significatif à $P < 0.05$* ; NS = Non-significant / *Non significatif*.

Quite often, nutrient deficiency symptoms in the field are not as straight forward or clear-cut as shown in books, most of which have been obtained under very controlled "studio-like" conditions (Tandon, 1991). In the field, a number of factors can complicate the scene, which can even lead to wrong diagnosis. The symptoms recorded in the present study show certain resemblance with 'manganese deficiency' except that in later downward rolling of leaves, withering of leaves, chlorotic stripes or specks and premature leaf fall was recorded (Manjunath *et al.*, 2000). These chlorotic symptoms also resembled with those in respect of iron deficiency except that in case of iron the entire leaf turns chlorotic (Chapman, 1975; Shankar, 1997). Definite diagnosis, therefore, requires confirmation of visual symptoms by tissue nutrient analysis etc. (Cossman, 1993). The leaf tissue analysis clearly indicated the deficiency of more than one nutrient, the manganese and iron. The deficiency of these nutrients has resulted in metabolic disturbances leading to deteriorated leaf quality. Inadequate supply of even a single nutrient reflects upon growth of plant even if all other nutrients are available in sufficient quantity (Singh, 1997). Deficiencies of nutrients are the direct outcome of soil nutrient imbalance. The nutrient imbalance in soil has taken place mainly because of indiscriminate use of high analysis fertilizers, especially N fertilizers, which are deficient in micronutrients (Panwar and Singh, 2000). Das *et al.* (1994) observed that micronutrient status in mulberry fields are very low due to continuous cultivation of mulberry as monoculture crop. Observations of the present investigation are suggestive of the need of balanced fertilizer application, irrespective of macro, secondary and micronutrients so as to match nutrient input with that of output. This finding has support from the work of Singhvi *et al.* (2000).

REFERENCES

- BALAKRISHNAN K. (1999) Studies on nutrients deficiency symptoms in chilli (*Capsicum annum* L.). Indian J. Plant Physiol., 4(3), 229-231.
- BENNETT W.E. (1993) Nutrient deficiencies & toxicities in crop plants. APS press, Minneosta, USA.
- CHAPIN F.S. (1991) Integrate response of plants to stress. *Bioscience*, 41, 29-36.
- CHAPMAN H.D. (1975) Diagnostic criteria for plants and soils. Eurasia Publishing House (P) Ltd., New Dellii. pp. 793.
- COSSMAN K.G. (1993) Cotton. In: Nutrient deficiencies & toxicities in crop plants. Ed. Bennett, W.E. APS press, Minnesota, USA. pp. 115.
- DAS C., SETUA M., GHOSH J.K., SEN S.K. (1994) Effect of commercial micronutrient formulation on the leaf yield attributes and physiobiochemical characters of white mulberry. Indian Agric., 38(1), 51-54.
- FRESCRO L.O., KROONENBERG S.B. (1992) Time and spatial scale in ecological sustainability. Land Use Policy. July, 1992, 155-167.
- JACKSON H.L. (1973) Soil chemical analysis. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi.
- JONES J.P. (1931) The diagnostic value of plant symptoms in determining nutrient deficiencies of soils. J. American Soc. Agron., 23, 352-356.
- KITCHEN H.B. (1985) Soils and crops diagnostic techniques. International Books & Periodicals Supply Service, New Delhi.
- MANJUNATH M.S., BONGALE U.D., DANDIN S.B. (2000) Symptomatology observations on manganese deficiency in mulberry (*Morus indica* L. variety M5). Sericologia, 40(1), 123-129.
- PANWAR J.D.S., SINGH O. (2000) Balanced fertilizer for higher crop productivity. Indian Farming., 50(2), 22-28.
- PIPER C. S. (1942) Soil and Plant analysis. Hans Publishers, Bombay.
- RONEN R., GALUN MARGALITH (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Environment and Experimental Botany, 24(3), 239-245.
- SANCHEZ P.A. (1994) Tropical soil fertility research: Towards the second paradigm. In: "Proc. XV ISSS Symposium, Acapulco, Mexico, July 10-16, 1994", vol. 1, pp. 89-104.
- SHANKAR M.A. (1997) Handbook of mulberry nutrition. Multiplex, Karnataka Agrochemicals, Bangalore. pp. 21.
- SINGH P. (1997) Fertiliser management and related policy issue in forage crops production. In: Plant nutrient needs, supply, efficiency and policy issues: 2000-2025. National Academy of Agricultural Sciences. New Delhi. pp. 217-237.
- SINGHVI N.R., REDDY M.M., CHAKRABORTI S., REKHA M., SARKAR A., DATTA R.K. (2000) Leaf nutrient status of a few popular mulberry varieties. Indian J. Seric., 39 (1), 93-96.
- TANDON H.L.S. (1991) Secondary and micronutrients in Agriculture- Guide-cum-directory (1991). Fertilizer development and Consultation Organisation, New Delhi, India.
- TANDON H.L.S. (1993) Methods of analysis of soils, plants, fertilizer and water. Fertilizer Development Consultation Organization., New Delhi.
- WALLACE T. (1943) The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms. His Majesty's stationary office, London.
- WUTSCHER H.K., SMITH P.F. (1993). Citrus. In: Nutrient deficiencies & toxicities in crop plants. Ed. Bennett, W.E. APS press, Minnesota, USA. pp. 115.

ETUDE SUR LE TERRAIN DE LA CARENCE EN NUTRIMENTS CHEZ LA VARIÉTÉ DE MURIER S36

N. R. SINGHVI, J. KODANDARAMAIAH, M. MUNIRATHNAM REDDY, R. S. KATYAR,
A. SARKAR & R. K. DATTA

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

L'analyse des tissus révèle que les symptômes chlorotiques observés sur les feuilles de la variété de mûrier S36 sont dus à un déséquilibre en nutriments provoqué par la carence en manganèse et en fer. Le déséquilibre en nutriments affecte les activités métaboliques, réduit la teneur en pigments et détériore la qualité de la feuille. La perte de rendement en feuilles chez les plantes affectées par la chlorose est de l'ordre de 12,76 à 21,99 % et on pourrait y remédier grâce à l'application de "Seriboost" à raison de 0,25 %.

INTRODUCTION

Le système agricole diffère du système naturel par un aspect fondamental : alors qu'avec le premier il y a une sortie nette des nutriments du sol par la récolte des cultures, cela ne se produit pas avec le deuxième système (Sanchez, 1994). Ainsi, l'élément crucial par rapport à la durée de la production des cultures est le facteur nutritionnel. Mais de tous les facteurs, le facteur nutriments est le moins élastique (Fresco et Kroonenberg, 1992). Avec l'introduction de variétés de mûrier à haut rendement et l'amélioration de l'ensemble des pratiques, la demande en nutriments pour obtenir une production maximum par unité de surface, unité de temps et unité de coût a considérablement augmenté, et a entraîné un épuisement des nutriments avec pour conséquence des désordres nutritionnels. Une réponse courante au stress dû à la carence alimentaire est la baisse du taux de croissance et la baisse du taux d'acquisition de toutes les ressources (Chapin, 1991). Un apport nutritif inadéquat se reflète sur la croissance de la plante et manifeste ses symptômes sur le feuillage (Balakrishnan, 1999). Les symptômes de carence se produisent fréquemment d'abord sur quelques arbres seulement ou même sur quelques pousses dans un verger entier, ce qui donne ainsi un avertissement de carence potentiellement sévère dans le futur (Wutscher et Smith, 1993). Le diagnostic de carence chez une plante est rarement définitif quand il n'est basé que sur des symptômes foliaires (Wallace, 1943 ; Bennett, 1993). Il est souvent nécessaire d'analyser les plantes pour confirmer la cause des symptômes visuels. Il existe une documentation abondante sur les désordres nutritionnels d'un certain nombre de céréales et de plantes cultivées (Chapman, 1975 ; Kitchen, 1985 ; Chapin, 1991) à la fois dans des conditions contrôlées et sur le terrain (Shankar, 1997). Cependant, les informations similaires sur le mûrier sont rares pour les plants cultivés sur le terrain. On remarque des symptômes visuels du désordre nutritionnel sur les feuilles des plants de mûrier de S36, qui cependant n'ont pas été diagnostiqués en raison du manque de documentation appropriée. L'apparition des symptômes visuels de désordres nutritionnels chez le mûrier devrait être traitée comme un important signal d'avertissement de problèmes et leur reconnaissance est donc une facette importante de la culture des mûriers. L'étude actuelle a donc été réalisée pour diagnostiquer les symptômes visuels provoqués par le désordre nutritionnel chez la variété de mûrier S36.

MATERIELS ET METHODES

Les échantillons de feuilles sont recueillis sur des plants de mûrier de S36, présentant des symptômes chlorotiques, cultivés sur du sol rouge riche en terreau (pH de 7,35 à 7,75, conductivité électrique de 0,15 à 0,131 millimhos / cm, 151 à 161 kg / ha d'azote totale, 11,1 à 13,2 kg / ha de P_2O_5 , 190 à 200 kg / ha de K_2O disponible, 0,2 à 0,27 % de Ca, 0,13 à 0,26 % de Mg, 12 à 17 ppm de S et 4,6 à 9 ppm, 1,18 à 1,93 ppm, 1 à 1,45 ppm et 0,78 à 1,04 ppm de Fe, Cu, Zn et Mn respectivement) au Central Sericultural Research and Training Institute, de Mysore. La teneur en nutriments du sol est analysée d'après Tandon (1993). Des échantillons de feuilles parallèles sont recueillis sur des plants sains de la même mûraie et aussi d'autres mûraies pour comparaison. Les échantillons de feuilles sont séchés à 60° C, réduits en poudre, tamisés et utilisés pour l'analyse de l'azote en suivant la méthode microkjeldahl (Piper, 1942) en utilisant un système Kjeltcc de marque Tecator et du phosphore et du potassium en suivant la méthodologie de Jackson (1973). Le calcium, le magnésium, le fer, le zinc et le cuivre sont estimés en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique (AS GBC 902) d'après Tandon (1993). On estime la chlorophylle "a", "b", la chlorophylle totale et les caroténoïdes avec la méthode DMSO (Ronen et Galun, 1984). Les rendements en feuilles des plants sains et chlorotiques sont enregistrés avec la récolte des feuilles en suivant un calendrier de récolte de 70 jours. Le rendement en feuilles est aussi enregistré séparément pour les cas où moins de 25 % ou plus de 25 % des feuilles sont touchées par la chlorose. Pour l'étude de l'amélioration des symptômes de carence, on essaie une vaporisation foliaire de scriboost à raison de 0,25 %. On fait trois vaporisations à un intervalle hebdomadaire. Le volume de vaporisation est fixé à 500 litres de solution aqueuse par hectare. Le rendement en feuilles est aussi enregistré chez les plants touchés par la chlorose qui ont reçu trois vaporisations de scriboost. Les données sont soumises à une analyse statistique en utilisant des méthodes standards.

RESULTATS ET DISCUSSION

Symptômes visuels :

Les symptômes de chlorose apparaissent en général chez les plus jeunes feuilles et s'étendent ensuite aussi aux feuilles plus vieilles (Fig. 1). Les symptômes de carence apparaissent sur quelques feuilles et jusqu'à l'ensemble de la pousse d'un même plant. Parfois toute la plante est touchée. Les nervures foliaires principales ainsi que les nervures plus petites demeurent vertes tandis que toute la partie entre les nervures devient jaunâtre. Les feuilles chlorotiques deviennent plus petites, minces et parcheminées. Parfois, les bords de la feuille s'enroulent vers le haut en prenant la forme d'un bateau. La croissance des plants carencés est retardée et leur tige devient plus fine. Aux stades avancés, on observe une nécrose marginale (à partir du sommet).

Analyse des tissus foliaires :

Les données sur l'analyse des tissus foliaires (Tableau I) révèlent que les teneurs en magnésium et en manganèse sont distinctement plus faibles chez les feuilles chlorotiques. Les valeurs en zinc et en fer sont aussi légèrement plus faibles chez les feuilles carencées par rapport aux feuilles normales. La teneur en azote, en phosphore et en potassium est plus élevée dans les feuilles chlorotiques par comparaison à celles qui sont normales, ce qui indique que le déséquilibre nutritionnel affecte sérieusement les activités métaboliques et entraîne la détérioration de la qualité de la feuille. On trouve aussi que la teneur en pigment est plus faible chez les feuilles chlorotiques (Tableau II), ce qui entraîne une baisse de l'efficacité photosynthétique, qui concourt au mauvais rendement et à la mauvaise qualité des feuilles.

Rendement en feuilles :

Le rendement en feuilles des plants touchés par la chlorose varie de 550 à 615 g / plant comparé à 705 g / plant chez les plants sains soit une perte de rendement de l'ordre de 12,76 à 21,99 % (Tableau III).

Amélioration des symptômes de carence :

On observe que la vaporisation foliaire de " Seriboost ", un triacontanol contenant une formulation en multnutriments à raison de 0,25 % trois fois par semaine est efficace pour améliorer les symptômes de carence. L'amélioration du rendement en feuilles due à l'application de seriboost est de l'ordre de 65 à 124 g / plant (Tableau III).

Très souvent, les symptômes de carence en nutriments sur le terrain ne sont pas aussi évidents ou clairs que dans les livres, lesquels ont été la plupart du temps obtenus dans des conditions très contrôlées (Tandon, 1991). Sur le terrain, un certain nombre de facteurs peuvent compliquer le tableau, qui peuvent même entraîner un mauvais diagnostic. Les symptômes enregistrés dans cette étude présentent une certaine ressemblance avec " la carence en manganèse " sauf qu'avec celle-ci on enregistre un enroulement vers le bas des feuilles, un flétrissement des feuilles, des bandes ou des point chlorotiques et une chute prématurée des feuilles (Manjunath et coll., 2000). Ces symptômes chlorotiques ressemblent aussi à ceux de la carence en fer sauf que dans le cas du fer, toute la feuille devient chlorotique (Chapman, 1975 ; Shankar, 1975). Le diagnostic définitif, nécessite donc une confirmation des symptômes visuels par l'analyse des nutriments des tissus etc. (Cossman, 1993). L'analyse indique clairement la carence d'un nutriment. La carence en ces nutriments entraîne des déséquilibres métaboliques qui conduisent à une détérioration de la qualité de la feuille. L'apport inapproprié même en un nutriment unique se reflète sur la croissance de la plante même si tous les autres nutriments sont disponibles en quantité suffisante (Singh, 1997). Les carences en nutriments sont le résultat direct du déséquilibre en nutriments du sol. Le déséquilibre en nutriments du sol a principalement lieu en raison de l'utilisation à tort et à travers d'engrais très performants, surtout d'engrais azotés, qui manquent de micronutriments (Panwar et Singh, 2000). Das et coll., (1994) ont observé que les teneurs en micronutriments dans les mûraies sont très basses en raison de la culture continue du mûrier comme monoculture. Les observations de cette étude montrent qu'il faut utiliser les engrais de manière équilibrée sans tenir compte des macro, des micronutriments et des nutriments secondaires de manière à ce que l'apport en nutriments soit égal à la consommation de nutriments. Cette observation est confirmée par l'étude de Singhvi et coll., (2000).

INFLUENCE OF FOLIAR SPRAY OF DAMAN PENSHIBAO ON QUALITY AND BIO-CHEMICAL COMPOSITION OF MULBERRY

B. L. JYOTHI, R. GOVINDAN, R. N. BHASKAR & B. SANNAPPA

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

Daman Phenshibao is a multifunctional organic plant tonic with several organic acids like amino acids, citric acid and humic acid with the necessary major nutrients, micro elements and vitamins. It is known to promote the uptake of nutrients, stimulate photosynthesis, protein synthesis and activate the enzymes. Foliar application of Daman Phenshibao at 0.5 to 3.0 ml / 10 l of water has significantly influenced the quality and bio-chemical composition of mulberry. Foliar spray @ 3.0 ml significantly increased the chlorophyll "a" (1.659 mg/g), chlorophyll "b" (0.841 mg/g), total chlorophyll (2.491 mg/g), total sugars (16.14%) and soluble protein (15.79%), while crude protein was higher with 2.0 ml (19.38%) over other concentrations and control (1.547 mg/g, 0.546 mg/g, 2.080mg/g, 12.83%, 12.59% and 15.95%, respectively).

Keywords: Daman Phenshibao, foliar spray, mulberry, quality and bio-chemical composition.

INTRODUCTION

Mulberry leaf is the exclusive food for silkworm, *Bombyx mori* L. Mulberry leaf quality plays a predominant role in healthy growth of silkworm and the leaf composition depends on various factors i.e., mulberry variety, season, irrigation, manurial application, temperature, length of sunshine hours, nature and type of soil profile, water table, pruning, maturity of leaf, method of leaf harvesting etc. (Narayanan *et al.*, 1967). Thus it is realised that the native soil fertility alone cannot be relied upon in improvement of mulberry leaf quality unless the nutrients are replenished with external source through foliar spray which acts quickly in improving the leaf composition. The quality of leaves provided to the silkworms as measured in terms of nutritional status of leaves has been considered as the prime factor governing the production of good cocoon crop. Better the quality of leaves, greater would be the possibilities of getting higher cocoon quality and yield (Ravikumar, 1988 and Mareppa, 1999). Hence, an experiment was conducted on this line using Daman Phenshibao on mulberry at different stages of crop growth to know the rearing performance of silkworm.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted during summer (March – April) and kharif (August – September) 1999 and winter (January – February) 2000 in irrigated M5 mulberry garden with a spacing of 0.6 × 0.6 m. Mulberry plots were randomized in each block as per randomized block design. Mulberry after bottom pruning was sprayed thrice with Daman Phenshibao (10th, 25th and 40th day). There were four concentrations i.e., 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 ml of Daman Phenshibao per 10 l of water and an appropriate control was maintained. The treatments were replicated four times. The remaining moricultural practices were as per Krishnaswami (1978). The leaf samples were collected after 60 days of bottom

pruning at three different heights of the plant i.e., top, middle and bottom leaves in paper bags and composite samples were made. Leaves were shade dried for three days and then dried in hot air oven at 70° C until constant weight was obtained. The dried leaf samples were ground into fine powder and preserved in butter paper bags for chemical analysis. Leaf moisture and crude protein were estimated as per the standard methods (Anonymous, 1970). Chlorophyll "a", "b" and total chlorophyll were estimated as per Hiscox and Israelstam (1979). Total sugars and soluble protein were estimated as per the procedure of Dubios *et al.* (1956) and Lowry *et al.* (1951), respectively. The cost of production of mulberry and silk cocoon under different concentrations of Daman Penshibao and returns were worked out by taking the current prices for inputs and outputs (produce) as per the methodology outlined by Jolly (1986). The data on individual crops and mean of three crops were analysed statistically as per Sundararaj *et al.* (1972) at five per cent level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the influence of Daman Penshibao on quality and bio-chemical components are presented in Tables I to III and discussed hereunder.

Quality parameters:

Leaf moisture:

Sprays of Daman Penshibao significantly influenced the moisture content of mulberry leaf in crop I. Significantly highest leaf moisture (72.72%) was recorded in 2.0 ml of Daman Penshibao in 10 l of water which was on par with that of 1.0 ml (72.52%), 3.0 ml (71.50%) and 0.5 ml (70.44%). Significantly lowest leaf moisture (69.39%) was recorded in control. However, II, III and mean of three crops showed non-significant effect, in that moisture percentage ranged from 71.77 to 74.70, 68.88 to 71.01 and 70.01 to 72.73 per cent, respectively. The present results are in conformity with that of El-Mansy *et al.* (1966), who reported that when lettuce was sprayed with 6-furfurylamine purine and N6-benzyladenine, it resulted in higher moisture content. Further, Bose *et al.* (1995) observed highest moisture content (74.44%) of mulberry leaf when molybdenum was given as foliar spray at 2.5 kg/ha/yr.

Chlorophyll:

The chlorophyll "a" content of mulberry leaf differed significantly among the treatments in all the three crops and mean of three crops. Highest chlorophyll "a" content of 1.680, 1.612, 1.685 and 1.659 mg/g was obtained with 3.0 ml of Daman Penshibao spray in I, II, III crops and mean of three crops. Further, the least chlorophyll "a" content was recorded in control (1.580, 1.517, 1.545 and 1.547 mg/g, respectively).

Chlorophyll "b" content was also highest with 3.0 ml spray of Daman Penshibao (0.857, 0.795, 0.872 and 0.841 mg/g) among I, II, III crops and mean of three crops. However, least chlorophyll "b" content was recorded in control (0.532, 0.500, 0.607 and 0.546 mg/g, respectively).

Significantly highest total chlorophyll was recorded with spray of 3.0 ml Daman Penshibao spray (2.527, 2.402, 2.545 and 2.491 mg/g). However, control yielded the least total chlorophyll (2.120, 2.002, 2.117 and 2.080 mg/g, respectively).

The present findings are in conformity with those of Wally *et al.*, (1977) who reported higher chlorophyll in N⁶-BA treated parsley leaves. The chlorophyll, active ion, catalase and peroxidase activities were significantly higher in spinach leaves sprayed with vipul at 5.0 ppm (Kadam *et al.*, 1998a). Further, Vishwanath (1996) recorded significantly highest total chlorophyll (2.776 mg/g) with application of MgSO₄ @ 0.75 per cent as foliar spray to mulberry.

Table I. Influence of foliar application of Daman Penshibao on quality parameters in M5 mulberry.*Tableau I. Influence de l'application foliaire de Daman Penshibao sur les paramètres de qualité chez le mûrier M5.*

Treatments Daman Penshibao (ml/10 l of water)	Leaf moisture (%)				Chlorophyll "a" (mg/g)				Chlorophyll "b" (mg/g)				Total chlorophyll (mg / g)			
	Crop I	Crop II	Crop III	Mean	Crop I	Crop II	Crop III	Mean	Crop I	Crop II	Crop III	Mean	Crop I	Crop II	Crop III	Mean
Traitements	Humidité de la feuille (%)				Chlorophylle "a" (mg/g)				Chlorophylle "b" (mg/g)				Chlorophylle totale (mg / g)			
Daman Penshibao (ml/ 10 l d'eau)	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne
0.5	70.44	73.14	71.01	71.53	1.637	1.592	1.655	1.628	0.722	0.717	0.785	0.741	2.325	2.275	2.427	2.358
1.0	72.52	73.05	69.05	71.54	1.637	1.585	1.635	1.619	0.827	0.747	0.845	0.806	2.495	2.300	2.475	2.425
2.0	72.72	74.70	70.79	72.73	1.652	1.590	1.667	1.636	0.730	0.737	0.855	0.774	2.362	2.300	2.502	2.388
3.0	71.50	74.40	69.86	71.92	1.680	1.612	1.685	1.659	0.857	0.795	0.872	0.841	2.527	2.402	2.545	2.491
Control / Témoin	69.39	71.77	68.88	70.01	1.580	1.517	1.545	1.547	0.532	0.500	0.607	0.546	2.120	2.002	2.117	2.080
S. Em±	1.25				0.020	0.016	0.015	0.017	0.062	0.024	0.016	0.034	0.050	0.027	0.010	0.029
CD at 5%	2.67	NS	NS	NS	0.042	0.035	0.033	0.037	0.133	0.051	0.035	0.073	0.107	0.058	0.021	0.062

Table II. Influence of foliar application of Daman Penshibao on bio-chemical constituents in M5 mulberry.

Tableau II. Influence de l'application foliaire de Daman Penshibao sur les constituants biochimiques chez le mûrier M5.

Treatments	Total sugars (%)				Soluble protein (%)				Crude protein (%)			
Daman Penshibao (ml / 10 l of water)	I-Crop	II-Crop	III-Crop	Mean	I-Crop	II-Crop	III-Crop	Mean	I-Crop	II-Crop	III-Crop	Mean
Traitements	Sucres totaux (%)				Protéines solubles (%)				Protéines brutes (%)			
Daman Penshibao (ml / 10 l d'eau)	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Moyenne
0.5	13.63	14.96	15.03	14.54	13.49	13.09	13.28	13.28	18.27	18.44	18.54	18.41
1.0	14.49	13.98	15.31	14.50	12.61	14.54	14.04	13.73	18.68	18.66	18.63	18.65
2.0	15.74	15.75	15.92	15.80	14.43	13.98	14.21	14.20	19.12	19.52	19.51	19.38
3.0	16.05	16.06	16.33	16.14	15.74	16.11	15.54	15.79	19.57	16.37	19.98	18.61
Control / Témoin	12.78	13.12	12.61	12.83	12.19	12.01	13.07	12.59	15.13	15.88	16.85	15.95
S.E.m±	0.47	0.017	0.02	0.39	0.007	0.018	0.013	0.010	0.12	0.06	0.09	0.79
CD at 5%	1.008	0.038	0.042	0.882	0.022	0.055	0.039	0.032	0.26	0.14	0.19	1.76

Table III. Effect of foliar spray of *Daman Penshibao* to mulberry on economics of cocoon production.

Tableau III. Effet de la vaporisation foliaire de Daman Penshibao sur le mûrier sur la rentabilité économique de la production de cocons.

Treatments Daman Penshibao (ml / 10 l of water)	Total cost of mulberry production (Rs. / ha / yr)	Leaf yield (kg/ha/yr)	Incremental yield over control	Cost of rearing including leaf cost (Rs. / 100 DFLs)	Cocoon yield (kg / 100 DFLs)	Incremental yield over control	*Gross profit (Rs / 100 DFLs)	Net profit (Rs/100 DFLs)	B:C ratio	Incremental benefit over control (%)
<i>Traitements Daman Penshibao (ml / 10 l d'eau)</i>	<i>Coût total de la production de mûrier (Rs. / ha / an)</i>	<i>Rendement en feuilles (kg / ha / an)</i>	<i>Rendement supplémentaire par rapport au témoin (Rs. / 100 pontes saines)</i>	<i>Coût de l'élevage y compris le coût de la feuille</i>	<i>Rendement en cocons (kg / 100 pontes saines)</i>	<i>Rendement supplémentaire par rapport au témoin</i>	<i>Profit brut* (Rs / 100 pontes saines)</i>	<i>Profit net (Rs / 100 pontes saines)</i>	<i>Ratio B:C</i>	<i>Bénéfice supplémentaire par rapport au témoin (%)</i>
0.5	26 235	34 533	51.06	2 670	62.00	23.70	8 060.00	5 390.00	2.02:1	56.58
1.0	29 610	34 185	49.54	2 748	60.16	20.03	7 820.67	5 072.68	1.85:1	43.41
2.0	36 360	34 956	52.92	2 880	60.75	21.20	7 897.50	5 017.50	1.74:1	34.88
3.0	43 110	35 515	55.36	3 010	62.26	24.22	8 093.80	5 083.80	1.69:1	31.00
Control / témoin	22 860	22 859	-	2 850	50.12	-	6 515.00	3 665.00	1.29:1	-

* Cocoon price : Rs. 130 kg / Prix du cocon : 130 Rs / kg.

Treatments	Quantity of <i>Daman Penshibao</i> (ml/6750 l / ha / yr)	Cost of <i>Daman Penshibao</i> (Rs./ha/yr) @ Rs. 10/ml
<i>Traitements</i>	<i>Quantité de Daman Penshibao</i> (ml / 6750 l / ha / année)	<i>Coût du Daman Penshibao</i> (Rs. / ha / année) @ 10 Rs./ ml
0.5	337.50	3,375.00
1.0	675.00	6,750.00
2.0	1,350.00	13,500.00
3.0	2,025.00	20,250.00

Bio-chemical constituents:**Total sugars:**

Daman Penshibao significantly influenced the total sugar content in mulberry leaf in all the three crops. The highest total sugar content was associated with 3.0 ml of Daman Penshibao spray in 10 l of water (16.05, 16.06 and 16.33%, respectively) in I, II and III crops. Further, in mean of three crops also the highest content of total sugar (16.14%) was in 3.0 ml. However, the least content of total sugars was noticed in control (12.78, 13.12, 12.61 and 12.83%, respectively). The present findings are in conformity with the findings of Mishra *et al.* (1993), who recorded significantly highest total alcohol soluble sugar (10.83%) due to foliar application of vipul and trianol-cf. Later, Misra *et al.* (1995) also noticed significant influence of growth regulators increasing the total sugar level in mulberry. Biozyme crop⁺ @ 1.332 ml ha⁻¹ crop⁻¹ recorded 17.21 per cent of total sugar in mulberry leaf.

Soluble protein:

Daman Penshibao significantly influenced the soluble protein content of mulberry leaf in all the three crops and mean of three crops. The soluble protein content ranged from 12.19 to 15.74, 12.01 to 16.11, 13.07 to 15.54 and 12.59 to 15.79 per cent, respectively. Similarly, Kadam *et al.* (1988b) recorded higher soluble protein in spinach leaves sprayed with vipul @ 5.0 ppm.

Crude protein:

Significantly higher crude protein was obtained in 3.0 ml (19.57%), 2.0ml (19.52%) and 3.0 ml (19.98%) of Daman Penshibao in I, II and III crops respectively. However, significantly lower crude protein was recorded in control (15.13, 15.88 and 16.85%, respectively). In the overall performance of three crops also significantly more crude protein content was observed with spray of 2.0 ml of Daman Penshibao in 10 l of water (19.38%) which was on par with that of 3.0 ml (18.61%), 1.0 ml (18.65%) and 0.5 ml of Daman Penshibao (18.41%). However, least crude protein content was noticed in control (15.95%). The present investigation is in conformity with the observations of Mishra *et al.* (1993) who reported significant results with respect to crude protein content of mulberry at all the doses of trianol-cf and vipul. Highest crude protein content (26.06%) was recorded @ 1.31 ha⁻¹ crop⁻¹ of biozyme crop⁺ (Misra *et al.*, 1995).

Economics of cocoon production:

The benefit: cost ratio of cocoon production revealed that 0.5ml of the Daman Penshibao spray in 10 l of water resulted in the highest ratio (2.02:1) followed by 1.0 ml (1.85:1), 2.0 ml (1.74:1) and 3.0 ml (1.69:1). However, control recorded the least B : C ratio (1.29:1). Further, the incremental benefit over control was also more with 0.5 ml of Daman Penshibao (56.58%).

From the above study, it can be concluded that the use of Daman Penshibao @ 0.5 ml in 10 l of water at various growth stages of irrigated mulberry improved the yield of silkworm cocoon crop to an extent of 56.58 per cent over control. However, it had no deleterious effect on either mulberry or on silkworm.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1970) Methods of Analysis. Association of Official Agriculture Chemists, 9th ed., Washington D. C., p.781.
- BOSE P. C., SINGHAVI N. R. & DATTA R. K. (1995) Effect of micronutrients on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf. *Sericologia*, 35: 65-69.
- DUBOIS S. M., GILLER K. A., HAMILTON J. K., LEHORS P. A. & SMITH F. (1956) A colorimetric method of estimation of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350.

- EL-MANSY H. I., SALUNKHE D. K., HURST R. L., & WALKER D. R. (1966) Effect of pre and post harvest applications of 6-furfuryl amino purine and N⁶-benzyladenine on physiological and chemical changes in lettuce. *Hort. Res.*, 7: 81.
- HISCOX T. D. & ISRAELSTAM G. F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, 57: 1332-1334.
- JOLLY M. S. (1986) Economics of Sericulture under Irrigated Conditions. Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, Project No. 2, p.19.
- KADAM N. D., PATIL G. D., CHOUGULE B. A. & KADAM S. S. (1988a) Effect of foliar application of vipul on chlorophyll, active ion, catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in spinach. *Indian J. Plant Physiol.*, 31: 434-436.
- KADAM M. D., PATIL G. D., CHOUGULE B. A. & KADAM S. S. (1988b) Effect of foliar application of Vipul on yield, soluble protein, total protein and nitrate reductase activity in spinach. *Indian J. Plant Physiol.*, 31: 123-125.
- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in South India. Bulletin No. 1, Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, p. 19.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. I. & RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 193: 265-275.
- MAREPPA (1999) Influence of mulberry nutrition on development of nuclear polyhedrosis virus of silkworm, *Bombyx mori* L. M. Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, p. 111.
- MISHRA R. K., SHUKLA P., CHOUDHURY P. C., DAS P. K., SINGH G. B., BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1993) Studies on the effect of commercial formulations of Tria contanol on quality and yield of mulberry (*Morus indica* L. Var. Kanva-2). *Indian J. Seric.*, 32: 156-161.
- MISRA A. K., DAS B. K. & AHSAN M. M. (1995) Growth and yield of mulberry (*Morus alba* L.) as influenced by a commercial plant growth regulator. *Sericologia*, 35: 691-697.
- NARAYANAN E. S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M. N. S. (1967) Effect of varietal, feeding, irrigation levels and nitrogen fertilization on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 6: 13-17.
- RAVIKUMAR C. (1988) Western ghats as a bivoltine region – Prospects, challenges and strategies for its development. *Indian Silk*, 26(11): 39-54.
- SUNDARARAJ N., NAGARAJU S., VENKATARAMU M. N. & JAGANNATH M. K. (1972) Design and Analysis of Field Experiments. UAS, Bangalore, p. 424.
- VISHWANATH G. K. (1996) Effect of foliar nutrition on growth, yield and quality of mulberry in relation to silk cocoon production. M. Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, pp. 102.
- WALLY Y. A., NASSAR A. R. & BUNDUQ A. Z. (1977) Effect of N⁶ – Benzyladenine on the chlorophyll and amino acids in parsley leaves during senescence. *Egypt J. Hort.*, 4: 83-89.

EFFET DE LA VAPORISATION FOLIAIRE DE DAMAN PENSIBAO SUR LA QUALITE ET LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DU MURIER

B. L. JYOTHI, R. GOVINDAN, R. N. BHASKAR & B. SANNAPPA

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore – 560 065, Inde.

Daman Phenshibao est un tonique organique de plante multifonctionnel avec plusieurs acides organiques comme les acides aminés, l'acide citrique et l'acide humique et les nutriments majeurs, les micro éléments et les vitamines nécessaires. On sait qu'il promeut l'absorption des nutriments, stimule la photosynthèse, la synthèse des protéines et active les enzymes. L'application foliaire de Daman Penshibao de 0,5 à 3 ml / 10 l d'eau influence de manière significative la qualité et la composition biochimique du mûrier. La vaporisation foliaire à raison de 3 ml augmente de manière significative la chlorophylle "a" (1,659 mg / g), la chlorophylle "b" (0,841 mg / g), la chlorophylle totale (2,491 mg / g), les sucres totaux (16,14 %) et les protéines solubles (15,79 %) tandis que les protéines brutes sont plus élevées avec 2 ml (19,38 %) par rapport aux autres concentrations et au témoin (respectivement 1,547 mg / g, 0,546 mg / g, 2,080 mg / g, 12,83 %, 12,59 % et 15,95 %).

INTRODUCTION

La feuille de mûrier est la nourriture exclusive du ver à soie, *Bombyx mori* L. La qualité de la feuille de mûrier joue un rôle prédominant dans la croissance du ver à soie et la composition de la feuille dépend de facteurs variés comme la variété de mûrier, la saison, l'irrigation, l'application de fumure, la température, la durée des heures d'ensoleillement, la nature et le type de sol, la quantité d'eau, la taille, la maturité de la feuille, la méthode de récolte des feuilles, etc. (Narayanan et coll., 1967). On se rend donc compte qu'on ne peut pas compter sur la fertilité du sol d'origine seule pour améliorer la qualité de la feuille de mûrier sauf si on apporte des nutriments avec une source externe grâce à une vaporisation foliaire qui agit rapidement pour améliorer la composition de la feuille. La qualité des feuilles fournies aux vers à soie mesurée en termes d'état nutritionnel est considérée comme le facteur primordial dont dépend l'obtention d'une bonne récolte de cocons. Plus la qualité des feuilles est bonne, plus fortes sont les possibilités d'obtenir une qualité de cocon et un rendement plus élevés (Ravikumar, 1988 et Mareppa, 1999). Ainsi, on a réalisé une expérience dans cette direction en utilisant du Daman Penshibao chez le mûrier à différents stades de croissance de la culture pour connaître son influence sur la performance d'élevage du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée en été (mars – avril) et pendant le kharif (août – septembre) en 1999 et pendant l'hiver 2000 (janvier – février) dans une muraie de mûriers M5 irriguée avec un espacement de 0,6 × 0,6 m. Les parcelles de mûrier sont disposées en blocs aléatoires d'après la méthode d'échantillonnage aléatoire. Après une taille basse, le mûrier est vaporisé trois fois avec du Daman Penshibao (le 10^{ème}, le 25^{ème} et le 40^{ème} jour). On a utilisé quatre concentrations soit 0,5, 1, 2 et 3 ml

de Daman Peshibao pour 10 l d'eau et on conserve un témoin approprié. Les traitements sont répétés quatre fois. Les autres pratiques de moriculture sont celles de Krishnaswami (1978). Les échantillons de feuilles sont recueillis 60 jours après la taille basse à différentes hauteurs du plant, c'est à dire qu'on prélève les feuilles du haut, du milieu et du bas dans des sacs en papier et on réalise des échantillons composites. Les feuilles sont séchées à l'ombre pendant trois jours, puis séchées dans un four à air chaud à 70° C jusqu'à ce qu'on obtienne un poids constant. Les échantillons de feuilles sèches sont moulus en une poudre fine et conservés dans des sacs en papier huilés pour l'analyse chimique. L'humidité de la feuille et les protéines brutes sont estimées d'après les méthodes standards (Anonyme, 1970). Les quantités de chlorophylle "a", "b" et de chlorophylle totale sont mesurées d'après Hiseox et Israelstam (1979). Les sucres totaux et solubles sont mesurés selon la procédure de Dubios et coll., (1956) et de Lowry et coll., (1951) respectivement. On calcule le coût de la production de mûriers et de cocons soyeux avec différentes concentrations de Daman Peshibao et les profits en prenant les prix actuels pour les dépenses et les recettes (produit) d'après la méthodologie décrite par Jolly (1986). Les données sur les récoltes individuelles et la moyenne des trois récoltes sont analysées de manière statistique d'après Sundararaj et coll., (1972) à un seuil de signification de cinq pour-cent.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'influence de Daman Peshibao sur la qualité et les composants biochimiques sont présentées dans les Tableaux I à III.

Paramètres de qualité :

Humidité de la feuille :

Les vaporisations de Daman Peshibao influencent de manière significative la teneur en eau de la feuille de mûrier pour la récolte I. L'humidité de la feuille significativement la plus élevée (72,72%) est enregistrée avec 2 ml de Peshibao dans 10 l d'eau et est du même niveau qu'avec 1 ml (72,52 %), 3 ml (71,50 %) et 0,5 ml (70,44 %). L'humidité de la feuille significativement la plus faible (69,39 %) est enregistrée chez le témoin. Cependant, cela n'a pas d'effet significatif sur la 2^{ème}, la 3^{ème} récolte et la moyenne des trois récoltes, puisque le taux d'humidité est compris respectivement entre 71,77 et 74,70, 68,88 et 71,01 et 70,01 et 72,73 pour cent. Les résultats actuels confirment ceux de El-Mansy et coll. (1966) qui ont signalé que quand on vaporise de la laitue avec de la purine 6-furfurylamine et du N6-benzyladénine, cela donne une teneur plus élevée en eau. De plus, Bose et coll. (1995) ont observé une teneur plus élevée en eau (74,44 %) dans la feuille de mûrier quand on administre du molybdenum en vaporisation foliaire à raison de 2,5 kg / ha / année.

Chlorophylle :

La teneur en chlorophylle "a" de la feuille de mûrier diffère de manière significative entre les traitements pour les trois récoltes et la moyenne des trois récoltes. La teneur la plus élevée en chlorophylle "a" est obtenue avec 3 ml de vaporisation de Daman Peshibao soit respectivement 1,680, 1,612, 1,685 et 1,659 mg /g avec les récoltes I, II, III et la moyenne des trois récoltes. De plus, la teneur la moins élevée en chlorophylle "a" est enregistrée chez le témoin (1,580, 1,517, 1,545 et 1,547 mg /g respectivement).

La teneur en chlorophylle "b" est aussi la plus élevée avec une vaporisation de 3 ml de Daman Peshibao (0,857, 0,795, 0,872 et 0,841 mg/g) pour les récoltes I, II, III et la moyenne des trois récoltes. La teneur la plus faible en chlorophylle "b" est enregistrée chez le témoin (respectivement, 0,532, 0,500, 0,607 et 0,546 mg /g).

La chlorophylle totale significativement la plus élevée est enregistrée avec une vaporisation de 3 ml de *Daman Penshibao* (2,527, 2,402, 2,545 et 2,491 mg /g). Le témoin contient le moins de chlorophylle totale (2,120, 2,002, 2,117 et 2,080 mg/g respectivement).

Ces observations confirment celles de Wally et coll., (1977) qui ont signalé plus de chlorophylle dans les feuilles de persil traitées au N^6 - BA. La chlorophylle, l'ion actif, les activités de la catalase et de la peroxydase sont significativement plus élevées dans les feuilles d'épinard vaporisées avec du *vipul* à 5 ppm (Kadam et coll., 1998a). De plus, Vishwanath (1996) a enregistré la quantité de chlorophylle totale significativement la plus élevée (2,776 mg / g) avec l'application de $MgSO_4$ à raison de 0,75 pour-cent en vaporisation foliaire chez le mûrier.

Constituants biochimiques :

Sucres totaux :

Le *Daman Penshibao* a une influence significative sur la teneur en sucres totaux dans la feuille de mûrier pour les trois récoltes. On obtient la teneur en sucres totaux la plus élevée avec une vaporisation de 3 ml de *Daman Penshibao* dans 10 l d'eau (respectivement 16,05, 16,06 et 16,33 %) pour les récoltes I, II et III. De plus, pour la moyenne des trois récoltes, la teneur la plus élevée en sucres totaux (16,14 %) est aussi obtenue avec 3 ml. On constate la teneur la plus faible en sucres totaux chez le témoin (12,78, 13,12, 12,61 et 12,83 %, respectivement). Ces observations sont conformes à celles de Mishra et coll. (1993), qui ont enregistré les quantités de sucres totaux solubles à l'alcool significativement les plus élevées (10,83 %) avec l'application foliaire de *vipul* et de trianol-cf. Plus tard, Misra et coll. (1995) ont aussi remarqué une influence significative des régulateurs de croissance qui augmentent le niveau en sucres totaux chez le mûrier. Une culture avec du *biozyme* ⁺ à raison de 1,332 ml par ha et par culture donne 17,21 pour-cent de sucres totaux dans la feuille de mûrier.

Protéines solubles :

Le *Daman Penshibao* a une influence significative sur la teneur en protéines solubles de la feuille de mûrier pour les trois récoltes et la moyenne des trois récoltes. La teneur en protéines solubles est comprise entre 12,19 et 15,74, 12,01 et 16,11, 13,07 et 15,54 et 12,59 et 15,79 pour-cent respectivement. De même, Kadam et coll. (1998b) ont enregistré les quantités de protéines solubles les plus élevées dans les feuilles d'épinard vaporisées avec du *vipul* à raison de 5 ppm.

Protéines brutes :

Les quantités de protéines brutes significativement les plus élevées sont obtenues avec 3 ml (19,57 %), 2 ml (19,52 %) et 3 ml (19,98 %) de *Daman Penshibao* pour les récoltes I, II et III respectivement. Cependant, les quantités de protéines brutes significativement les plus basses sont enregistrées chez le témoin (15,13, 15,88 et 16,85 %, respectivement). Pour la performance générale des trois récoltes, on observe aussi une teneur en protéines brutes plus significative avec la vaporisation de 2 ml de *Daman Penshibao* dans 10 l d'eau (19,38 %) qui est équivalente à celle obtenue avec 3 ml (18,61 %), 1 ml (18,65 %) et 0,5 ml (18,41 %) de *Daman Penshibao*. On observe la teneur la plus faible en protéines chez le témoin (15,95 %). Cette étude confirme les observations de Mishra et coll., (1993) qui ont signalé des résultats significatifs par rapport à la teneur en protéines brutes du mûrier avec toutes les doses de trianol-cf et de *vipul*. La teneur la plus élevée en protéines brutes (26,06 %) est enregistrée avec une dose de 1,31 par ha et par culture de *biozyme* ⁺ (Misra et coll., 1995).

Rentabilité de la production de cocons :

Le ratio bénéfice : coût de la production de cocons révèle que 0,5 ml de vaporisation de *Daman Penshibao* dans 10 l d'eau entraîne le ratio le plus élevé (2,02 : 1) suivi par 1,0 ml (1,85 : 1), 2 ml (1,74 : 1) et 3 ml (1,69 : 1). Avec le témoin on obtient le ratio B : C le plus faible (1,29 : 1). De plus, le

bénéfice supplémentaire par rapport au témoin est plus élevé avec 0,5 ml de Daman Penshibao (56,58 %).

D'après l'étude ci-dessus, on peut donc conclure que l'utilisation de Daman Penshibao à raison de 0,5 ml dans 10 l d'eau à diverses étapes de la croissance chez le mûrier irrigué améliore le rendement de la récolte de cocons de vers à soie jusqu'à 56,58 pour cent par rapport au témoin. Il n'a pas d'effet nocif sur le mûrier ou le ver à soie.

IN VITRO REGENERATION OF PLANTS FROM MATURE NODAL SEGMENTS OF *TERMINALIA ARJUNA* BEDD.

M. RAMESH, U. PAVAN, S. SHYAM PRASAD, A.V. RAO & A. SADANANDAM*

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

Axillary shoot bud proliferation was achieved when nodal explants from field-grown mature plants of *Terminalia arjuna* Bedd. were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with thidiazuron (TDZ, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l) or benzyladenine (BA, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) or kinetin (Kn, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) alone. Medium containing TDZ at all the concentrations induced early bud breakage (5–7 days) with maximum shoot proliferation (1.89 ± 0.21) at 0.05 mg/l. The bud breaking was delayed (7–10 days) at all the concentrations of BA or Kn with per cent response and average shoot length significant at 4.0 mg/l. None of the other concentrations was effective in supporting axillary shoot proliferation though sprouting occurred in all the concentrations. Moreover within the plant growth regulator range evaluated, TDZ (0.05 mg/l) was more effective than optimal levels of BA or Kn (4.0 mg/l) in inducing sprouting and shoot proliferation. Roots were induced in vitro when individual shoots were cultured on $\frac{1}{2}$ strength MS liquid medium + indole-3-butyric acid (IBA, 4.0 mg/l) and modified Gamborg's (B5) medium + IBA (1.0 mg/l). Regenerated plants were established in the greenhouse.

Keywords : *In vitro* propagation, *Terminalia arjuna* Bedd., mature nodal explants, thidiazuron.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna Bedd., a member of the Combretaceae family, is common in most parts of India. It is one of the primary food plants of the tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury. (Jolly *et al.*, 1968), currently multiplied only via seeds collected from forests. However, the seed material does not readily germinate if exposed to sun and the radical is liable to dry up under such circumstances. As with other woody plants, the efficiency of conventional breeding programmes in *T. arjuna* is limited due to the long reproductive cycle and high degree of heterozygosity. Moreover, methods of vegetative propagation are absent because of rooting inhibitors in semi-hard wood and hard wood cuttings (Thangavelu, 2000). Hence the aim is to develop micropropagation system which will enable elite trees to be cloned. Also through systematic evaluation of the germplasm it will be possible to identify ideal resource material with desired characters like suitability to silkworm rearing, disease resistance, low fiber, tannin and phenol contents which act as feeding inhibitors to the tasar silkworms. Currently, only few of the Combretaceae timber trees have been cloned by tissue culture (Joshi *et al.*, 1991; Kaur *et al.*, 1992; Kumari *et al.*, 1998). Although growth *in vitro* has been reported for some species, the rooting phase is frequently a limiting step. The present communication reports *in vitro* propagation of *T. arjuna* through axillary bud proliferation from mature nodal explants.

* Correspondent author

MATERIALS AND METHODS

Seeds of *Terminalia arjuna* were collected in February - March, 1998 from forest areas of the Eturunagaram and Pakal, Warangal district, India. Non-woody branches from two-years-old mature plants collected from research field at the Department of Botany, Kakatiya University, Warangal, were used as explants. Shoots were excised free of leaves, trimmed into (3 cm) single node segments, washed for 30 min in running tap water, then soaked in 0.1% (w/v) Tween-20 for 10 min., followed by washing (5-6 times) with distilled water. Surface sterilization was carried out with 10% sodium hypochloride for 10 min, followed by 5 min in 0.1% (w/v) mercuric chloride before rinsing four times with sterile water. The explants trimmed to 1-2 cm were cultured singly on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing 3% (w/v) sucrose. The pH was adjusted to 5.7 before adding agar (0.8 %) and autoclaving at 121°C for 15 min. The culture media were supplemented with various concentrations of thidiazuron (TDZ, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l) or benzyladenine (BA, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) or kinetin (Kn, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) for shoot stimulation and elongation.

For rooting, individual regenerants of 1-2 cm length having 3-5 leaves were isolated and transferred to tubes containing modified B5 medium (Gamborg *et al.*, 1968) or MS full or ½ strength basal and auxin-supplemented agar or liquid medium. Filter paper boats supported the liquid medium. For rooting experiments, auxins like indole-3-butyric acid (IBA) or indole-3-acetic acid (IAA) or naphthaleneacetic acid (NAA) were tried at levels of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg/l each. *In vitro* rooted shoots were washed repeatedly for 4-5 times in running tap water before being potted in plastic jars containing sterilized soil and vermiculite (1:1). Plantlets were covered with polyethylene sheets to minimize loss of moisture and transferred into the greenhouse (24°C day; 28°C night; 16h day length, 65% R.H.). During establishment and shoot proliferation, cultures were incubated under cool fluorescent light at an intensity of 40-60 lux m⁻² sec⁻¹ for a 16h photoperiod, and at a temperature of 25 ± 2°C. Data pertaining to bud breakage / proliferation response and shoot length were analysed statistically by using Duncan's multiple range test (DMRT). In all experiments 20 cultures were maintained in two blocks and each experiment was repeated once.

RESULTS AND DISCUSSION

TDZ was most effective in inducing shoot from nodal explants with early breakage of axillary buds (5-7 days) whereas in BA or Kn, the bud breakage was delayed (7-10 days). Shoot elongation which occurred on the medium containing TDZ at 0.05 mg/l was most efficient in terms of shoot proliferation (1.89 ± 0.21). Nodal segments comprising two axillary buds showed shoot proliferation from both the buds, which attained almost equal length (Fig. 1a). However, single shoot emerged in case nodal segment with only one axillary bud was cultured. Shoot induction was even readily obtained on other concentrations of TDZ which were less effective in promoting shoot proliferation (Tab. I). Moreover, higher concentration of TDZ (1.0 mg/l) resulted in both axillary and adventitious shoot production (Fig. 1b). The frequency of bud breakage and shoot proliferation was higher at 4.0mg/l BA. With either 1.0, 2.0 or 3.0 mg/l, BA gave > 50 and < 65% of response with shorter shoots. Per cent response and average shoot length differed among treatments with Kn and at 4.0 mg/l the effect was significant. None of the other concentrations were effective in accelerating axillary shoot sprouting.

Progressively higher concentration of TDZ and lower concentrations of BA or Kn resulted in poor axillary bud proliferation. The response shows that the presence of TDZ at lower concentration is favorable for axillary bud proliferation. This high cytokinin activity and positive response of woody species to TDZ have established it as the most active cytokinin for *in vitro* manipulation of many woody species (Huetteman and Preece, 1993). At 0.05 mg/l TDZ, the shoots averaged approximately twice as long as those grown on MS medium supplemented with optimal levels of BA or KN (4.0 mg/l).

Table I. Effect of TDZ, BA and Kn on *in vitro* nodal proliferation and mean length of shoot in *T. arjuna*. The data are an average of two experiments (n = 80).

Tableau I. Effet du TDZ, du BA et du Kn sur la prolifération nodale in vitro et la longueur moyenne de la pousse chez T. arjuna. Les données sont la moyenne de deux expériences (n = 80).

Growth regulators used	TDZ				BA				Kn			
Régulateurs de croissance utilisés												
Concentrations (mg / l)	0.05	0.1	0.5	1.0	1.0	2.0	3.0	4.0	1.0	2.0	3.0	4.0
Proliferation response (%)	90 ± 1.70 ^a	82 ± 3.51 ^b	74 ± 2.21 ^c	64 ± 2.01 ^{ab}	54 ± 2.17 ^{bc}	59 ± 1.98 ^{bc}	63 ± 1.95 ^{ab}	70 ± 0.95 ^c	42 ± 1.25 ^{cd}	49 ± 2.12 ^{cd}	53 ± 0.98 ^{bc}	58 ± 0.68 ^{bc}
Réponse de prolifération (%)												
Mean length of shoot ± S. E.	1.89 ± 0.21 ^a	1.34 ± 0.09 ^b	0.86 ± 0.95 ^c	0.52 ± 0.62 ^{ab}	0.45 ± 0.52 ^{bc}	0.68 ± 0.70 ^{cd}	0.74 ± 0.21 ^c	1.12 ± 0.11 ^b	0.38 ± 0.47 ^{bc}	0.52 ± 0.22 ^{ab}	0.60 ± 0.75 ^{ab}	0.72 ± 0.15 ^c
Longueur moyenne de la pousse ± écart type												

In each row, mean ± SE followed by the same letter were not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test / Dans chaque colonne, la moyenne et l'écart type suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P < 0.05$ selon le test multiple de Duncan).

For clonal propagation, proliferation of single meristem is desirable. Fine-tuning of exogenous supply of growth regulators, which actively support proliferation of axillary meristem, is often a critical parameter to stimulate high rates of axillary shoot proliferation. In the present study, optimal levels of TDZ (0.05 and 0.1 mg/l), BA (4.0 mg/l) and Kn (4.0 mg/l) triggered proliferation of axillary meristem without inducing adventitious shoot buds. This tendency of axillary buds to proliferate without the induction of adventitious shoots, which may lead to somaclonal variation, is always desirable in clonal propagation.

The use of different concentrations of IAA and NAA in ½ strength liquid / solid MS or modified B5 medium were ineffective in inducing rooting from *in vitro* regenerated shoots. Moreover, the shoot base showed profuse callusing. Single root emerged from the cut end of the stem within 40-45 days in presence of liquid ½ MS + IBA (4.0 mg/l), which continued linear growth with further production of laterals (Fig. 1c). Liquid MS medium was superior to solid medium (Thimmappaiah and Samuel, 1999) and a low salt medium (Malathy and Pai, 1998) has been found satisfactory. Shoots were rooted in 50% of the cases. The roots, however, were very brittle and broke off easily. Furthermore, rooting

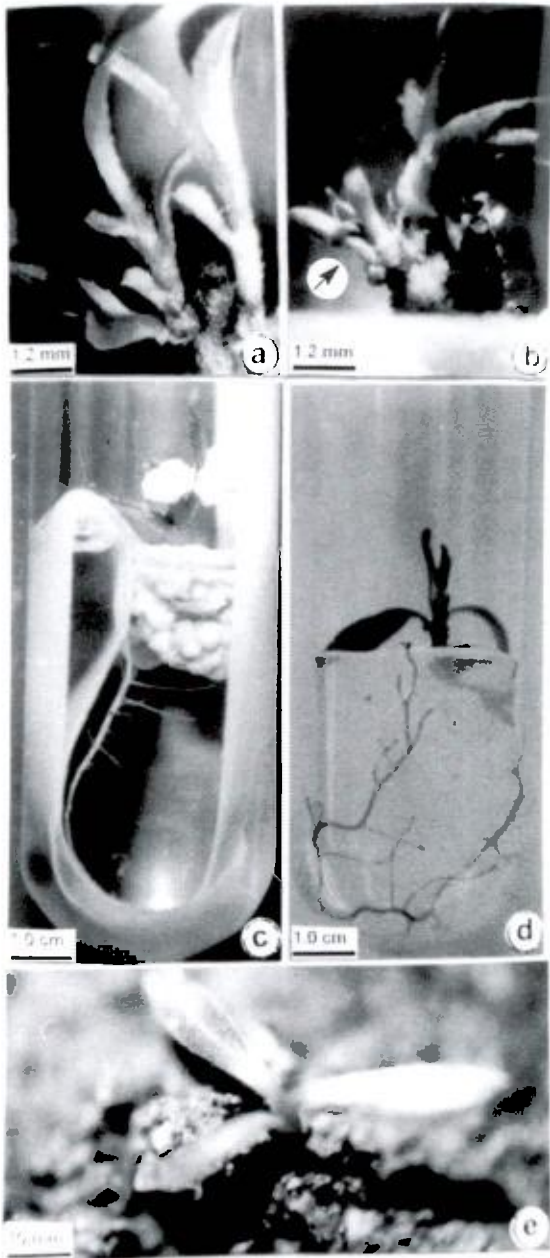


Figure 1.

(a) Nodal segment showing shoot proliferation from two axillary buds on MS + TDZ (0.05 mg/l).

(b) Induction of adventitious shoot buds from nodal explants on MS + TDZ (1.0 mg/l).

(c) Emergence of single root with laterals from cut end of the stem in presence of liquid 1/2 MS + IBA (4.0 mg/l).

(d) Rooting of *in vitro* regenerated shoot on modified B5 medium supplemented with 1 mg/l IBA.

(e) Plantlet transferred to pot under greenhouse conditions.

Figure 1.

(a) Segment nodal présentant une prolifération de pousses à partir de deux bourgeons axillaires sur MS + TDZ (0,05 mg/l).

(b) Induction de bourgeons adventifs à partir d'explants nodaux sur du MS + TDZ (1 mg/l).

(c) Emergence d'une racine unique avec des latéralités à partir des bouts coupés de la tige en présence de 1/2 MS liquide + IBA (4 mg/l).

(d) Racinement de pousse régénérée *in vitro* sur du milieu B5 modifié additionné de 1 mg/l d'IBA.

(e) Plantule transférée dans un pot sous serre.

of regenerant shoots were observed with the root primordia emerging from the shoot base with callusing.

In view of the effects of nitrogen compounds on auxin metabolism affecting rooting (Moncousin, 1991; Karhu, 1997), B₅ medium with 1/3 the original nitrogen concentration was used for root induction. High rooting percentage (80% or more) were obtained (20-30 days) when microshoots were rooted *in vitro* in modified B₅ medium with 1.0 mg/l IBA (Fig. 1d). The primary root number was increased and there were more lateral roots on the microshoots. Moreover, no callus tissue was formed at the base of microshoots. This clearly showed that reduced nitrogen levels of B₅ in *T. arjuna* increased rooting percentage and formation of lateral roots on microshoots. The rooting percentage was low (60%) when 2.0 mg/l of IBA was used. Remaining concentrations were ineffective in inducing rooting on microshoots. The capacity of forming long shoots had no relationship with the percentage of rooting. While on BA or Kn supplemented medium most shoots remained small, there was no obstacle for rooting. Hence, shoots from all the treatments rooted to a similar extent. The shoot tips of regenerated shoots which did not root on root induction medium were seriously effected by necrosis and abscission in culture. This may be attributed to the fact that without roots the shoots are devoid of a source of endogenous cytokinins; cytokinin deficiency leads to the cessation of cell division in the apical meristem and to cellular necrosis (Kataeva *et al.*, 1991; Kulkarni and D'Souza, 2000).

The rooted plants were weaned away from the tubes, hardened under greenhouse conditions at 65% RH. One month after transplantation under greenhouse conditions (Fig. 1e), the viable plantlets set dormant buds and showed normal growth as evidenced from the emergence of new leaves and elongation of shoots.

Healthy plantlets were obtained ready to be transferred to field with 50% survival rate. The protocol applied here for successful root induction may complement with high shoot proliferation method reported here for the first time.

REFERENCES

- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OHIMA K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- HUETTEMAN C.A., PREECE J.E. (1993) Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33, 105-119.
- JOLLY M.S., CHATURVEDI S.N., PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. *Indian J. Seric.*, 7, 56-57.
- JOSHI R., SHEKHAWAT N.S., RATHORE T.S. (1991) Micropropagation of *Anogeissus pendula* Edgew. – An arid forest tree. *Ind. J. Expt. Biol.*, 29, 615-618.
- KARHU S.T. (1997) Rooting of blue honeysuckle microshoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 48, 153-159.
- KATAEVA N.V., ALEXANDROVA I.G., BUTENKO R.G., DRAGAVTEEVA E.V. (1991) Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 27, 149-154.
- KAUR G., SINGH R.P., RATHORE T.S., SHEKHAWAT N.S. (1992) *In vitro* propagation of *Anogeissus sericea*. *Ind. J. Expt. Biol.*, 30, 788-791.
- KULKARNI K.R., D'SOUZA L. (2000) Control of *in vitro* shoot tip necrosis in *Butea monosperma*. *Curr. Sci.*, 78, 125-126.
- KUMARI N., JAISWAL U., JAISWAL V.S. (1998) Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Terminalia arjuna* Bedd. *Curr. Sci.*, 75, 1052-1055.
- MALATHY S., PAI J.S. (1998) Micropropagation of *Ixora singaporensis* (Linn.) – An ornamental shrub. *Curr. Sci.*, 75, 545-547.
- MONCOUSIN CH. (1991) Rooting of *in vitro* cuttings. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17, pp. 231-261. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- THANGAVELU K. (2000) Research strategy for tasar culture. *Ind. Silk*, 39, 47-49.
- THIMMAPPAIAH, SAMUEL S.R. (1999) *In vitro* regeneration of cashew (*Anacardium occidentale* L.) *Ind. J. Expt. Biol.*, 37, 384-390.

REGENERATION *IN VITRO* DE PLANTS A PARTIR DE SEGMENTS NODAUX DE *TERMINALIA ARJUNA* BEDD.

M. RAMESH, U. PAVAN, S. SHYAM PRASAD, A. V. RAO & A. SADANANDAM*

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

On obtient une prolifération de bourgeons des pousses axillaires quand on cultive les explants nodaux issus de plantes matures de *Terminalia arjuna* Bedd. dans du milieu de Murashige et Skoog (MS) additionné de thidiazuron (TDZ, 0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg / l), de benzyladénine (BA, 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 mg / l) ou de kinétine seule (Kn, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 mg/l). Le milieu contenant du TDZ induit une rupture des bourgeons précoce à toutes les concentrations (5 à 7 jours) avec une prolifération maximum de pousses ($1,89 \pm 0,21$) avec 0,05 mg / l. La rupture des bourgeons est retardée (7 à 10 jours) pour toutes les concentrations de BA ou de Kn avec un pourcentage de réponse et une longueur de pousse moyenne significativement différents avec 4 mg / l. Aucune des autres concentrations n'est efficace pour favoriser la prolifération des pousses axillaires bien qu'il se produise un bourgeonnement à toutes les concentrations. De plus, par rapport aux niveaux de régulateurs de croissance évalués, le TDZ (0,05 mg / l) est plus efficace que les meilleurs niveaux de BA ou de Kn (4,0 mg / l) pour induire le bourgeonnement et la prolifération des pousses. Les racines sont induites *in vitro* quand les pousses individuelles sont cultivées sur un milieu liquide MS à moitié concentré + indole acide butyrique-3 (IBA, 4 mg / l) et du milieu de Gamborg (B5) modifié + IBA (1 mg / l). Les plants régénérés sont maintenus en serre.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna Bedd., un membre de la famille des Combretaceae, est communément répandu dans la plupart des zones en Inde. C'est l'une des plantes hôtes principales du ver à soie tassar *Antheraea mylitta* Drury (Jolly et coll., 1968) actuellement multipliée seulement grâce aux graines recueillies dans les forêts. Cependant, les graines ne germent pas facilement si elles sont exposées au soleil et les racines sont susceptibles de sécher dans de telles circonstances. Comme avec les autres plantes ligneuses, l'efficacité des programmes de lignage conventionnels est limitée chez *T. arjuna* en raison du long cycle de reproduction et du degré élevé d'hétérozygotie. De plus, on ne peut pas avoir recours aux méthodes de multiplication végétative en raison des inhibiteurs du racinement dans le bois des boutures semi-dures et dures (Thangavelu, 2000). Le but est donc de mettre au point un système de micro multiplication qui permette de cloner des arbres supérieurs. Il sera aussi possible d'identifier, grâce à une évaluation systématique du germoplasme, un matériel de ressource idéal avec les caractères désirés comme l'adaptation à l'élevage du ver à soie, la résistance à la maladie, et de faibles teneurs en fibres, en tanin et en phénol qui sont des inhibiteurs du nourrissage chez les vers à soie tassar. Actuellement, seuls quelques arbres Combretaceae destinés à l'industrie du bois ont été clonés grâce à la culture de tissus (Joshi et coll., 1991 ; Kaur et coll., 1992 ; Kumari et coll., 1998). Bien qu'on ait signalé une croissance *in vitro* de quelques espèces, la phase de racinement est fréquemment

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

une étape limitante. Ce article fait part de la multiplication *in vitro* de *T. arjuna* par la multiplication des bourgeons axillaires à partir d'explants nodaux matures.

MATERIELS ET METHODES

Les graines de *Terminalia arjuna* sont recueillies en février – mars 1998 dans les zones forestières d'Eturunagaram et Pakal, dans la région de Warangal en Inde. Des branches non ligneuses de plants matures de deux ans sont recueillies sur le terrain de recherche du Departement de Botanique, de l'Université de Kakatiya à Warangal et sont utilisées comme explants. On retire les feuilles des pousses, qui sont taillées en des segments nodaux simples de 3 cm, on les lave pendant 30 mn sous l'eau du robinet, puis on les trempe dans du Tween-20 à 0,1 % (p/v) pendant 10 minutes, puis on les rince (5 à 6 fois) avec de l'eau distillée. On procède à une stérilisation de la surface avec de l'hypochlorure de sodium à 10 % pendant 10 minutes, suivie par trempage 5 mn dans du chlorure de mercurochrome à 0,1 % (p/v) avant de les rincer quatre fois avec de l'eau stérile. Les explants taillés de 1 à 2 cm sont cultivés séparément sur du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) contenant 3 % de saccharose (p / v). Le pH est ajusté à 5,7 avant d'ajouter de l'agar (0,8 %) et de l'autoclaver à 121° C pendant 15 minutes. Les milieux de culture sont additionnés avec des concentrations variées de thidiazuron (TDZ, 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 mg l), de benzyladénine (BA 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 mg/l) ou de kinétine (Kn, 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 mg/l) pour la stimulation et l'allongement des pousses.

Pour le racinement, des régénérants individuels de 1 à 2 cm de longueur ayant 3 à 5 feuilles sont isolés et transférés dans des tubes contenant du milieu B5 modifié (Gamborg et coll., 1968) ou du milieu liquide MS de base complet ou mélangé à moitié avec de l'agar additionné d'auxine. Des bateaux en papier filtre supportent le milieu liquide. Pour les expériences de racinement, des auxines comme l'acide indole-3-butérique (IBA), l'acide indole-3-acétique (IAA), l'acide naphthalénacétique (NAA) sont utilisées à des niveaux de 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 et 5,0 mg/l. Les pousses racinées *in vitro* sont lavées de manière répétée 4 à 5 fois sous l'eau du robinet avant d'être mises en pots dans des récipients en plastique contenant du sol stérilisé et de la vermiculite (1 : 1). Les plantules sont recouvertes avec des feuilles de polyéthylène pour minimiser la perte d'humidité et transférées en serre (24° C le jour, 28° C la nuit ; durée du jour 16 h, 65 % d'H. R.). Pendant l'établissement et la multiplication des pousses, les cultures sont incubées sous une lumière fluorescente froide à une intensité de 40 à 60 lux m⁻² sec⁻¹ avec une photopériode de 16 h et une température de 25 ± 2° C. Les données concernant la réponse de multiplication / d'éclatement des bourgeons et la longueur des pousses sont analysées de manière statistique en utilisant le test de Duncan (DMRT). Pour toutes les expériences on conserve 20 cultures dans deux blocs et chaque expérience est répétée une fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le TDZ est le plus efficace pour induire des pousses à partir d'explants nodaux avec un éclatement précoce des bourgeons axillaires (5 à 7 jours) tandis qu'avec le BA ou le Kn la rupture des bourgeons est retardée (7 à 10 jours). L'allongement des pousses qui se produit sur le milieu contenant du TDZ à raison de 0,05 mg / l est le plus important en terme de multiplication des pousses (1,89 ± 0,21). Les segments nodaux comprenant deux bourgeons axillaires présentent une prolifération des pousses sur les deux bourgeons, qui atteignent presque une longueur égale (Fig. 1a). Cependant, il n'y a qu'une pousse unique qui émerge quand on cultive un segment nodal avec seulement un bourgeon axillaire. On obtient facilement une induction de pousses même avec les autres concentrations de TDZ qui sont moins efficaces pour promouvoir la prolifération des pousses (Tab. I). De plus, une concentration plus élevée de TDZ (1,0 mg/l) donne à la fois une production de pousses axillaires et adventives (Fig. 1b). La fréquence de rupture des bourgeons et de multiplication des pousses est plus élevée avec 4,0 mg / l de BA. Avec 1,0 ; 2,0 ou 3,0 mg / l, le BA donne plus de 50 et moins de 65 % de réponse avec des pousses plus courtes. Le pourcentage de réponse et la longueur moyenne de pousse diffèrent entre les

traitements avec du Kn et avec 4,0 mg / l l'effet est significatif. Aucune des autres concentrations n'est efficace pour accélérer la production des pousses axillaires.

Une concentration progressivement plus élevée de TDZ et des concentrations plus faibles de BA ou de Kn donnent une mauvaise multiplication des bourgeons axillaires. On obtient une réponse favorable avec une concentration plus faible de TDZ pour la multiplication des bourgeons axillaires. Cette activité cytokinique élevée et la réponse positive des espèces ligneuses au TDZ en font la cytokinine la plus active pour la manipulation *in vitro* chez de nombreuses espèces ligneuses (Huetteman et Preece, 1993). Avec 0,05 mg / l de TDZ, les pousses sont en moyenne deux fois plus longues que celles obtenues avec du milieu MS additionné avec des niveaux optimaux de BA ou de Kn (4,0 mg/l).

Pour la propagation clonale, la multiplication d'un méristème unique est désirable. L'apport approprié de régulateurs de croissance, qui favorisent la prolifération du méristème axillaire est souvent un paramètre critique pour stimuler des taux élevés de prolifération des pousses axillaires. Dans cette étude, les niveaux optimaux de TDZ (0,05 et 0,1 mg / l), de BA (4,0 mg/l) et de Kn (4,0 mg / l) déclenchent la prolifération du méristème axillaire sans induire de bourgeons des pousses adventives. Cette tendance des bourgeons axillaires à proliférer sans l'induction de pousses adventives, qui pourraient entraîner une variation clonale est toujours désirable dans la propagation clonale.

L'utilisation de différentes concentrations d'IAA et de NAA dans un milieu liquide / solide ou dans un milieu B5 modifié est inefficace pour induire le racinement à partir de pousses régénérées *in vitro*. De plus, la base de la pousse montre une formation de cals abondante. Une racine unique émerge à partir de l'extrémité de la pousse en l'espace de 40 à 45 jours en présence de 1/2 de MS + IBA liquide (4,0 mg / l), qui continue sa croissance linéaire avec une production ultérieure de pousses latérales (Fig. 1c). Le milieu MS liquide est supérieur au milieu solide (Thimmappaiah et Samuel, 1999) et on trouve qu'un milieu pauvre en sel est satisfaisant (Malathy et Pai, 1998). Les pousses racinent dans 50 % des cas. Les racines, cependant, sont très fragiles et se cassent facilement. De plus, on observe le racinement des pousses régénérantes avec des ébauches de racine émergeant de la base de la pousse avec formation de cal.

En raison des effets des composés azotés sur le métabolisme de l'auxine qui affecte le racinement (Moneousin, 1991 ; Karhu, 1997), le milieu B5 avec 1/3 de concentration originelle en azote est utilisé pour l'induction des racines. On obtient un pourcentage élevé de racinement (80 % ou plus) ; (20 à 30 jours) quand les micro pousses sont racinées *in vitro* dans du milieu B5 modifié avec 1,0 mg d'IBA / l (Fig. 1d). Le nombre de racines primaires augmente et il y a plus de racines latérales sur les micro pousses. De plus, aucun tissu de cal ne se forme à la base des micro pousses. Cela montre clairement que les niveaux réduits de B5 en azote chez *T. arjuna* augmentent le pourcentage de racinement et la formation de racines latérales sur les micro pousses. Le pourcentage de racinement est faible (60 %) quand on utilise 2,0 mg d'IBA / l. Les autres concentrations sont inefficaces pour induire le racinement des micro pousses. La capacité à former de longues pousses n'a pas de rapport avec le pourcentage de racinement. Avec du milieu additionné de BA ou de Kn, la plupart des pousses demeurent petites, mais il n'y a pas d'obstacle au racinement. Ainsi, les pousses racinent à un degré similaire avec tous les traitements. Les extrémités des pousses régénérées qui ne racinent pas sur un milieu d'induction des racines sont sévèrement affectées par la nécrose et l'abscission de la culture. Cela pourrait être attribué au fait que sans racines les pousses sont dépourvues d'une source de cytokines endogènes ; la carence en cytokine entraîne l'arrêt de la division des cellules dans le méristème apical et la nécrose cellulaire (Kataeva et coll., 1991 ; Kulkarni et D'Souza, 2000).

Les plants racinés se détachent des tubes et durcissent en serre avec 65 % d'HR. Un mois après la transplantation en serre (Fig. 1e) les plantules viables donnent des yeux dormants et présentent une croissance normale comme le montre l'émergence des nouvelles feuilles et l'allongement des pousses.

On obtient des plantules saines, prêtes à être transférées dans les champs avec un taux de survie de 50 %. Le protocole appliqué ici pour une induction réussie des racines pourrait compléter la méthode de prolifération élevée de pousses rapportée ici pour la première fois.

IMPACT OF UV-LIGHT ON BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE SILK GLAND OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. FED ON MULBERRY LEAF

A. BHARATHI & MIAO YUNGEN*

Department of Sericulture Sri Padmavathi Mahila University, Tirupathi - 517502,
Andhra Pradesh, India.

*The effect of UV-light on biochemical analysis of posterior silk gland of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. was investigated in two popular bivoltine hybrids, Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese) and Chenxin × Jufang fed on mulberry leaf. The larvae of first day of fifth instar were used for the present investigation. The larvae were irradiated with 20W of UV-light at the intensity of 40cm above the larvae and three exposure times (30 min, 60 min and 120 min) were given just before feeding.*

The biochemical analysis of silk gland indicates that UV-light affects the biosynthetic activities of silk gland. UV-light of 60 and 120 minutes affects the biosynthesis of silk gland, whereas UV-light of 30 minutes showed non-significant change.

INTRODUCTION

Silkworm, *Bombyx mori* L., a domesticated mulberry silkworm has been the target of intensive scientific study because of its industrial importance. The use of optical brightness as radiation protectants for gypsy moth nuclear polyhedrosis virus was studied (Shapiro, 1992). The lethal effect of UV-radiation on the adult German cockroach was investigated by Okamoto (1992).

Hence, in the present study an attempt has been made to study the effect of UV-light on biochemical constituents of two bivoltine hybrids of silkworm reared on mulberry leaf.

MATERIALS AND METHODS

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

The silkworms were reared on fresh mulberry leaf at 25° C, RH 70-85% and 12L:12D photoperiod. Each experiment was conducted in three replications. 200 larvae per each replication were reared. The larvae of first day of fifth instar were used for the present investigation. The larvae were irradiated with 20W of UV-light at the intensity of 40cm above the larvae and three exposure times were given just before feeding. After the exposure to UV-light, the larvae were transferred to control light and feeding was given. The total proteins (Lowry *et al.*, 1951), free amino acids (Moore and Stein, 1954) and total carbohydrates (Carroll *et al.*, 1956) were estimated in posterior silk gland of control and experimental silkworm, *Bombyx mori* L.

* Department of Sericulture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China.
Email: miaoyg@zju.edu.cn

RESULTS

Weight of posterior silk gland:

Chenxin × Jufang:

A significant effect ($P < 0.001$) in the weight of posterior silk gland showing a per cent decrease of 20.09 and 34.19 in the bivoltine hybrid was observed, when exposed to UV-light of 60 and 120 minutes respectively over control.

A non-significant change was noticed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Jufang × Chenxin:

A significant effect ($P < 0.001$) in the weight of posterior silk gland showing a per cent decrease of 22.22 and 36.11 in the bivoltine hybrid, when exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control.

A non-significant change was observed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Table I. Weight of post silk gland (mg/g wet wt) of control and experimental (UV-light treatment) fifth instar (from day 5 to day 8) silkworm larva, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; “+” and “-” indicate percent increase and decrease over control respectively. “P” denotes the statistical significance. “NS” – non significant.

Tableau I. Poids de la glande séricigène postérieure (mg / g de poids frais) des larves de ver à soie *Bombyx mori* L. témoins et expérimentales (traitement à la lumière UV) du 5^{ème} âge (du 5^{ème} au 8^{ème} jour) nourries à la feuille de mûrier. Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne $\pm$ écart type ; “+” et “-” indiquent l’augmentation et la baisse en pourcentage respectivement par rapport au témoin. “P” donne la signification statistique. “NS” – non significatif.

	Chenxin × Jufang				Jufang × Chenxin			
	Control Témoin	UV-30	UV-60	UV-120	Control Témoin	UV-30	UV-60	UV-120
Fed on mulberry leaf	0.468	0.451	0.374	0.308	0.432	0.414	0.336	0.276
Nourri à la feuille de mûrier	± 0.036	± 0.040	± 0.031	± 0.026	± 0.032	± 0.038	± 0.028	± 0.022
		-3.63	-20.09	-34.19	0.032	-4.17	-22.22	-36.11
		NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001

Table II. Levels of total proteins (mg/g wet wt) in posterior silk gland of control and experimental (UV light treatment) fifth instar (from day 5 to day 8) silkworm larva, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance. "NS" – non significant.

Tableau II. Niveaux de protéines totales (mg / g poids frais) dans la glande séricigène postérieure des larves du ver à soie Bombyx mori du 5^{ème} âge (du 5^{ème} au 8^{ème} jour) témoins et expérimentales (traitement à la lumière UV) nourries à la feuille de mûrier. Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne $\pm$ Ecart type. "+" et "-" indiquent le pourcentage d'augmentation et de baisse respectivement par rapport au témoin. "P" donne la signification statistique. "NS" – non significatif.

		Chenxin (Japanese) × Jufang (Chinese)				Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese)			
	Day <i>Jour</i>	Control <i>Témoin</i>	Experimental			Control <i>Témoin</i>	Experimental		
			30 min.	60 min.	120 min.		30 min.	60 min.	120 min.
Fed on mulberry leaf	Day 5	81.15	79.87	71.76	64.69	71.35	70.14	62.76	54.79
	<i>Jour 5</i>	± 6.23	± 7.73	± 6.82	± 5.62	± 6.78	± 6.23	± 6.14	± 5.27
			-1.58	-11.57	-20.28	6.78	-1.73	-12.04	-23.21
		NS	P < 0.001	P < 0.001			NS	P < 0.001	p < 0.001
<i>Nourri sur de la feuille de mûrier</i>	Day 6	92.85	90.72	80.53	70.41	83.85	81.22	70.78	61.93
	<i>Jour 6</i>	± 8.94	± 8.27	± 7.62	± 6.37	± 7.98	± 7.72	± 6.58	5.93
			-2.29	-13.27	-24.17	7.98	-3.14	-15.59	-26.14
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 7	98.20	95.07 ±	80.83 ±	71.75	90.40	86.37	71.64	63.58
	<i>Jour 7</i>	± 7.67	9.28	7.76	± 6.10	± 8.81	± 8.45	± 5.92	± 5.61
			-3.19	-17.69	-26.93	8.81	-4.46	-20.75	-29.67
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 8 /	106.0	101.52	82.52	75.26	100.70	95.36	76.15	65.74
	<i>Jour 8</i>	± 8.72	± 9.27	± 7.58	± 6.83	± 9.72	± 8.34	± 6.75	± 5.34
			-4.23	-22.15	-29.0	9.72	-5.30	-24.38	-34.72
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001

Total proteins:

Chenxin $\times$ Jufang:

A significant effect ($P < 0.001$) was observed in the total protein content showing a per cent decrease of 11.57 and 20.28 in day 5, 13.27 and 24.17 in day 6, 17.69 and 26.93 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was noticed when larvae were exposed to UV-light of 30 minutes.

Table III. Levels of free amino acids (mg / gm wet wt) in posterior silk gland of control and experimental (UV light treatment) fifth instar (from day 5 to day 8) silkworm larva, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; "+" and "-" indicate percent increase and decrease over control respectively. "P" denotes the statistical significance. "NS" – non-significant.

Tableau III. Niveaux d'acides aminés libres (mg / g poids frais) dans la glande séricigène postérieure du témoin et de l'expérimental (traitement à la lumière UV) du cinquième âge (du jour 5 au jour 8). Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne $\pm$ écart type ; "+" et "-" indiquent le pourcentage d'augmentation et de baisse par rapport au témoin respectivement. "P" donne la signification statistique. "NS" – non-significatif.

Chenxin (Japanese) $\times$ Jugang (Chinese) Jufang (Chinese) $\times$ Chenxin (Japanese)									
	Day	Control	Experimental			Control	Experimental		
	Jour	Témoin	30 min.	60 min.	120 min.	Témoin	30 min.	60 min.	120 min.
Fed on mulberry leaf	Day 5	16.65	16.32	14.61	13.07	14.13	13.75	12.26	10.94
	Jour 5	± 1.28	± 1.56	± 1.79	± 1.28	± 1.26	± 1.36	± 1.24	± 0.90
			-1.98	-12.25	-21.50		-2.69	-13.23	-22.58
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 6	19.38	18.83	16.51	14.51	17.46	16.89	14.73	12.62
	Jour 6	± 1.73	± 1.67	± 1.63	± 1.38	± 1.68	± 1.48	± 1.39	± 1.21
Nourri sur de la feuille de mûrier			-2.84	-14.81	-25.13		-3.26	-15.64	27.72
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	p < 0.001
	Day 7	22.34	21.50	17.66	15.89	20.73	19.79	16.31	14.27
	Jour 7	± 2.08	± 1.93	± 1.48	± 1.46	± 1.89	± 1.73	± 1.58	± 1.39
			-3.76	-20.95	-28.87		-4.53	-21.32	-31.16
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 8	25.78	24.53	19.69	17.38	23.82	22.46	17.56	15.38
	Jour 8	± 2.39	2.25	± 1.73	± 1.66	± 2.06	± 2.12	± 1.72	± 1.46
			-4.85	-23.62	-32.58		-5.71	-26.28	-35.43
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001

Jufang $\times$ Chenxin:

A significant effect was observed ($P < 0.001$) in the total protein content showing a percent decrease of 12.04 and 23.21 in day 5, 15.59 and 26.14 in day 6, 20.75 and 29.67 in day 7 and 24.38 and 34.72 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. Non-significant change was observed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Free amino acids:

Chenxin $\times$ Jufang:

A significant effect ($P < 0.001$) was observed in the free amino acid content showing a per cent decrease of 12.25 and 21.50 in day 5, 14.81 and 25.13 in day 6, 20.95 and 28.87 in day 7 and 23.62

and 32.58 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was noticed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Jufang × Chenxin:

A significant effect ($P < 0.001$) was noticed in the amino acid content showing a per cent decrease of 13.23 and 22.58 in day 5, 15.64 and 27.72 in day 6, 21.32 and 31.16 in day 7 and 26.28 and 35.43 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was observed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Table IV. Levels of RNA ($\mu\text{g/g}$ wet weight) in posterior silk gland of control and experimental (UV light treatment) fifth instar (from day 5 to day 8) silkworm larva, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D. “+” and “-” indicate percent increase and decrease over control respectively. “P” denotes the statistical significance. “NS” – non significant.

*Tableau IV. Niveau en ARN ($\mu\text{g/g}$ poids frais) dans la glande séricigène postérieure des larves de ver à soie, *Bombyx mori* du 5^{ème} âge (du jour 5 au jour 8) nourries sur de la feuille de mûrier. Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. Moyenne $\pm$ écart type ; “+” et “-” indiquent le pourcentage d’augmentation et de baisse par rapport au témoin respectivement. “P” donne la signification statistique. NS – non significatif.*

Day Jour	Chenxin (japanese) × Jufang (Chinese)				Jufang (Chinese) × Chenxin (Japanese)			
	Control Témoin	Experimental			Control Témoin	Experimental		
		30 min.	60 min.	120 min.		30 min.	60 min.	120 min.
Day 5 Jour 5	3.12 ± 0.27	3.08 ± 0.25 -1.28 NS	2.59 ± 0.21 -16.99 $P < 0.001$	2.45 ± 0.23 -21.47 $P < 0.001$	2.96 ± 0.22 0.22	2.91 ± 0.25 -1.69 NS	2.43 ± 0.20 -17.91 $P < 0.001$	2.29 ± 0.18 -22.64 $P < 0.001$
Day 6 Jour 6	3.42 ± 0.29	3.34 ± 0.31 -2.34 NS	2.79 ± 0.25 -18.42 $P < 0.001$	2.63 ± 0.22 -23.09 $P < 0.001$	3.31 ± 0.28 0.28	3.21 ± 0.25 -3.02 NS	2.67 ± 0.19 -19.34 $P < 0.001$	2.49 ± 0.22 -24.77 $P < 0.001$
Day 7 Jour 7	3.75 ± 0.32	3.63 ± 0.32 -3.20 NS	2.98 ± 0.26 -20.53 $P < 0.001$	2.81 ± 0.21 -25.07 $P < 0.001$	3.62 ± 0.32	3.48 ± 0.31 -3.87 NS	2.83 0.25 -21.82 $P < 0.001$	2.65 0.20 -26.79 $P < 0.001$
Day 8 Jour 8	4.56 ± 0.43	4.36 ± 0.39 -4.38 NS	3.49 ± 0.25 -23.46 $P < 0.001$	3.24 ± 0.26 -28.95 $P < 0.001$	4.33 0.39	4.13 ± 0.35 -4.62 NS	3.31 ± 0.27 -23.56 $P < 0.001$	3.07 ± 0.23 -29.09 $P < 0.001$

Table V. Levels of total carbohydrates (mg/g wet wt) in posterior silk gland of control and experimental (UV-light treatment) fifth instar (from day 5 to day 8) silkworm larva, *Bombyx mori* L. fed on mulberry leaf. Values are the mean of 10 individual observations. Mean $\pm$ S. D.; “+” and “-” indicate percent increase and decrease over control respectively. “P” denotes the statistical significance. “NS” – non significant.

Tableau V. Niveaux des hydrates de carbone totaux (mg / g de poids frais) dans la glande séricigène postérieure du témoin et de l'expérimental (traitement à la lumière UV) chez des larves de ver à soie du 5^{ème} âge (du jour 5 au jour 8), Bombyx mori L. nourries sur de la feuille de mûrier. Les valeurs sont la moyenne de 10 observations individuelles. La moyenne $\pm$ Ecart type, “+” et “-” indiquent le pourcentage d'augmentation et de baisse respectivement par rapport au témoin. “P” donne la signification statistique. “NS” – non significatif.

		Chenxin (Japanese) $\times$ Jufang (Chinese)				Jufang (Chinese) $\times$ Chenxin (Japanese)			
	Day Jour	Control Témoin	Experimental			Control Témoin	Experimental		
			30 min.	60 min.	120 min.		30 min	60 min	120 min
Fed on mulberry leaf	Day 5	3.12	3.08	2.59	2.45	2.96	2.91	2.43	2.29
	Jour 5	± 0.27	± 0.25	± 0.21	± 0.23	± 0.22	± 0.25	± 0.20	0.18
			-1.28	-16.99	-21.47	0.22	-1.69	-17.91	-22.64
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
Nourri sur de la feuille de mûrier	Day 6	3.42	3.34	2.79	2.63	3.31	3.21	2.67	2.49
	Jour 6	± 0.29	± 0.31	± 0.25	± 0.22	± 0.28	± 0.25	± 0.19	± 0.22
			-2.34	-18.42	-23.09	0.28	-3.02	-19.34	-24.77
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 7	3.75	3.63	2.98	2.81	3.62	3.48	2.83	2.65
	Jour 7	± 0.32	± 0.32	± 0.26	± 0.21	± 0.32	± 0.31	± 0.25	± 0.20
			-3.20	-20.53	-25.07	0.32	-3.87	-21.82	-26.79
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001
	Day 8	4.56	4.36	3.49	3.24	4.33	4.13	3.31	3.07
	Jour 8	± 0.43	± 0.39	± 0.25	± 0.26	± 0.39	± 0.35	± 0.27	± 0.23
			-4.38	-23.46	-28.95	0.39	-4.62	-23.56	-29.09
			NS	P < 0.001	P < 0.001		NS	P < 0.001	P < 0.001

RNA:

Chenxin $\times$ Jufang:

A significant effect ($P < 0.001$) was observed in the RNA content showing a per cent decrease of 16.99 and 21.47 in day 5, 18.42 and 23.09 in day 6, 20.53 and 25.07 in day 7 and 23.46 and 28.95 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. Non-significant change was noticed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Jufang $\times$ Chenxin:

A significant effect ($P < 0.001$) was noticed in the RNA content showing a percent decrease of 17.91 and 22.64 in day 5, 19.34 and 24.77 in day 6, 21.82 and 26.79 in day 7 and 23.56 and 29.09 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light of 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was observed when larvae were exposed to UV light of 30 minutes.

Total carbohydrates:

Chenxin $\times$ Jufang:

A significant effect ($P < 0.001$) was observed in the total carbohydrates content of posterior silk gland showing a percent decrease of 16.99 and 21.47 in day 5, 18.42 and 23.09 in day 6, 20.53 and 25.07 in day 7 and 23.46 and 28.95 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light during 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was noticed when larvae were exposed to UV light during 30 minutes.

Jufang $\times$ Chenxin:

A significant effect ($P < 0.001$) was noticed in the total carbohydrates content showing a per cent decrease of 17.91 and 22.64 in day 5, 19.34 and 24.77 in day 6, 21.82 and 26.79 in day 7 and 23.56 and 29.09 in day 8 of fifth instar larva exposed to UV light during 60 and 120 minutes respectively over control. A non-significant change was observed when larvae were exposed to UV-light during 30 minutes.

DISCUSSION

The weights of posterior silk gland from day 5 to day 8 decreased significantly as indicates the observed decrease in the weight of the larva. The decrease in the biochemical constituents such as proteins, free amino acids, RNA and carbohydrates were correlated with the decreased biosynthetic activities such as cocoon, shell weights and silk proteins (Bharathi and Miao, 2001). UV-light affects the growth and metabolism of silkworm. The percent decrease was more in the larvae treated with UV-light of 120 minutes as compared to control. UV light affects the basal metabolic rate leading to a drastic decrease in the organic constituents of posterior silk gland. The decrease in the cocoon weight contributing to silk yield may be attributed to the decreased synthesis of proteins and nucleic acids in silkworm. UV light might have a drastic effect upon body cells by regulation of organs of internal secretion or both.

The decrease in total proteins and free amino acids indicates decreased metabolic activities. Since free amino acids are the basic units of silk, decreased amino acid content affects the activation of silk production, the conditions which are not congenial for the growth and silk production. The decrease in the protein profiles suggests that the silk gland had less synthetic activities which might affect active spinning of silkworm larvae. The decrease in protein content of silk gland indicates increased proteolysis of silk gland.

Carbohydrate is an important dietary constituent in most of the insects. The decrease in total carbohydrates in posterior silk gland suggests that UV-light affects the extent of utility of these energy sources in the function of silk gland.

The biochemical analysis of silk gland indicates that UV light affects the cocoon crop production and deranged biosynthetic activities of silk gland. Hence it can be concluded that UV light of 60 and 120 minutes affects the growth, cocoon production affecting the biosynthesis of silk gland. Whereas UV light of 30 minutes showed non-significant change.

REFERENCES

- BHARATHI D. & MIAO Y. (2001) The effect of UV light on larval growth, fecundity, cocoon characters and silk quality of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., *Sericologia*, No. 41(2), 2001.
- CARROLL N. V., LONGLEY R. W. & ROE J. H., 1956 Glycogen determination in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 220: 583-593.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARRA L. & RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MOORE S. & STEIN W. A. (1954) A modified ninhydrine reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211: 907-913.
- OKAMOTO K., 1992 The lethal effect of UV-radiation on the adult German cockroach. I. Differences in the lethal effect by irradiation regimes. *Jpn. J. Sanitary-Zool*, 43: 235-241.
- SHAPIRO M., 1992. Use of optical brightness as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 85: 1682-1686.

IMPACT DE LA LUMIERE UV SUR LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA GLANDE SERICIGENE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L. NOURRI SUR DE LA FEUILLE DE MURIER

A. BHARATI & MIAO YUNGEN*

Department of Sericulture, Sri Padmavathi Mahila University, Tirupathi – 517502, Andhra Pradesh, Inde.

*L'effet de la lumière UV par rapport à l'analyse biochimique de la glande séricigène postérieure du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. a été étudié chez deux hybrides bivoltins populaires, Jufang (Chinois) × Chenxin (Japonais) et Chenxin × Jufang nourris sur de la feuille de mûrier. Les larves du premier jour du cinquième âge sont utilisées pour cette étude. Les larves sont irradiées avec 20W de lumière UV 40cm au-dessus des larves et pendant trois durées d'exposition (30 min., 60 min. et 120 min.) juste avant le nourrissage.*

L'analyse biochimique de la glande séricigène indique que la lumière UV a un effet sur les activités biosynthétiques de la glande séricigène. La lumière UV pendant 60 et 120 minutes a un effet sur la biosynthèse dans la glande séricigène tandis que la lumière UV pendant 30 minutes n'entraîne pas de changement significatif.

INTRODUCTION

Le ver à soie domestiqué *Bombyx mori* L. a été l'objet d'études scientifiques intensives en raison de son importance pour l'industrie. L'utilisation de la lumière optique comme protecteur contre le virus de la polyédrose nucléaire chez le papillon Gypsy a été étudiée (Shapiro, 1992). L'effet mortel de l'irradiation UV a été étudié chez la blatte par Okamoto (1992).

Nous avons donc essayé dans cette étude d'étudier l'effet de la lumière UV sur les constituants biochimiques de deux hybrides bivoltins du ver à soie élevés sur de la feuille de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Les pontes saines de deux hybrides bivoltins, Jufang (Chinois) × Chenxin (Japonais) et Chenxin (Japonais) × Jufang (Chinois) sont fournies par le Sericulture Department of Zhejiang Agricultural Bureau, Hangzhou, Zhejiang, Chine.

Les vers à soie sont élevés sur de la feuille de mûrier fraîche à 25° C, avec 70 à 85 % d'HR et une photopériode de 12 L : 12 O. Chaque expérience est répétée trois fois. On élève 200 larves pour chaque répétition. Les larves du premier jour du cinquième âge sont utilisées dans notre étude. Les larves sont irradiées avec une intensité de 20W de lumière UV, 40cm au-dessus des larves et pendant trois durées d'exposition juste avant le nourrissage. Après l'exposition à la lumière UV, les larves

* Department of Sericulture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, Chine.
Email: miaoyg@zju.edu.cn

sont transférées sous une lumière témoin et sont nourries. On mesure les protéines totales (Lowry et coll., 1951), les acides aminés libres (Moore et Stein, 1954) et les hydrates de carbone totaux (Caroll et coll., 1956) dans la glande séricigène postérieure du ver à soie témoin et expérimental, *Bombyx mori* L.

RESULTATS

Poids de la glande séricigène postérieure :

Chenxin × Jufang :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur le poids de la glande séricigène postérieure qui présente une baisse de 20,09 et 34,19 % par rapport au témoin chez l'hybride bivoltin quand il est exposé pendant respectivement 60 et 120 minutes à la lumière UV.

On ne remarque pas de changement significatif quand les larves sont exposées à une lumière UV pendant 30 minutes.

Jufang × Chenxin :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur le poids de la glande séricigène postérieure avec une baisse du poids de la glande séricigène de 22,22 et 36,11 % chez l'hybride bivoltin quand il est exposé à une lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes par rapport au témoin.

On n'observe pas de changement significatif quand les larves sont exposées à la lumière UV pendant 30 minutes.

Protéines totales :

Chenxin × Jufang :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur totale en protéines avec une baisse en pourcentage de 11,57 et 20,28 le 5^{ème} jour, de 13,27 et 24,17 % le 6^{ème} jour, de 17,69 et 26,93 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes. On n'observe pas de changement significatif quand les larves sont exposées à la lumière UV pendant 30 minutes.

Jufang × Chenxin :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur totale en protéines avec une baisse en % de 12,04 et 23,21 le 5^{ème} jour, de 15,59 et 26,14 % le 6^{ème} jour, de 20,75 et 29,67 % le 7^{ème} jour et de 24,38 et 34,72 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes. On n'observe pas de changement significatif quand les larves sont exposées à la lumière UV pendant 30 minutes.

Acides aminés libres :

Chenxin × Jufang :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur en acides aminés qui présente une baisse en pourcentage de 12,25 et 21,50 le 5^{ème} jour, de 14,81 et 25,13 % le 6^{ème} jour, de 20,95 et 28,87 % le 7^{ème} jour et de 23,62 et 32,52 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes. On ne remarque pas de changement significatif quand les larves sont exposées à la lumière UV pendant 30 minutes.

Jufang × Chenxin :

On remarque un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur en acides aminés qui présente une baisse en % de 13,23 et 22,58 le 5^{ème} jour, de 15,64 et 27,72 % le 6^{ème} jour, de 21,32 et 31,16 % le 7^{ème} jour et de 26,28 et 35,43 le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes.

On n'observe pas de changement significatif quand les larves sont exposées à de la lumière UV pendant une durée de 30 minutes.

ARN :

Chenxin × Jufang :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur en ARN avec une baisse en pourcentage de 16,99 et 21,47 % le 5^{ème} jour, de 18,42 et 23,09 % le 6^{ème} jour, de 20,53 et 25,07 % le 7^{ème} jour et de 23,46 et 28,95 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à de la lumière UV pendant respectivement 60 et 120 minutes par rapport au témoin.

On ne remarque pas de changement significatif quand les larves sont exposées à de la lumière UV pendant 30 minutes.

Jufang × Chenxin :

On remarque un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur en ARN qui présente une baisse en pourcentage de 17,91 et 22,64 % le 5^{ème} jour, de 19,34 et 24,77 % le 6^{ème} jour, de 21,82 et 26,79 % le 7^{ème} jour et de 23,56 et 29,09 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à de la lumière UV pendant 60 et 120 minutes respectivement par rapport au témoin.

On n'observe pas de changement significatif quand les larves sont exposées à de la lumière UV pendant 30 minutes.

Hydrates de carbone totaux :

Chenxin × Jufang :

On observe un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur totale en hydrates de carbone de la glande séricigène postérieure, qui présente une baisse de 16,99 et 21,47 % le 5^{ème} jour, de 18,42 et 23,09 % le 6^{ème} jour, de 20,53 et 25,07 % le 7^{ème} jour et de 23,46 et 28,95 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à la lumière UV pendant 60 et 120 minutes respectivement par rapport au témoin. On remarque un changement non significatif quand les larves sont exposées à de la lumière UV pendant 30 minutes.

Jufang × Chenxin :

On remarque un effet significatif ($P < 0,001$) sur la teneur totale en hydrates de carbone qui présente une baisse en pourcentage de 17,91 et 22,64 % le 5^{ème} jour, de 19,34 et 24,77 % le 6^{ème} jour, de 21,82 et 26,79 % le 7^{ème} jour et de 23,56 et 29,09 % le 8^{ème} jour chez les larves du 5^{ème} âge exposées à de la lumière UV pendant 60 et 120 minutes respectivement par rapport au témoin.

On observe un changement non-significatif quand les larves sont exposées à de la lumière UV pendant 30 minutes.

DISCUSSION

Les poids de la glande séricigène du 5^{ème} au 8^{ème} jour baissent de manière significative comme l'indiquent nos observations. La baisse des constituants biochimiques comme les protéines, les acides aminés libres, l'ARN et les hydrates de carbone est corrélée avec la baisse des activités biosynthétiques telles que les poids du cocon et de la coque et les protéines de soie (Bharathi et Miao, 2001). La lumière UV a un effet sur la croissance et le métabolisme du ver à soie. Le pourcentage de baisse par rapport au témoin est plus important chez les larves traitées avec de la lumière UV pendant 120 minutes. La lumière UV a un effet sur le taux métabolique de base qui entraîne une baisse radicale des constituants organiques de la glande séricigène postérieure. La baisse du poids du cocon contribuant au rendement en soie pourrait être attribuée à la baisse de la synthèse des protéines et des acides nucléiques chez le ver à soie. La lumière UV pourrait avoir un effet radical sur les cellules corporelles par la régulation des organes de sécrétion interne ou par les deux.

La baisse des protéines totales et des acides aminés libres indique la baisse des activités métaboliques. Puisque les acides aminés libres sont les unités de base de la soie, la baisse de la teneur en acides aminés a un effet sur la production de soie, des conditions qui ne sont pas propices à la croissance et à la production de soie. La baisse des profils de protéines suggère que la glande séricigène a moins d'activités de synthèse, ce qui pourrait avoir un effet sur le filage actif des larves de vers à soie. La baisse de la teneur en protéines de la glande séricigène indique une augmentation de la protéolyse de la glande séricigène.

Les hydrates de carbone sont des constituants alimentaires importants chez la plupart des insectes. La baisse des hydrates de carbone totaux dans la glande séricigène postérieure laisse suggérer que la lumière UV a un effet sur le degré d'utilisation de ces sources d'énergie dans la fonction de la glande séricigène.

L'analyse biochimique de la glande séricigène indique que la lumière UV a un effet sur la production de cocons et dérange les activités biosynthétiques de la glande séricigène. On peut donc conclure qu'une exposition à la lumière UV pendant 60 et 120 minutes a un effet sur la croissance, la production de cocons, qui affecte la biosynthèse de la glande séricigène. Tandis que l'exposition à la lumière UV pendant une durée de 30 minutes n'entraîne pas de changement significatif.

BIOLOGICAL CONTROL OF UZIFLY, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER, (DIPTERA: TACHINIDAE) INFESTING TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K. SHARAN, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, India.

The tachinid fly, *Blepharipa zebina* Walker, a larval endoparasitoid of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae), causes considerable damage to tasar silk industry. In the recent years, biological studies on the parasitoids of *B. zebina* were conducted. The studies conducted through large scale releases involving four parasitoids of uzifly i. e., *Nesolynx thymus* (Eulophidae), *Brachymeria lasus* (Chalcididae), *Trichopria* sp. (Diapriidae) and *Exoristobia philippinensis* (Encyrtidae) have indicated that *N. thymus* has most effective dispersal ability and also parasitisation potential. Importance of augmentation of the hyper-parasitoids is discussed.

With a view to make bio-control more target oriented, it is felt necessary (a) to make concerted efforts for the collection of parasitoids of uzifly from different agro-climatic zones and (b) to set up a germplasm bank of the parasitoids of uzifly for utilisation by various agencies in different zones.

Keywords: *Antheraea mylitta*, endo-parasitoid, *Blepharipa zebina*, biological control, *Nesolynx thymus*, *Brachymeria lasus*, *Trichopria* sp., *Exoristobia philippinensis*.

INTRODUCTION

The tachinid fly, *Blepharipa zebina* Walker is a larval endo-parasitoid of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) and causes 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).

In recent years, substantial efforts were made towards biological control of uzifly, *B. zebina* (Singh *et al.*, 1995; Kishore *et al.*, 1996). Several natural enemies including four parasitoids of uzifly were identified. The information emanating from such studies assumes importance especially because the secondary parasitoids are known to act as mortality factors of primary parasitoids (Kumar *et al.*, 1993).

The investigations reported here provide some insight into the degree of efficiency of four indigenous parasitoids of uzifly, earlier reported by various workers in the recent years (Singh *et al.*, 1995; Kishore *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1991). The rate of parasitisation and dispersal ability of each of the parasitoid under identical condition was determined to serve as a bio-control agent for the control of uzifly, *B. zebina*.

MATERIALS AND METHODS

The indigenous hymenopteran species used in this study are *Nesolynx thymus* Girault (Eulophidae), *Brachymeria lasus* Walker (Chalcididae), *Trichopria* sp. (Diapriidae) and *Exoristobia*

philippinensis Ashmead (Encyrtidae) (Singh *et al.*, 1995; Kishore *et al.*, 1996; Kishore *et al.*, 1999). Mass multiplication of these parasitoids was carried out in an insectarium at $26 \pm 2^\circ \text{C}$ and $65 \pm 5\%$ RH. Adults of all these parasitoids for mass multiplication were obtained from the laboratory colony maintained using the methods proposed by Kumar (1987). House fly, *Musca domestica* puparia served as host for mass multiplication of these parasitoids. House fly puparia were collected from laboratory colony maintained for the purpose. Healthy puparia of *M. domestica* were placed in glass cages and allowed to be parasitised separately by *N. thymus*, *B. lasus*, *Trichopria* sp. and *E. philippinensis*. A ratio of 1:5 was maintained between female parasitoid and host puparia to get maximum number of parasitoids. Adult parasitoids were collected and fed on 50% aqueous honey solution for 1-2 days before being transported for field release. Release of parasitoids was done in the tasar silkworm rearing fields and grainages (tasar silkworm egg production unit) at different sites. A ratio of 1:2 was maintained between parasitoid female and uzifly puparia. Release of parasitoids was done three times at an interval of 15 days. Host puparia were kept in wire mesh cages (100 in each cage) in rearing field and grainages at different distances from parasitoid release point and were replaced once in a week with a new set of puparia. Ten replications were maintained for collection of data. Exposed uzifly puparia were collected back from the field and were subsequently cultured in the laboratory for recording of data on parasitisation potential, emergence of adult parasitoid per parasitised pupa and dispersal ability of the parasitoids. The experiment was carried out at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and $65 \pm 5\%$ RH. Replicated data were subjected to statistical analysis (Fisher and Yates, 1963) to determine the level of significance following ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

The biological studies on parasitisation potential of the four parasitoids indicate the results necessary to attribute their features as effective natural enemies against uzifly. The percentage of uzifly, *B. zebina* puparia ($40.8 \pm 3.5\%$) parasitised by *N. thymus* was maximum (Table I) while the degree of parasitisation by *Trichopria* sp., *E. philippinensis* and *B. lasus* recorded were $20.2 \pm 1.9\%$, $15.4 \pm 1.8\%$ and $4.6 \pm 1.9\%$, respectively. Even the number of *N. thymus* adults (75.9 ± 10.6) developed successfully in one parasitised uzifly pupa was significantly higher compared to the number of adults of *Trichopria* sp. (59.3 ± 13.5), *E. philippinensis* (30.4 ± 9) and *B. lasus* (1.0 ± 0.0) emerged out from each parasitised host puparium. Dispersal ability is the most desirable characteristic of an efficient natural enemy. When *N. thymus*, *E. philippinensis*, *Trichopria* sp. and *B. lasus* were released periodically at different distances of silkworm rearing fields and grainages at Central Tasar Research and Training Institute (CTR&TI), Ranchi (India), it was found that the former two parasitoids were capable of dispersing and searching the host puparia located even up to 65 m as against 30 m in the case of other two parasitoids. The range of parasitisation by each parasitoid and the maximum distance of dispersal and parasitisation potential vary among the four parasitoids studied (Table I).

The parasitisation was not shared by any of the hymenopteran parasitoid species. It, therefore, appears that either all the four parasitoids discriminate the uzi puparia parasitised by the other parasitoids species, or the parasitoid species, which attacked the uzi puparia, first seems to complete the development successfully. These factors have also been attributed to be the reasons for successful development of the hymenopteran parasitoids species when a single host puparia exposed to more than one parasitoid species (Ryan and Medley, 1972).

Further, if simultaneous competition by two or more parasitoid species for one stage of a host takes place, it is the one species which usually become dominant due to specific fitness (Flanders, 1965) and this dominant species is designated as superior or efficient (Smith, 1929). In the light of this statement, it can therefore, be inferred from the present study, that among four parasitoids, *N. thymus* is the most efficient parasitoid against *B. zebina*, with higher degree of dispersal ability and also parasitisation potential.

Table I. Parasitisation potential, adult emergence per parasitised pupa and searching ability of parasitoids of uzifly.

Tableau I. Potentiel de parasitisme, émergence des adultes par nymphe parasitée et capacité de recherche des parasitoïdes de la mouche uzi.

Sl. No.	Natural enemies used in study	% of uzifly puparia parasitised by parasitoids	Number of parasitoids emerged per parasitised pupa	Dispersal ability (Metre)
No. de série	Ennemis naturels utilisés dans l'étude	% de pupes de la mouche uzi parasité par les parasitoïdes	Nombre de parasitoïdes ayant émergé par pupe parasitée	Capacité de dispersion (Mètres)
1.	<i>Nesolynx thymus</i>	40.8 ± 3.5	75.9 ± 10.6	65
2.	<i>Trichopria</i> sp	20.2 ± 1.9	59.3 ± 13.5	30
3.	<i>Exoristobia philippinensis</i>	15.4 ± 1.8	30.4 ± 9.9	65
4.	<i>Brachymeria lasus</i>	4.6 ± 1.9	1.0 ± 0.0	30
C.D. at 5%		3.22	15.76	-

Table II. Percentage of parasitisation by *N. thymus* at weekly intervals after field release.

Tableau II. Pourcentage de parasitisme par *N. thymus* à intervalles hebdomadaires après la libération sur le terrain.

Week after release	Percentage of parasitisation ± S. D.	
	Silkworm rearing field	Grainage
Semaine après la libération	Pourcentage de parasitisme ± Ecart type	
	Champ d'élevage des vers à soie	Grainage
I	41.5 ± 22.2	75.1 ± 9.0
II	21.0 ± 5.9	29.7 ± 6.8
III	12.5 ± 9.1	6.4 ± 1.5

In continuation of the above study when *N. thymus* adults were released in tasar silkworm rearing fields and grainages at CTR&TI, Ranchi, the average parasitisation percentage obtained at weekly intervals after release is recorded in Table II.

The results indicate that to realise maximum parasitisation potential, *N. thymus* should be released at weekly interval.

Augmentation of the parasitoids of uzifly:

Sometimes, an indigenous or exotic natural enemy is already established but its numbers are insufficient to lower the target organism below the pest status. The natural enemy numbers are then boosted by rearing in large numbers in the laboratory for regular or occasional release in the field. This method is generally known as augmentation of natural enemies (Ridgway and Vinson, 1977), which is now being tested for bio-control of uzifly in our present study.

Need for collection of more parasitoids of uzifly from different agro-climatic zones:

Generally, classical bio-control involves searching for natural enemies in their native area where they exert an important regulatory pressure upon the pest. Such natural enemies are collected and sent to the country or area where the pest population outbreak is frequent. This method is the most well known aspect of bio-control. It is emphasised here that few parasitoids of uzifly, *B. zebina* are reported from Ranchi (Jharkhand) and therefore, there is an urgent need to search for more parasitoids from other agro-climatic zones where this uzifly is a serious problem for tasar silk industry.

Need for germplasm bank:

Though eight parasitoids of uzifly have been reported in recent years, (Singh *et al.*, 1995; Kishore *et al.*, 1996) detailed studies have been conducted with regard to four parasitoids only. In the case of others, either their culture has not been maintained or their report is of recent origin and therefore, their biological studies are still incomplete or to be initiated. It is, therefore, felt necessary to set up a germplasm bank of the parasitoids of uzifly in one or two identified institutes, provided these organisations take the responsibility of maintaining the culture and supply the same as and when required by the agencies engaged in evolving bio-control of uzifly.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Sri Suresh Rai, Statistician, Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi for analysis of the experimental data.

REFERENCES

- CHATURVEDI H. K., SAXENA V. & KHOTALE V. (1986) Survey of uzifly infestation in Baster district (India). *Indian J. Zool.*, 14(2): 27-32.
- FISHER R. A. & YATES F. (1963) Statistical tables for biological, Agricultural and Medical Research, Longman, England, 146 p.
- FLANDERS S. E. (1965) Competition and Co-operation among parasitic hymenoptera related to biological control. *Can. Entomol.*, 97: 409-422.
- JOLLY M. S., SEN S. K. & AHSAN M. M. (1974) *Tasar culture*, Ambika Publishers, Bombay, India, 266 p.
- KISHORE R., BARDAIYAR B. N., GUPTA R. & KARNAN P. (1996) Bionomics and control of uzifly. Annual report, CTR&TI, Ranchi (India), 48 p.
- KISHORE R., SHARMA S. P., PRASAD B. C., SINHA B. R. R. P. & THANGAVELU K. (1999) Evaluation of four hymenopteran parasitoids against uzifly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae). National Seminar on Tropical Sericulture, held at GKVK, Bangalore. Abstract on page 53.

- KUMAR P. (1987) Contribution to our knowledge on *Tricholyga bombycis* – a serious parasite of *Bombyx mori* and its control. Ph. D. Thesis, University of Mysore, 328 p.
- KUMAR P., KISHORE R. & SENGUPTA K. (1991) Parasitoids of uzifly, *Exorista sorbillans* Wiedemann (Diptera: Tachinidae). XIII. Studies on the efficacy of *Nesolynx thymus* (Girault) at field level. Indian J. Seric., 30(2): 161-163.
- KUMAR P., MANJUNATH D. & DATTA R. K. (1993) Biological control of uzifly, Recent Adv. Uzifly Res., 91-106.
- RIDGWAY R. L. & VINSON S. R. (1977) Biological control by augmentation of natural enemies, Plenum Press, New York, 286 p.
- RYAN R. B. & MEDLEY R. D. (1972) Interaction between two parasitoids, *Apechthis ontaria* and *Itoplectis quadricingulatus* 2F. 1. Progeny production in light stratified population cages. Ann. Entomol. Soc. Amer., 65: 172-177.
- SINGH R. N. & THANGAVELU K. (1991) Parasites and predators of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* and their control measures. Indian silk, 29(12): 33-36.
- SINGH R. N., MANDAL K. C. & THANGAVELU K. (1995) *Blepharipazezina* Walker (Tachinidae: Diptera). A new host record for hymenopteran parasitoids, *Brachymeria lasus* Walker and *Theronia moskeliya* Cameron. Indian J. Seric. 34(1): 72-73.
- SMITH H. S. (1929) Multiple parasitisation: Its relation to the biological control of insect pests. Bull. Ent. Res., 20: 141-149.

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA MOUCHE UZI, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER, (DIPTERA : TACHINIDAE) INFESTANT LE VER A SOIE TASAR, *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. K SHARAN, B. R. R. P. SINHA & K. THANGAVELU

Central Tassar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, Inde.

La mouche tachinaire, *Blepharipa zebina* Walker, un endoparasitoïde larvaire du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) provoque des dégâts considérables pour l'industrie de la soie tassar. Récemment, des études biologiques ont été réalisées sur les parasitoïdes de *B. zebina*. Les études réalisées grâce à des libérations à grande échelle de quatre parasitoïdes de la mouche uzi, *Nesolynx thymus* (Eulophidae), *Brachymeria lasus* (Chalcididae), *Trichopria* sp. (Diapriidae) et *Exoristobia philippinensis* (Encyrtidae) indiquent que *N. thymus* a la capacité de dispersion et le potentiel de parasitisme les plus efficaces. Nous discutons de l'importance de l'augmentation des hyper-parasitoïdes.

Dans le but de rendre la lutte biologique plus ciblée, nous avons trouvé nécessaire (a) de faire des efforts concertés pour le recueil de parasitoïdes de la mouche uzi provenant de différentes zones agro-climatiques et (b) de créer une banque génétique des parasitoïdes de la mouche uzi afin qu'elle soit utilisée par des organismes variés dans différentes zones.

INTRODUCTION

La mouche tachinaire, *Blepharipa zebina* Walker est un endo-parasitoïde larvaire du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) qui cause des dégâts considérables pour l'industrie de la soie tassar (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). Parfois, la perte due à cette mouche est d'environ 40 % dans la zone tropicale tassar (Chaturvedi et coll., 1986 ; Singh et Thangavelu, 1991).

Récemment, des efforts importants ont été faits pour lutter contre la mouche uzi, *B. zebina* (Singh et coll., 1995 ; Kishore et coll., 1996). Plusieurs ennemis naturels comprenant quatre parasitoïdes de la mouche uzi ont été identifiés. L'information provenant de telles études a pris de l'importance surtout parce qu'on sait que les parasitoïdes secondaires agissent comme des facteurs de mortalité par rapport aux parasitoïdes primaires (Kumar et coll., 1993).

Les études rapportées ici apportent un éclairage sur le degré d'efficacité de quatre parasitoïdes indigènes de la mouche uzi, qui ont été récemment signalés par plusieurs chercheurs (Singh et coll., 1995 ; Kishore et coll., 1996 ; Kumar et coll., 1991). On a déterminé le taux de parasitisme et la capacité de dispersion de chacun des parasitoïdes dans des conditions identiques en tant qu'agents de lutte biologique contre la mouche uzi, *B. zebina*.

MATERIELS ET METHODES

Les espèces hyménoptères indigènes utilisées dans cette étude sont *Nesolyx thymus* Girault (Eulophidae), *Brachymeria lasus* Walker (Chalcididae), *Trichopria* sp. (Diapriidae) et *Exoristobia philippinensis* Ashmead (Encyrtidae) (Singh *et al.*, 1995 ; Kishore *et coll.*, 1996 ; Kishore *et coll.*, 1999). On a réalisé la multiplication en masse de ces parasitoïdes dans un insectarium à $26 \pm 2^\circ \text{C}$ et $65 \pm 5\%$ d'HR. On obtient des adultes de tous ces parasitoïdes pour la multiplication en masse à partir d'une colonie élevée en laboratoire en utilisant les méthodes proposées par Kumar (1987). Les pupes de la mouche domestique, *Musca domestica* servent d'hôte pour la multiplication en masse de ces parasitoïdes. Les pupes de la mouche proviennent d'une colonie élevée en laboratoire dans ce but. Les pupes saines de *M. domestica* sont placées dans des cages en verre et on les laisse être parasitées séparément par *N. thymus*, *B. lasus*, *Trichopria* sp. et *E. philippinensis*. Un ratio de 1 : 5 est maintenu entre le parasitoïde femelle et la pupa hôte pour obtenir le nombre maximum de parasitoïdes. Les parasitoïdes adultes sont recueillis et nourris sur une solution aqueuse de miel à 50 % pendant 1 à 2 jours avant d'être transportés pour être libérés dans les champs. On procède à la dispersion des parasitoïdes dans les champs d'élevage du ver à soie tasar et dans les lieux de grainage (unité de production des œufs de vers à soie tasar) sur différents sites. On maintient un ratio de 1 : 2 entre la femelle parasitoïde et la pupa de la mouche uzi. On procède à trois dispersions des parasitoïdes à un intervalle de 15 jours. Les pupes hôtes sont conservées dans des cages grillagées (100 dans chaque cage) dans le champ d'élevage et les centres de grainage à différentes distances du point de libération des parasitoïdes et sont remplacées une fois par semaine avec un nouveau lot de pupes. Dix répétitions sont maintenues pour le recueil des données. Les pupes de la mouche uzi exposées sont reprises du champ et sont par la suite élevées en laboratoire pour l'enregistrement des données sur le potentiel de parasitisme, l'émergence de parasitoïdes adultes par pupa parasitée et sur la capacité de dispersion des parasitoïdes. L'expérience est réalisée à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $65 \pm 5\%$ d'HR. Les données répétées sont soumises à une analyse statistique (Fisher et Yates, 1963) pour déterminer le niveau de signification.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les études biologiques sur le potentiel de parasitisme des quatre parasitoïdes donnent les résultats nécessaires pour leur attribuer les caractères d'ennemis naturels efficaces contre la mouche uzi. Le pourcentage de pupes de la mouche uzi, *B. zebina* ($40,8 \pm 3,5\%$) parasité par *N. thymus* est maximum (Tableau I) tandis que les degrés de parasitisme par *Trichopria* sp., *E. philippinensis* et *B. lasus* enregistrés sont respectivement de $20,2 \pm 1,9\%$, $15,4 \pm 1,8\%$ et $4,6 \pm 1,9\%$. Même le nombre d'adultes de *N. thymus* ($75,9 \pm 10,6$) s'étant développés avec succès sur une pupa de la mouche uzi parasitée est significativement plus élevé par rapport au nombre d'adultes de *Trichopria* sp., ($59,3 \pm 13,5$), d'*E. philippinensis*, ($30,4 \pm 9$) et de *B. lasus* ($1 \pm 0,0$) ayant émergé sur chaque pupa hôte parasitée. La capacité de dispersion est la caractéristique la plus importante pour un ennemi naturel efficace. Quand *N. thymus*, *E. philippinensis*, *Trichopria* sp. et *B. lasus* sont libérés périodiquement à différentes distances des champs d'élevage du ver à soie et des centres de grainage du Central Tasar Research and Training Institute (CTR&TI), à Ranchi (Inde), on trouve que les deux premiers parasitoïdes sont capables de se disperser et de chercher les pupes hôtes situées à 65 m contre 30m dans le cas des deux autres parasitoïdes. Le degré de parasitisme par chaque parasitoïde, la distance maximum de dispersion et le potentiel de parasitisme varient entre les quatre parasitoïdes étudiés (Tableau I).

Aucune des espèces de parasitoïdes hyménoptères ne partage le parasitisme de l'hôte. Il apparaît donc que soit les quatre parasitoïdes évitent les pupes uzi parasitées par les autres espèces de parasitoïdes, soit que l'espèce parasitoïde, qui attaque les pupes uzi en premier la colonise avec succès. On pense que ces facteurs sont les raisons de la colonisation réussie par les parasitoïdes hyménoptères quand une pupa hôte unique est exposée à plus d'une espèce de parasitoïdes (Ryan et Medley, 1972).

De plus, s'il se produit une compétition simultanée par au moins deux espèces ou plus de parasitoïdes pendant un stade de l'hôte, une espèce devient en général dominante en raison d'une attitude spécifique (Flanders, 1965) et cette espèce dominante est désignée supérieure ou efficace (Smith, 1929). Compte tenu de cette observation, on peut donc déduire de cette étude que parmi les quatre parasitoïdes, *N. thymus* est le parasitoïde le plus efficace contre *B. zebina*, avec la capacité de dispersion et le potentiel de parasitisme les plus élevés.

A la suite de cette étude, quand les adultes *N. thymus* sont libérés dans les champs des zones d'élevage du ver à soie et des centres de grainage du CTR&TI, à Ranchi, le pourcentage de parasitisme moyen obtenu à des intervalles hebdomadaires après libération est enregistré dans le Tableau II.

Les résultats indiquent que pour obtenir le potentiel de parasitisme maximum, *N. thymus* doit être libéré à intervalles hebdomadaires.

Augmentation des parasitoïdes de la mouche uzi :

Parfois, un ennemi naturel exotique ou indigène est déjà présent mais son nombre est insuffisant pour faire baisser l'organisme ciblé en-dessous du statut de parasite. On augmente donc le nombre d'ennemis naturels en les élevant en grand nombre en laboratoire pour une libération occasionnelle ou régulière sur le terrain. Cette méthode est en général connue sous le nom " d'augmentation des ennemis naturels " (Ridgway et Vinson, 1977), et nous la testons actuellement pour la lutte biologique contre la mouche uzi.

Nécessité de recueillir plus de parasitoïdes de la mouche uzi provenant de différentes zones agro-climatiques :

Généralement, la lutte biologique classique comprend la recherche des ennemis naturels dans leur zone native où ils exercent une pression régulatoire importante sur le parasite. De tels ennemis naturels sont recueillis et envoyés dans le pays ou la zone où il existe fréquemment des éruptions de population parasite. Cette méthode est l'aspect le plus connu de la lutte biologique. Nous signalons ici que peu de parasitoïdes de la mouche uzi, *B. zebina* sont recensés à Ranchi (Jharkand) et il est donc urgent de chercher d'autres parasitoïdes provenant d'autres zones agroclimatiques où cette mouche uzi est un problème sérieux pour l'industrie de la soie tasar.

Nécessité de création d'une banque génétique :

Bien qu'on ait récemment recensé huit parasitoïdes de la mouche uzi (Singh et coll., 1995 ; Kishore et coll., 1996) des études détaillées n'ont été réalisées que sur quatre parasitoïdes. Pour les autres, soit leur culture n'a pas été maintenue soit leur recensement est récent et donc leur étude biologique est encore incomplète ou doit être commencée. Il est donc nécessaire de créer une banque génétique des parasitoïdes de la mouche uzi dans un ou deux instituts identifiés, à condition que ces organisations prennent la responsabilité de maintenir les élevages et de les fournir en fonction des besoins des organisations impliquées dans la lutte biologique contre la mouche uzi.

**A NEW MICROSPORIDIOSIS OCCURRING IN LARVAE OF
ANTHRAEA PERNYI (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)
RELEASED ON AN OAK TREE, *QUERCUS ACUTISSIMA* AND
A POSSIBLE INSECT-VECTOR, *LEPIDOGMA KIIENSIS*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) INHABITATING THE SAME
PLANT**

S. HAYASAKA¹, M. NOZAKI¹, C. YASUNAGA-AOKI², N. TERAMOTO³, K. IYAMA²,
Y. HATAKEYAMA¹, M. HASHIGUCHI² & T. KAWARABATA²

1. National Institute of Agrobiological Sciences, Institute of Insect & Animal Sciences, 1-2
Owashi Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
2. Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.
3. Kohoku Branch, Agricultural Experiment Station, Shiga Prefecture Agriculture Research
Center, 840 Senda, Kinomoto-cho, Ika-gun, Shiga 529-0423, Japan.

*Microsporidian spores were detected in diseased larvae of the Chinese oak silkworm, **Antheraea pernyi**. Similar spores were found in **Lepidogma kiiensis** larvae and this species was considered to be a vector for the microsporidiosis. The isolates from **A. pernyi** and **L. kiiensis** larvae, tentatively designated as NISES-AP and NISES-LK, respectively, were very similar to the **Vairimorpha** sp. NIS M12 spores previously recorded from dead **Bombyx mori** larvae in their elongated form and reactivity to monoclonal antibody-sensitized latexes used for the specific spore surface antigen of the M12 spores. The new isolates showed a pathogenicity to **B. mori** larvae. These results suggested that the presently found isolates were **V. sp. NIS M12** itself.*

Keywords: Microsporidian spores, *Antheraea pernyi*, *Lepidogma kiiensis*, *Vairimorpha* sp., NIS M12 spores.

INTRODUCTION

When larvae of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*, were reared on an oak tree, *Quercus acutissima*, for free outdoor feeding started in August 1993, several dead larvae were found in October, although they were kept within a net bag to prevent various predators and parasitoids from sharing the same environment. Many microsporidian spores were detected in various tissues and cells from the dead larvae by preliminary diagnosis under a phase-contrast microscope. Here, a possible vector of a new microsporidiosis was detected by inspecting the insects living with diseased Chinese oak silkworm larvae on the oak tree. Similar microsporidian isolates were found in *Lepidogma kiiensis* larvae and this species was considered to be a vector. The isolates from *A. pernyi* and *L. kiiensis* larvae were tentatively designated as NISES-AP and NISES-LK, respectively, and compared with known microsporidian isolates using monoclonal antibody-sensitized latexes.

MATERIALS AND METHODS

Lepidopteran larvae feeding on the leaves of *Q. acutissima* were collected, macerated individually in a mortar and inspected under a light microscope for the presence of microsporidian spores, essentially according to the method of pebrine inspection for the silkworm larvae. Feces were collected from the larvae reared individually to avoid microsporidian contamination and larval cannibalism, and inspected as described above. Latex adhesion test (Hayasaka and Ayuzawa, 1987) was employed to identify the specific spore surface antigen of the newly isolated microsporidians. A kit with latex particles sensitized with monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* NIS 001, *Nosema* sp. NIS M11 and *Vairimorpha* sp. M12 spores (Mike *et al.*, 1989) was purchased from Yakult (Tokyo, Japan). The spores were mixed with an equal volume of the antibody-sensitized latex suspension on a glass slide and incubated at 27°C for 30 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Microsporidians were not detected in the insect species *Clania formosicola*, *Euproctis flava* and *Lymantria dispar* examined in the present study. The causal agent of microsporidiosis in diseased *A. pernyi* larvae, designated as microsporidian isolate NISES-AP, produced spores with an elongated ellipsoid form (Fig. 1A) closely resembling those of *Vairimorpha* sp. NIS M12 (Fig. 1B) previously recorded from dead *Bombyx mori* larvae in neighbouring Chiba Prefecture (Fujiwara, 1980). Elongated spores very similar to the above ones were detected from a larva of the leaf roller, *Lepidogma kiiensis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Fig. 2), an insect species known to emerge annually in July and widely distributed from northern Honshu to Kyushu Island in Japan. This type of microsporidian isolate, NISES-LK, was further investigated for the extent of infection. Out of 105 *L. kiiensis* larvae inspected, 19 were confirmed to contain elongated microsporidian spores in their feces. The number of spores observed in the larval feces was relatively consistent and small. When the larvae continuously excreted the elongated spores were dissected and all the tissues were inspected, it was demonstrated that microsporidian infection in the *L. kiiensis* larva was systemic. It was noteworthy that the larval midgut did not show evidence of microsporidian infection, indicating that microsporidiosis appeared to be chronic and not lethal in *L. kiiensis*. The specific spore surface antigen of the newly isolated microsporidians was identified by employing the latex adhesion test (Table I). The elongated spores from *A. pernyi* and *L. kiiensis* larvae, NISES-AP and NISES-LK, respectively, reacted specifically with the monoclonal antibody against *V. sp.* NIS M12 spore surface antigen. The microsporidian spores prepared from both insect species are likely to share a common antigen with *V. sp.* NIS M12. On the other hand, the spores of *Nosema* sp. NIS sakusan (Hirose, 1979; Ohshima, 1931) did not react with any of the monoclonal antibody-sensitized latexes used in the present study.

To the author's knowledge this is the first report indicating that the monoclonal antibody-sensitized latex of *V. sp.* NIS M12 (Kawarabata *et al.*, 1990; Iwano and Ishihara, 1991; Yasunaga *et al.*, 1992) reacted with microsporidian spores from field-collected insects. *Vairimorpha* infection of *B. mori* larvae in Japan has been known to be limited since the first report. Also transovarian transmission of *V. sp.* NIS M12 in *B. mori* has not been successful and the vector of the pathogen has not been determined. Thus the new microsporidian isolate NISES-AP was examined for its pathogenicity to *B. mori* larvae by peroral inoculation of spores. It induced larval symptoms nearly identical with those of *V. sp.* NIS M12 infection (Fujiwara, 1980, Jpn. J. Sericult. Sci., 49, 229-236) and exerted a lethal effect on the silkworm larvae like *V. sp.* NIS M12.

Table I. Monoclonal antibody sensitized latex adhesion test for microsporidian spores.

Tableau I. Test d'adhésion au latex d'anticorps monoclonal sensibilisé pour les spores microsporidiennes.

Microsporidian spore	Host Insect	Monoclonal Antibody Sensitized Latex		
		<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	<i>Nosema</i> sp. NIS M11	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS M12
<i>Spore microsporidienne</i>	<i>Insecte hôte</i>	<i>Latex sensibilisé à l'anticorps monoclonal</i>		
		<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	<i>Nosema</i> sp. NIS M11	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS M12
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS M12	<i>Bombyx mori</i>	—	—	+
NISE-LK*	<i>Lepidogma kiensis</i>	—	—	+
NISE-AP**	<i>Antheraea pernyi</i>	—	—	+
<i>Nosema</i> sp. NIS sakusan ***	<i>Antheraea pernyi</i>	—	—	—

* Prepared from diseased *Lepidogma kiensis* larvae and larval feces. / Préparé à partir des larves *Lepidogma kiensis* malades et des excréments larvaires.

** Prepared from dead *Antheraea pernyi* larvae / Préparé à partir de larves mortes d'*Antheraea pernyi*.

*** Prepared from *Antheraea pernyi* larvae. / Préparé à partir de larves d'*Antheraea pernyi*.

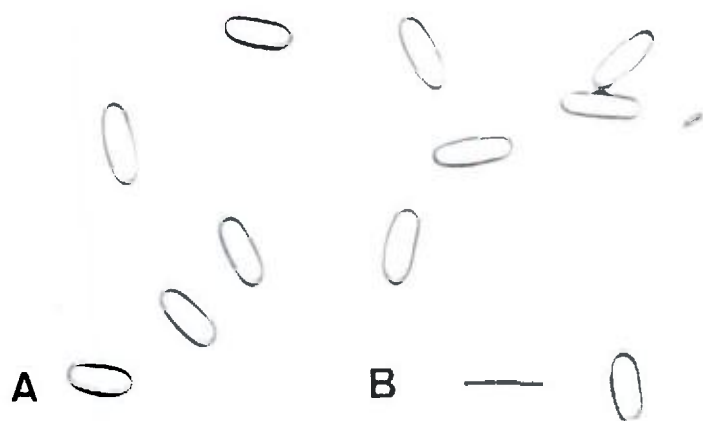


Fig. 1. Mature microsporidian spores / Fig. 1. Spores microsporidiennes matures.

A: NISES-AP isolated from *Antheraea pernyi*
A. NISES-AP isolé à partir de *Antheraea pernyi*.
B: *Vairimorpha* sp. NIS M12.
Bar / barre = 5 µm.

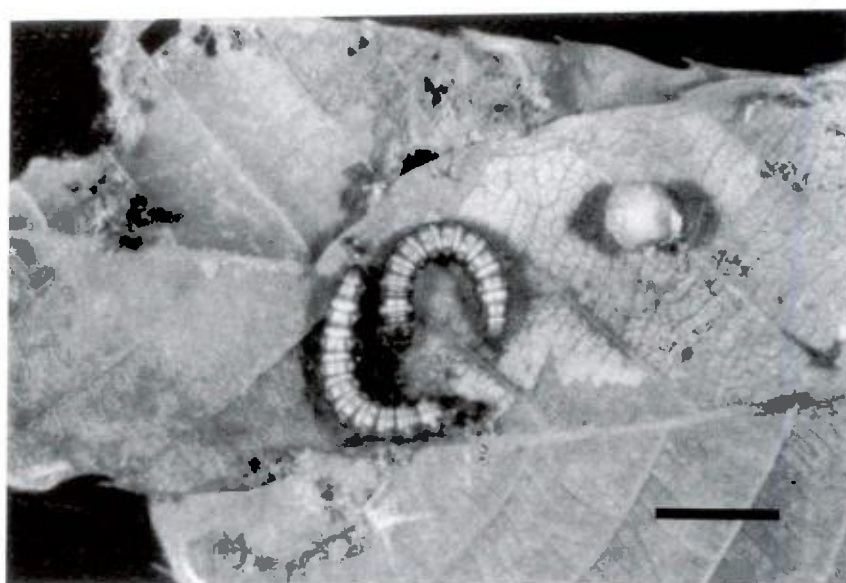


Fig 2. A larva of the leaf roller, *Lepidogma kiiensis* in late larval stage.

Fig. 2. Une larve de l'enrouleur de la feuille, *Lepidogma kiiensis* au dernier stade larvaire.

Bar / barre = 5 mm.

The above results indicated that *L. kiiensis* might be the carrier and vector of a new microsporidian closely related to *V. sp. NIS M12*. It is assumed that the presently found isolates are *V. sp. NIS M12* itself, although further studies are necessary to draw a conclusion. Also it remains to be determined whether *L. kiiensis* is a very important vector of *Vairimorpha* species in Japan or not. Studies along these lines are in progress in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr K. Koga, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School for the critical reading of the manuscript. We thank Dr K. Ueda, Kitakyushu Museum of Natural History and Dr S. Yoshimatsu, National Grassland Experiment Station for their helpful suggestions on the taxonomy of pyralid insects as well as Dr M. Miyazaki, National Institute of Agrobiological Sciences, for his helpful discussions and encouragement.

REFERENCES

- FUJIWARA T. (1980) Three microsporidians (*Nosema* sp.) from the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Sericult. Sci., 49, 229-236.
- HAYASAKA S. & AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody-sensitized latex. Jpn. J. Sericult. Sci., 56, 169-170.
- HIROSE Y. (1979) Microsporidians infectious to insects. Acta Sericologica, 110, 118-123.
- IWANO H., ISHIHARA R. (1991) Isolation of *Nosema bombycis* from moths of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler. Jpn. J. Sericult. Sci., 60, 279-287.
- KAWARABATA T., HAYASAKA S., ICHIDA M., SEGAWA H., TERAMINE T., UEMATSU H., YASUDA K. (1990) Detection of microsporidians in adults of the cabbageworm, *Pieris rapae* crucivara collected from mulberry fields. Jpn. J. Sericult. Sci., 59, 288-292.

- MIKE A., OHMURA H., OHWAKI M., FUKADA T. (1989) A practical technique of pebrine inspection by microsporidian spore specific monoclonal antibody-sensitized latex. Jpn. J. Sericult. Sci. 58, 392-395.
- OHSHIMA I. (1931) On a microsporidia, *Nosema* sp., parasitic to *Antheraea pernyi*. Jpn. J. Sericult. Sci., 2, 435-436.
- YASUNAGA C., FUNAKOSHI M., KAWARABATA T., ARATAKE Y., IWANO H. (1992) Isolation and characterization of *Nosema bombycis* (Microsporida: Nosematidae) from larvae of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* Jpn. J. Appl. Entomol. Zool., 36, 127-134.

UNE NOUVELLE MICROSPORIDIOSE CHEZ LES LARVES DE *ANTHERAEA PERNYI* (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) DISPERSEES SUR LE CHENE, *QUERCUS ACUTISSIMA* ET UN INSECTE VECTEUR PROBABLE, *LEPIDOGMA KIIENSIS* (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE) HABITANT LA MEME PLANTE

S. HAYASAKA¹, M. NOZAKI¹, C. YASUNAGA-AOKI², N. TERAMOTO³, K. HYAMA²,
Y. HATAKEYAMA¹, M. HASHIGUCHI² & T. KAWARABATA²

1. National Institute of Agrobiological Sciences, Institute of Insect and Animal Sciences, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.
2. Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon.
3. Kohoku Branch, Agricultural Experiment Station, Shiga Prefecture Agriculture Research Center, 840 Senda, Kinomoto-cho, Ika-gun, Shiga 529-0423, Japon.

On a détecté des spores de microsporidiens sur les larves malades du ver à soie du chêne chinois, *Antheraea pernyi*. On a trouvé des spores similaires sur des larves de *Lepidogma kiiensis* et on a considéré que cette espèce était un vecteur de la microsporidiose. Des isolats des larves de *A. pernyi* et de *L. kiiensis* ont été nommés respectivement à titre d'essai, NISES-AP et NISES-LK et sont très similaires aux spores NIS M12 de *Vairimorpha* sp. précédemment enregistrées chez des larves de *Bombyx mori* mortes, de par leur forme allongée et leur réactivité aux latex traités aux anticorps monoclonaux utilisés pour détecter l'antigène spécifique de surface des spores M12. Les nouveaux isolats présentent une pathogénicité pour les larves de *B. mori*. Ces résultats suggèrent que les isolats que l'on a actuellement trouvés sont NIS M12 de *V. sp* lui-même.

INTRODUCTION

Quand les larves du ver à soie chinois du chêne, *Antheraea pernyi*, ont été élevées sur le chêne, *Quercus acutissima*, pour un nourrissage à l'extérieur en liberté en août 1993, on a trouvé plusieurs larves mortes en octobre, bien qu'elles aient été conservées sous un filet pour empêcher que des prédateurs et des parasitoïdes variés ne partagent le même environnement. On a détecté de nombreuses spores microsporidiennes dans des tissus et des cellules variés des larves mortes grâce à un diagnostic préliminaire sous un microscope à contraste de phase. Nous avons détecté ici un vecteur possible d'une nouvelle microsporidiose en inspectant les insectes vivant sur le chêne avec les larves du ver à soie du chêne chinois malades. On trouve des isolats microsporidiens similaires chez les larves *Lepidogma kiiensis* et on considère que cette espèce est un vecteur. Les isolats des larves de *A. pernyi* et de *L. kiiensis* sont à titre d'essai désignés respectivement NISES-AP et NISES-LK et comparés avec les isolats microsporidiens connus en utilisant des latex sensibilisés aux anticorps monoclonaux.

MATERIELS ET METHODES

On recueille des larves lépidoptères se nourrissant sur les feuilles de *Q. acutissima*, on les broie individuellement dans un mortier et on les inspecte sous un microscope optique pour détecter les spores de microsporidiens, essentiellement selon la méthode d'inspection de la pébrine chez les larves de vers à soie. Les excréments sont recueillis individuellement chez les larves élevées pour éviter la

contamination microsporidienne et la consommation larvaire et examinés d'après la méthode décrite plus haut. On emploie le test d'adhésion au latex (Hayasaka et Ayuzawa, 1987) pour identifier l'antigène de surface de la spore spécifique aux microsporidies nouvellement isolées. On a acheté un équipement avec des particules de latex sensibilisées avec des anticorps monoclonaux contre les spores NIS 001 de *Nosema bombycis*, NIS M11 de *Nosema* sp. et les spores M12 de *Vairimorpha* (Mike et coll., 1989 chez Yakult (Tokyo, Japon). Les spores sont mélangées avec un volume égal de suspension de latex sensibilisé à l'anticorps sur une lame de verre et incubées à 27° C pendant 30 minutes.

RESULTATS ET DISCUSSION

On ne détecte pas de microsporidies chez les espèces d'insecte *Clania formosicola*, *Euproctis flava* et *Lymantria dispar* examinés dans cette étude. L'agent responsable de la microsporidiose chez les larves malades de *A. pernyi*, désigné en tant que l'isolat microsporidien NISES-AP, produit des spores à la forme ellipsoïde et allongée (Fig. 1A) ressemblant étroitement à celles de NIS M12 de *Vairimorpha* sp. (Fig. 1B) précédemment signalées sur des larves mortes de *Bombyx mori* dans la Préfecture de Chiba avoisinante (Fujiwara, 1980). Des spores allongées très similaires à celles décrites plus haut sont détectées sur une larve de l'enrouleur de la feuille, *Lepidogma kiiensis* (Lepidoptera : Pyralidae) (Fig. 2), une espèce d'insecte qui émerge annuellement en juillet et est largement distribué de Honshu dans le nord à l'île de Kyushu au Japon. Ce type d'isolat microsporidien, NISES-LK, a été étudié plus en détail pour connaître l'étendue de l'infestation. Sur 105 larves *L. kiiensis* inspectées, 19 contenaient des spores microsporidiennes allongées dans leurs excréments. Le nombre de spores observées dans les excréments larvaires est relativement consistant et petit. Quand les larves sécrètent continuellement des spores allongées on les dissèque et on inspecte tous les tissus et il s'avère que l'infestation microsporidienne dans les larves de *L. kiiensis* est généralisée. Il convient de noter que l'intestin moyen larvaire ne présente pas de signe d'infestation microsporidienne, ce qui indique que la microsporidiose semble être chronique et non pas mortelle chez *L. kiiensis*. L'antigène de surface spécifique à la spore des microsporidies nouvellement isolées est identifié en employant un test d'adhésion au latex (Tableau I). Les spores allongées sur les larves de *A. pernyi* et *L. kiiensis*, respectivement NISES-AP et NISES-LK, réagissent spécifiquement avec l'anticorps monoclonal contre l'antigène de surface de la spore NIS M12 de *V. sp.* Il est probable que les spores préparées à partir des deux espèces d'insectes partagent un antigène commun avec NIS M12 de *V. sp.* D'autre part, les spores NIS sakusan de *Nosema* sp. (Hirose 1979 ; Ohshima, 1931) ne réagissent avec aucun des latex monoclonaux sensibilisés à l'anticorps utilisés dans cette étude.

A la connaissance de l'auteur c'est le premier rapport indiquant que le latex monoclonal sensibilisé à l'anticorps de NIS M12 de *V. sp.* (Kawarabata et coll., 1990 ; Iwano et Ishihara, 1991 ; Yasunaga et coll., 1992) réagit avec les spores microsporidiennes d'insectes recueillis dans les champs. On sait que l'infestation des larves de *B. mori* par *Vairimorpha* au Japon est limitée depuis le premier rapport. La transmission transovarienne de NIS M12 de *V. sp.* chez *B. mori* n'a pas réussi et on n'a pas déterminé le vecteur du pathogène. Ainsi, le nouvel isolat microsporidien NISES-AP a été examiné par rapport à sa pathogénicité sur les larves de *B. mori* par inoculation pérorale des spores. Il induit des symptômes larvaires presque identiques à ceux de l'infestation par NIS M12 de *V. sp.* (Fujiwara, 1980, Jpn. J. Sericult. Sei., 49, 229-236) et exerce un effet mortel sur les larves de vers à soie comme NIS M12 de *V. sp.*

Les résultats ci-dessus indiquent que *L. kiiensis* pourrait être le porteur et le vecteur d'une nouvelle microsporidiose étroitement liée à NIS M12 de *V. sp.* On suppose que les isolats que l'on a actuellement trouvés sont en fait NIS M12 de *V. sp.* lui-même, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour tirer une conclusion. Il reste aussi à déterminer si *L. kiiensis* est un vecteur très important de l'espèce *Vairimorpha* au Japon ou non. Des études dans ces directions sont en cours de réalisation dans notre laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	117
General sericulture	
Mûrier	121
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	125
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	131
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	133
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	137
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	141
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	143
Silkworms: silk glands	
Soie	145
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

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

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

Sériciculture générale

General sericulture

Optimization of silkworm egg production through breeding.

BENCHAMIN K.V.

National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Bangalore, India.

2002 Indian Silk, Vol.41(1),5-7. (E)

Impact on adoption of new technologies in palamaner of Andhra Pradesh.

CHOWDARY N.B.

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

Mysore

2002 Indian Silk, Vol. 40(10), 15-16. (E)

Issues in silkworm seed production and distribution in India.

DANDIN S.B., JAYANT JAYASWAL

Central Sericultural Research Training Insitute, Manandavadi Road, Sirampura,
570008, India.

Mysore

2002 Indian Silk;Vol.40(11),5-10. (E)

Mechanization in sericulture - need and scope.

DANDIN S.B., VERMA S.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.

2002 Indian Silk, Vol.41(1),9-12. (E)

Performance of BL24 X NB4D2 under post authorization discipline programme.

KALAPPA H.K.

National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Bangalore - 560068, India.

2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),134-138. (E)

Silkworm seed multiplication and production system in China.

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

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

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 98-100. (E)

Economics of sericulture vis - A - vis competing crops in Erode district of Tamil Nadu.

KUMARESAN P., VIJAYA PRAKASH N.B.

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

2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),142-146. (E)

L'agriculture et la propriété du vivant : le cas de la sériciculture.

Agriculture and living property : The case of sericulture.

LEGAY JM.

Gén. des Pop., Université Claude Bernard -Lyon1 UMR CNRS 5558 Biom. & Biol. évolutive
69622 Villeurbanne cedex. France

2000 Nature Science Société, Vol.8(3),59-60. (F)

China mulberry sericulture in 1990s.

LONG L., JAIN Z., XUN F., YOUQING Q.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zheniang, China.

2001 Indian Silk, Vol. 40(10), 26-29. (E)

Silkworm disease management practices during summer.

NATARAJU B., *et al.*

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

2002 Indian Silk, Vol.40(12),9-11. (E)

Relations between scale of sericulture farming and scale merit worked on the farming and/or its profitability.

NOHMI M., MATSUMURA I., SATO T.

Tottori University, Tottori, 680-8553, Japan.

2002 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol.70(3), 145-154. (J,e)

Participatory research approach for assessment and refinement of sericultural technologies.

PANDIT D., ROY T.N., SENGUPTA A.K., GHOSH S., SENGUPTA D.

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

2002 Indian Silk, Vol.41(1),15-18. (E)

Participation of rural youth in sericulture - a case study in Andhra pradesh.

SESHAGIRI S.V., GANAPATI RAO R.

AP State Sericulture Research & development Institute , Kirikera, India.

2002 Indian Silk, Vol.40(12),12-14. (E)

Sustainable sericulture-dimensions and concepts for new millennium.

SHANKAR RAO K.V., MAHOBIA G.P., PANDE V.K., THANGAVELU K.

Regional Tasar Research Station, Jagdalpur 494005, Madhya Pradesh, India.

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 1-5. (E)

New bivoltine 'dun' breeds.

SIDDIQUI A.A., CHAUHAN T.P.S., SINGH B.D., LOCHAN R., SARASWAT S.B.

Regional Sericulture Research Station, Sahaspur, Dehradun, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(10), 17-19. (E)

Modern trends in Japanese sericulture research.

SINGH R., KALPANA G.V., YAMAMOTO T.

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

2002 Indian Silk, Vol.40(12),17-20. (E)

Cropping patterns and income levels of sericulturists in Mandya district, Karnataka - a comparative study.

SRINIVASA G., SARANGI R.N., GEETHA G.S., GEETHADEVI R.G., VIJAYA PRAKASH N.E.

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

2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),119-126. (E)

Viable mounting platform for quality seed cocoon generation.

SRINIVASABABU GK., PARTHASARTHY BA., MURTAZA B.

NSSP, P2 BSF, Gavimata, K.R.Pet, India.

2002 Indian Silk, Vol.40(12), 4-8. (E)

Need for review of Karnataka's legislative act and rules.

VEERAAIAH K.

RETD. Joint Director of Sericulture. Government of Karnataka, India.

2002 Indian Silk; Vol. 40(11),11-14.(E)

Comparative economics of cocoon production in coastal area and traditional area of Andhra Pradesh.

VENKATESWARA RAO M., KUMARESAN P., VIJAYA PRAKASH N.B.

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

2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),147-150. (E)

Mûrier

Mulberry

Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.).

ASANO N., *et al*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan.

2001 *J. Agric. Food Chem.*, Vol, 49,4208-4213. (E)

Molecular distinction amongst varieties of Mulberry using RAPD and DAMD profiles.

BHATTACHARYA E., RANADE SA.

PMB Division, National Botanical Research Institute Rana Pratap Marg Lucknow 226001 (UP) India.

2001 *BMC Plant. Bio.*; Vol.1(1),3. (E)

Incidence of red rust of mulberry in Darjeeling hills of West Bengal.

BISWAS S., DAS D., DAS S.K., DAS N.K.

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong 734 301, India.

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol 40(2),177-179. (E)

A comparative biochemical study of seven promising mulberry (*Morus alba* L.) varieties under rain-fed condition of sub-tropical region.

BOSE P.C., BINDROO B.B.

Regional Sericultural Research Station, Miran Sahib, Jammu-181 101, India.

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol 40(2), 171-173. (E)

Physiological and biochemical changes of mulberry leaves under different salinity levels.

DAS C., SENGUPTA T., CHATTERJEE S., SETUA M., MISRA A.K., SEN S.K., SARATCHANDRA

Central Sericultural Research & Training Institute, Central Silk Board, Berhampore 742101, West Bengal, India

2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 24-28. (E)

Pusa neem gold urea : an improved nitrogenous fertilizer for increasing yield in mulberry.

GOEL A.K., BASHA I., CHANDRASHEKHARAIH.

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),185-187. (E)

Integrated management of the pink mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* (green) (Hemiptera :Pseudococcidae) causing "tukra" in mulberry.

KATIYAR R.L., MANJUNATH D., KUMAR V., DATTA R.K.

Research Extension Centre, CSB, MAU Campus, Parbhani - 431402, India.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.3(2)117-120. (E)

Integrated management of Bihar hairy caterpillar.

KATIYAR R.L., SATHYA PRASAD K., SHIVPUJE P.R.

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

2002 Indian Silk, Vol.40(11),15-16. (E)

Molecular cloning of a cDNA encoding a cathepsin D homologue from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*.

KIM S.R., *et al.*

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.3(2),121-126. (E)

Five new nortropane alkaloids and six new amino acids from fruit of *Morus alba* Linne growing in Turkey.

KUSANO G., *et al.*

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Osaka, Japan.

2002 Chem. Pharm. Bull.; Vol.50(2),185-192. (E)

In vitro gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves.

LIU JX., SUSENBETH A., SUDEKUM KH.

Institute of Animal Nutrition, Physiology and Metabolism, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany.

2002 J. Anim. Sci.; Vol.80(2),517-524. (E)

Studies on the incidence of thrips (*Pseudodendro thrips mori* nawa) and jassids (*Empoasca* sp.) in mulberry garden.

MANJUNATH S., SHREE M.P.

Department of Sericulture, Jnana Bharathi, Bangalore University, Bangalore 560056, India.

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 89-93. (5)

Response of mulberry (*Morus indica* L.) to inoculation with phosphate solubilizing bacteria and fungi.

NAGENDRA KUMAR T.D., SUKUMAR J.

Mulberry Path. & Microb. Section, Mriculture Div., Karnataka State Seric., Thalaghattapura, Bangalore 560062, India.

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 54-58. (E)

Effect of different methods of planting for raising mulberry saplings in mulberry.

PATEL K.P., NAIK M.M.

N.M. College of Agriculture, Gujarat Agricultural University, Navsari - 396 450, India.

2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),192-193. (E)

Silkworm (*Bombyx mori* L.) genetic stocks-an evaluatory analysis.

RAMESH BABU M., CHADRASEKHARAI AH, LAKSHMI H., PRASAD J.

Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute, Kirikera 515211, Hindupur (A.P.), India.

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 9-17. (E)

What ails speedy adoption of new mulberry varieties ?

SARATCHANDRA B.

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

*2002 Indian Silk, Vol.40(11),17-20. (E)***Comparative efficacy of different control measures against root knot nematode disease of mulberry.**

SHARMA D.D., CHANDRASHEKAR D.S., GUNASEKHAR V., REKHA M., SARKAR A.

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

*2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),151-157. (E)***Azotobacter chroococcum - a promising biofertilizer for mulberry gardens.**

SINGH PK., SINGH BD., SARASWAT SB.

Regional Sericultural Research Station, Sahaspur, Dehradun, India.

*2002 Indian Silk, Vol.40(12),15-16. (E)***Effect of source of nitrogen on phosphorus uptake and arginine content in mulberry.**

SUBBASWAMY M.R., SINGHVI N.R., NAIDU B.V., REDDY M.M., JAYARAM H., SURYANARAYANA

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

*2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),182-84. (E)***A comparative study on morphological and histological differences among different ploidy of mulberry (*Morus spp.*).**

SUJATHAMMA P., YANG J., LOU C.

Department of Sericulture, S.P. Women's university, Tirapathi, China.

*2002 Canye Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),8-13. (E,c)***Structures of two new benzofuran derivatives from the bark of mulberry tree (*Morus macroura* Miq.).**

SUN SG., CHEN RY., YU DQ.

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing.

*2001 J. Asian Nat. Prod. Res.; Vol.3(4), 253-259. (E)***Effect of some cheap gelling agents on micropropagation of mulberry.**

TEWARY P.K., RAGHUNATH M.K., SARKAR A.

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

*2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),188-191. (E)***Multivariate analysis in some mulberry (*morus spp.*) germplasm accessions.**

TIKADER A., ROY BN.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, India.

*2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),168-170. (E)***Ex-situ performance of some mulberry (*Morus sp.*) germplasm.**

TIKADER A., ANANDA RAO A.

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

*2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 29-35. (E)***Research and preliminary report on new natural enemy (*Eretmocerus longipe*) of mulberry white fly.**

WEIMING W., JINNAN L., HEMING D., JUNLIN N., QINBIAO Y., FENDI Z.

Sericultural Guiding Station of Wujiang City of Jiangsu Province, Wujiang 215200, China.

2002 Canye Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),45-47. (C,e)

Study on the ecological distribution of *Morus* germplasm resources in Yunnan province.

YINING C., MAODE Y.

Research Institute of silkworm and Mulberry, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mongzi 661101, China.

2002 Canye Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),1-7. (C,e)

Studies on the life habit and control method of mulberry longicorn, *Apriona germari*.

ZHIYI Y., HONG L., WENJING S.

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

2002 Canie Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),48-51. (C,e)

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

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

Promotion of nucleopolyhedrovirus infection in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) by flufenoxuron.

ARAKAWA T.

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2002 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol.37(1), 7-11. (E)

Flufenoxuron, an insect growth regulator, promotes peroral infection by nucleopolyhedrovirus (BmNPV) budded particles in the silkworm, *Bombyx mori* L.

ARAKAWA T., FURUTA Y., MIYAZAWA M., KATO M.

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Ohwashi 1-2, Tsukuba, 305-8634 Ibaraki, Japan.

2002 *J. Virol. Methods*, Vol. 100(1-2), 141-147. (E)

In vivo efficacy of some chemicals on the growth and development of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

BANUPRAKASH K.G., GOVINDAN R., DEVAIAH M.C.

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

2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol 5(1), 68-74. (E)

Infection of the silkworm, *Bombyx mori*, with *cordyceps militaris*.

CHEN R., ICHIDA M.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-ippongi 1, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol.71(1),61-63. (E)

Fluoride accumulation and distribution in mulberry insects near fluoride pollution sources.

CHEN Y., LU S.

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

2002 *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, Vol.13(1),106-108. (C,e)

Breeding of new productive bivoltine hybrid, CSR12 X CSR6 of silkworm *Bombyx mori* L.

DATTA R.K., *et al.*

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

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),127-133. (E)

Effect of naphtoxyacetic acid (NOA) on the economic parameters of the silkworm *Bombyx mori* L.

GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.

Post-graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad 580003, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),157-162. (E)

Study on disinfection of silkworm seeds (*Bombyx mori* L.).

GREIS H., PETKOV N.

Agricultural Firm "Agromier" - Cairo, Egypt.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol.5-6(37),68-71. (B,e)

Study on methods for mounting and winding of silkworm cocoons (*Bombyx mori* L.).

GREIS H., PETKOV N.

Agricultural Firm "Agromier" - Cairo, Egypt.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol.5-6(37),64-67. (B,e)

Study on effect of disinfections on basic production traits of silkworm (*Bombyx mori* L.). I. Disinfection of houses and equipment for rearing of silkworm.

GREIS H., PETKOV N.

Agricultural Firm "Agromier" - Cairo, Egypt.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol.5-6(37),68-76. (B,e)

Study on effect of disinfections on basic production traits of silkworm (*Bombyx mori* L.). II Disinfection of silkworm and bed.

GREIS H., PETKOV N.

Agricultural Firm "Agromier" - Cairo, Egypt.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol.37(5-6),77-80. (B,e)

Effect of new improved technology of silkworm *Bombyx mori* L. rearing on the egg production capacity.

GREISS H., TZENOV P., GREKOV D.

Agromier Co, 9 Malek El Afad street, 11211, Zamalek, Cairo, Egypt.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),135-139. (E)

Chronological variation in the food consumption and utilization in BmNPV infected silkworm, *Bombyx mori* L.

GURURAJ C.S., SEKHARAPPA B.M., SARANGI S.K.

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),115-118. (E)

Specific amplification of microsporidia DNA fragments using multiprimer PCR.

HATAKEYAMA Y., HAYASAKA S.

2001 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.70(3),163-166. (J,e)

Isolation of the lines with different diapause tendencies and its influence on quantitative traits in the tropical multivoltine breed of *Bombyx mori* L.

JAYASWAL K.P.

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),127-133. (E)

Selection assessment of silkworm lines (*Bombyx mori* L.) for hybridization II. Chinese lines.

KUZMANOV K., PETKOV N.

High Institute of Agriculture - Plovdiv, Bulgaria.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol. 5-6 (37), 56-59. (B,e)

Selection assessment of silkworm lines (*Bombyx mori* L.) for hybridization I. Japanese lines.

KUZMANOV K., petkov N;

High Institute of Agriculture - Plovdiv, Bulgaria.

*2000 Journal of Animal Science, Vol.5-6(37), 52-55. (B,e)***In vivo inhibitory effect of carbonic anhydrase on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*.**

MATSUMOTO N.

Laboratory of Applied Zoology, Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol.71(1),65-67.(E)***Evaluation of quantum of food required for the CSR2 X CSR5 hybrid of mulberry silkworm *Bombyx mori* L.**

MEENAL R., HIMANTHARAJ M T., RAJAN R.K.

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore-570008, India.

*2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 18-23. (E)***A simple method for egg incubation and its impact on rearing performance of silkworm *Bombyx mori* L.**

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

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

*2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 78-88. (E)***Performance of bivoltine x multivoltine hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. for grainage traits.**

NARAYANASWAMY TK., GOVINDAN R., ANANTHANARAYANA SR.

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

*2001 The Mysore Journal of Agricultural Sciences, Vol.35(2),97-100. (E)***Effect of feeding with *M. Alba* L. and *M. Nigra* L. on basic biological traits of *Bombyx mori* L.**

PANAIOTOV M.

Tracian University - Stara Zagora, Bulgaria.

*2000 Journal of Animal Science, Vol.5-6(37),110-112. (B,e)***Seasonal response of the new multi-bivoltine hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L.**

RADHAKRISHNA P.G., SEKHARAPPA B.M., GURURAJ C.S.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bagalore - 560 062, India.

*2001 Indian Journal of Sericulture, Vol.40(2),174-176. (E)***Silkworm (*Bombyx mori* L.) genetic stocks-an evaluatory analysis.**

RAMESH BABU M., CHADRASEKHARAIH. LAKSHMI H., PRASAD J.

Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute, Kirikera 515211, Hindupur (A.P.), India.

*2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 9-17. (E)***Improvement in the commercial traits of silkworm, *Bombyx mori* L. by administration of a juvenoid, R394.**

SASHINDRAN NAIR K., VAJJAYAN V.A., TRIVEDI K., NAIR J.S.

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

*2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.3(2), 169-175. (E)***Inheritance of resistance to nuclear polyhedrosis virus in silkworm, *Bombyx mori*.**

SEN R., ASHWATH S.K., DATTA R.K.

Silkworm Breeding and Genetics Division, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),187-190. (E)

Study on the staining of spores of *Nosema bombycis* by chromotrope 2R method.

SHUNMING T., ZHIFANG Z., YIREN L., JIALU H.

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

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1),72-74. (C,e)

Studies on silk productivity in some three-way crosses of the silkworm *Bombyx mori* L.

SINGH T.

Central Silk Board, B T M Layout, Madiwala, Bangalore 560068, India.

2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 75-77. (E)

Studies on the evaluation of some three-way cross hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L.

SINGH T.

Central Silk Board, 6th Floor, BTM Layout, Madiwala, Bangalore 560 068, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),153-155. (-E)

Evaluation of combining ability in hybrids between polyvoltine and bivoltine sex-limited cocoon colour breeds of silkworm, *Bombyx mori* L.

SUDHAKARA RAO P., *et al.*

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),163-167. (E)

Economic performance of mulberry cocoon production under different methods using chawki worms.

UMESH KB., CHANDRAPPA D., NAGESHCHANDRA BK.

Sericulture College, UAS(B), Chintamani - 563 125, India

2001 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol.35(2), 163-167. (E)

Influence of temperature and relative humidity on the rearing performance and disease incidence in CSR hybrid silkworms, *Bombyx mori* L.

VIJAYA KUMARI K.M., *et al*

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

2001 *International Journal of Industrial entomology*, Vol.3(2),113-116. (E)

Effect of mutual reaction between promoters and inhibitors on silkworm feeding habit.

WEIZHENG C., JINYAN S., XINGLI L., FENGZHU Z., HAI L.

Sericulture Department of Forestry College, Shandong Agriculture University, Taian 271018, China.

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1),35-38. (C,e)

A fluoride-endurance silkworm variety huafenggw X xue. A suitable both for spring and autumn.

XINGLIA S., YIREN L., SHUNMING T., GUIFANG L., XUEHUA S.

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

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1),52-55. (C,e)

Studies on the pathogenic microsporidia isolated from *Bombyx mori* in Shandong Province.

YANWEN W., ZHIMEI M., HUIJU G., DEWEN F.

Sericultural Department of Forestry College, Shandong Agricultural University ,
Taian 271018, China.

2002 Canye Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),67-71. (C,e)

Breeding of a new silkworm variety Wuhua X Xuxing for summer-autumn rearing.

YI H., YANGHU S., BIPING Z.

Research Institute of Sericulture, College of life Science, Soochow University,
Suzhou 215006, China.

2002 Canie Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),56-60. (C,e)

Improvement and application of rearing technique for grown silkworm, *Bombyx mori*, on plastic cocooning frame.

YULIN X., *et al.*

2002 Canye Kaxue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),82. (C)

Study on the selection of suitable mulberry silkworm strains for rearing with artificial diet in young stages.

YUNGEN M.

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

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 50-53. E)

Artificial diet rearing for the silkworm. III. Physical properties of diet.

YUNGEN M., LIUN J.

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

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 6-8. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Effect of food plant species on rearing performance of eri silkworm, *Samia ricini*, Donovan.
BISWAS N., DAS P.K.

Research Extension Centre, Central Silk Board, Diphu 782460, Karbi Anglong, Assam, India.
2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 36-39. (E)

Casual organism of flacherie in the silkworm *Antheraea assama* Ww : isolation, characterization and its inhibition by garlic extract.

CHOUDHURY A., GUHA A., YADAV A., UNNI BG., ROY MK.

Biochemistry Division, Regional Research Laboratory, Jorhat 785006, Assam, India.
2002 *Phytother. Res.*, Vol. 11, 89-90. (E)

Effect of imbibition on seed germination of *Terminalia arjuna* and *Terminalia alata*, two important food plants of tasar silkworm *Antheraea paphia* Linn.

DASH A.K., NAYAK B.K., GURU B.C.a

Department of Zoology, Dr. J.N. College, Balasore 756021, Orissa, India.
2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 94-97. (E)

Adoption of prophylactic measures to contain muga silkworm diseases.

KAKATI P.K.

CMER & TI, Ladoigarh, Jorhat, India.

2002 *Indian Silk*, Vol. 41(1), 19-21. (E)

Studies on the development of the uzi fly, *Blepharipa zebina* Walker (diptera : tachinidae) on *Notolophus antiqua* Linn. (Lepidoptera : lymantriidae), a pest of *Terminalia arjuna* and *Terminalia tomentosa*.

KISHORE R., SHARMA S.P., SHARAN S.K., SINHA B.R.R.P., THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi - 835-303, India.

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol. 40(2), 139-141. (E)

Leaf anatomical characters of castor genotypes and their impact on economic parameters of eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval (lepidoptera : saturniidae).

SANNAPPA B., JAYARAMAIAH M.

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

2001 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 35(2), 101-107. (E)

A module for mature grown tasar conservation.

SHANKAR RAO K.V., RAMKUMAR, PANDE V.K., THANGAVELU K.

Regional Tasar Research Station, Dharampura, Jagdalpur, Chattisgarh, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(10), 20-23. (E)

Adoption of improved technology for egg washing in *A. mylita* D.

SINHA M.K., TIWARI S.K., SURAJPAL.

CTSSS, Lakha, Raigarh, M.P., India.

2002 Indian Silk, Vol.40(11),21-23. (E)

Improved technique of cooking tasar cocoons.

SREENIVASA, GHOSH S.S., SENGUPTA D., THANGAVELU K.

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

2002 Indian Silk, Vol.40(12),21-23. (E)

Studies association between moth weight and potential fecundity of ecorace bhandara of tasar silkmoth (*Antheraea paphia* Linn.).

YADAV G.S., SINGH B.M.K., SINHA B.R.R.P., THANGAVELU K.

Research Extension Centre, Central Silk Board, Hatgambaria 833214, West Singhbhum, Jharkhand, India.

2001 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 5(1), 59-67. (E)

Impact of high temperature on testicular growth and development of valuable silkworm *Antheraea yamamai* (Lepideptora : *Saturiidae*).

YE G., HU C., CONG H.

Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2000 Ying Yong Sheng Tai Xue Bao; Vol.11(6),851-855. (C,e).

Vers à soie : génétique

Silkworms :genetics

RAPD analysis of *Bombyx mandarina* M. and Japanese (Fukuoka) *Bombyx mandarina* M.

CHENG L., DAOJUN C., ZHONGHUI X.

Laboratory of Sericulture of the Ministry of Agriculture, Chongqing 400716, China.

2001 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, vol.28(1),17-21. (C,e)

Application of DNA finger printing analysis in silkworm.

DORESWAMY C., GOVINDAN R., SANNAPPA B.

College of Sericulture, Chintamani, India.

2002 *Indian Silk*, Vol.40(11), 26-27. (E)

Linkage localization of "h mottled translucent", a new mutant in silkworm (*Bombyx mori* L.)

FANGYIN D., CHENG L., QINGYOU X., ZHONGHUI X.

Laboratory of Sericulture of Agriculture Ministry, Chongqing 400716, China.

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1),22-25. (C,e)

Kadono-Okuda : Linkage analysis of EST cDNA clones by using RFLP in the silkworm, *Bombyx mori*.

HARA W., et al.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 3058634, Japan.

2001 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.70(3),135-143. (J,e)

cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*.

IMAMURA M., YANG J., YAMAKAWA M.

Innate Immunity Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Tsukuba, Japan.

2002 *Insect Molecular Biology*, Vol.11(3),257-265. (E)

Antisense and double-strand RNA interference in a silkworm ovarian cell line.

ISOBE R., KOJIMA K., SAHARA K., ASANO S.I., BANDO I.

Division of Applied Biosc., Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., Kita 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol.71(1),43-47. (E)

Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation.KAMIMURA M., *et al.*

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2001 *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol.286, 67-73. (E)**Variability in chiasma frequency of polyvoltine mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) races.**

KUMARESAN P., MUKHERJEE S., SHINHA R.K.

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

2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 40-44. (E)**Study on inheritance of voltine gene in hybrids between monobivoltine and polivoltine tropical silkworm races (*Bombyx mori* L.).**

LAZAROV J., TSENOV P., NACHEVA J.

Sericulture Research Station - Vrasta, Bulgaria.

2000 *Journal of Animal Science*, Vol. 5-6(37), 60-63. (B,e)**ARS-activity of a DNA fragment from *Bombyx mori* in *Saccharomyces cerevisiae* cells.**LEGCHILINIA SP., *et al.*

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182, Russia.

2001 *Genetika*; Vol.37(11), 1497-1506. (R)**Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid.**

LI Y., ZADORI Z., BANDO H., DUBUC R., FEDIERE G., SZELEI J., TIJSSEN P.

Ctre de Rech. de Microbiol. et Biotech., INRS-Inst. A.-Frappier, Univ. du Quebec, 531 Bd des Prairies Laval, Canada H7V 1B7

2001 *Journal of General Virology*, Vol.82, 2821-2825. (E)**Transcriptional mapping of two genes encoding baculovirus envelope associated proteins.**

PEARSON MN., RUSSELL RL., ROHRMANN GF.

Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis, OR 97331-3804, USA.

2002 *J. Gen. Virol.*, Vol.83(4), 937-943. (E)**Characterization of kynurenine 3-monooxygenase gene corresponding to the white egg 1 mutant in the silkworm *Bombyx mori*.**QUAN G.X., *et al.*

Ins. Biotechnol. and Sericology Dep., National Inst. of Agrobiological Sci., Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8643, Japan.

2002 *Mol. Genet. Genomics*, Vol.267(1), 1-9. (E)**Cloning and analysis of a 1.8kb fragment sequence of *Bombyx mori* mitochondrial genome.**

SHUNYAO L., YUNQIANG L., CHENG L., ZEYANG Z., ZHONGHUI X.

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

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1), 26-30. (C,e)**Multiple forms of U2 snRNA coexist in the silk moth *Bombyx mori*.**

SIERRA-MONTES JM., FREUND AV., RUIZ LM., SZMULEWICZ MN., ROWOLD DJ., HERRERA RJ.

Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, Florida, USA.

2002 *Insect Molecular Biology*, Vol.11(1), 105-114. (E)

Characterization of RNA polymerase III transcription factor TFIIC from the mulberry silkworm, *Bombyx mori*.

SRINIVASAN L., GOPINATHAN KP.

Microbiology and Cell Biology Department, Indian Institute of Science, Bangalore, India.

2002 Eur. J. Biochem.; Vol.269(6),1780-1789.(E)

3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards.

THOMAS J., DA ROCHA M., BESSE A., MAUCHAMP B., CHAVANCY G.

Unité Nationale Séricicole, INRA, 25, quai Jean-Jacques Rousseau, 69350, La Mulatière, France.

2002 Insect Biochem. Mol. Biol.; Vol.32(3),247-253.(E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Haemocyte counts in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. and their changes during the progressive infection of BmNPV

BALAVENKATASUBBAIAH M., NATARAJU B., THIAGARAJAN V., DATTA R.K.

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),158-162. (E)

Probing a pheromone binding protein of the silkmoth *Antheraea polyphemus* by endogenous tryptophan fluorescence.

BETTE S., BREER H., KRIEGER J.

University of Hohenheim, Institute of Physiology, Garbenstrasse 30, 70599, Stuttgart, Germany.

2002 *Insect Biochem. Mol. Biol.*; Vol.32(3),241-246. (E)

Involvement of calcium, inositol-1,4,5 trisphosphate and diacylglycerol in the prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroid synthesis and secretion in the prothoracic glands of *Bombyx mori*.

DEDOS SG., FUGO H.

Institute of Biology, National Center for Scientific Research Demokritos, Aghia Paraskevi, Athens 15310, Greece.

2001 *Zoolog. Sci.*, Vol.18(9),1245-1251. (E)

Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae.

FLIPSEN JT., MARTENS JW., VAN OERS MM., VLAK JM., VAN LENT JW.

Department of Virology, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

1995 *Virology*, Vol.208(1),328-335. (E)

Molecular characterization of a *Bombyx mori* protein disulfide isomerase (bPDI).

GOO TW., YAN EY., HWANG JS., PARK S., YOU KH., KWON OY.

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea.

2002 *Cell Stress Chaperones*; Vol.7(1),118-125. (E)

Phylogenetic relationship of *Bombyx mori* protein disulfide isomerase.

GOO TW., YUN EY., HWANG JS., KANG SW., YOU KH., KWON OY.

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea.

2002 *Z. Naturforsch.*, Vol.57(1-2),189-196. (E)

Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene.

GUAN G.K., KANDA T., TAMURA T.

Insect Biotechnology and Sericology Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan.

2002 *Insect Molecular Biology*, Vol.11(3),217-222. (E)**Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*.**

HEMMI H., ISHIBASHI J., HARA S., YAMAKAWA M.

2002 *Febs Let.*, Vol.518(1-3), 33-38. (E)**Effects of testosterone propionate and estradiol-17B on the biochemical changes in the fat body and haemolymph on the bivoltine silkworm *Bombyx mori* L.**

HUGAR I.L., KALIWAL B.B.

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad - 580003, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),149-152. (E)**Role of specific activators of intestinal amino acid transport in *Bombyx mori* larval growth and nutrition.**

LEONARDI M.G., CASARTELLI M., FIANDRA L., PARENTI P., GIORDANA B.

Department of Biology, University of Milan, Milan, Italy.

2001 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 48(4), 190-198.**Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP glucosyltransferase.**

LUQUE T., OKANO K., O'REILLY DR.

Department of Biolbogy, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London SW7 2AZ, United Kingdom

2002 *Eur. J. Biochem.* ; Vol.269(3),819-825. (E)**Activity of alkaline protease in the midgut tissue of the silkworm *Bombyx mori* L.**

MARIBASHETTY V.G., CHADRAKALA M.V., AFTAB AHAMED C.A., RAGHURAMAN R.

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

2001 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 5(1), 45-49. (E)**Localization of *Manduca sexta* allatotropin neuropeptides in developing ventral nerve cord of the silk moth *Bombyx mori*.**

PARK C., LEE B.H.

Department of Biology and Division of biological Sciences, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.3(2),177-185. (E)**An ENF peptide, *Bombyx mori* paralytic peptide, induces cell proliferation and morphological changes in *Bombyx* cell lines.**

SASAGAWA H., NAKAHARA Y., KIUCHI M.

2001 *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, Vol. 37(10), 638-640. (E)**The cDNA-structure of the prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkmoth *Hyalophora cecropia*.**

SEHNAL F., HANSEN I., SCHELLER K.

Institute of Entomology, Academy of Sciences, Branisovska 31, 37005, Ceske Budejovice, Czech Republic.

2002 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32(2), 233-237. (E)**Identification of an imidazole compound-binding protein from Diapausing pharate first instar larvae of the wild silkmoth *Antheraea yamamai*.**

SHIMIZU T., SHIOTSUKI T., SEINO A., AN Y., KUWANO E., SUZUKI K.
Department of Agro-Bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan.
2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol.71(1),35-42. (E)

Studies on the activity of GSH - Px in the hemolymph of fluoride poisoning silkworm larvae.
SHUNLIN L., SIJIA M., CHUNYANG D.
Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.
2002 Canie Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),61-63. (C,e)

Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors.
STAUBLI F., *et al.*
Dept. of Cell Biol., Zoological Inst., University of Copenhagen, Universitetsparken 15, DK-2100 Copenhagen, Denmark.
2002 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.99(6),3446-3451. (E)

Flavonoid 56 glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*.
TAMURA Y., NAKAJIMA K., NAGAYASU K., TAKABAYASHI C.
Insect Gen. and Evolution Depa., National Inst. of Agrobiological Sci., 1-2 Owashi, Tsukuba, 305-8634, Ibaraki, Japan.
2002 Phytochemistry; Vol.59(3);275-278. (E)

The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph : gene and functional analysis.
VERMUNT A.M.W., KAMIMURA M., HIRAI M., KIUCHI M., SHIOTSUKI T.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.
2001 Insect Molecular Biology, Vol.10(2), 147-154. (E)

cDNA cloning of calcineurin heterosubunits from the pheromone gland of the silkmoth, *Bombyx mori*.
YOSHIGA T., YOKOYAMA N., IMAI N., OHNISHI A., MOTO K., MATSUMOTO S.
Lab. of Mol. Ent. and Bacu The Inst. of Phys. and Chem. Res. (RIKEN), Hirosawa, 2-1, Wako-shi,351-0198, Saitama, Japan
2002 Insect Biochem. Mol. Biol.;Vol.32(4),477-486. (E)

Origin of yellowish fluorescent substance limited to male cocoons of race "yong guang" of the silkworm, *Bombyx mori*.
ZHEN-CHENG Y., YOKOYAMA T., NINAGI O., OSHIKI T.
2001 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol.70(3), 159-161. (J,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embriology

Enhanced expression of *Bombyx* seven-up, an insect homolog of chicken ovalbumin upstream promoter - transcription factor, in diapause eggs exposed to 5 C.

KATOH H., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

Bioscience Center, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol.71(1),17-24. (E)

Morphological variation of micropylar apparatus in *Bombyx mori* eggs.

KAWAGUCHI Y., KUSAKABE T., KOGA K.

Lab.of Silkworm Sci., Fac. of Agri., Kyushu Univ. Graduate School.Hakozaki 6-10, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol.71(1),49-54. (E)

Incidence of mutation in the silkworm larvae from the eggs irradiated by heavy ion beams.

KOTANI E., FURUSAWA T., NAGAOKA S., ICHIDA M., SUGIMURA Y., NOJIMA K., MASUKAWA.

Dept. Applied Biol., Kyoto Inst. Technology, Japan.

2001 *Biol. Sci. Space*, Vol.15(1), 268-269. (J,e)

Changes in carbohydrate, lipid and moisture contents during the embryonic development in *Samia cynthia ricini* boisduval.

KRISHNAPPA B.L., REDDY D.N.R., NARAYANASWAMY K.C.

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

2001 *Indian Journal of Sericulture*, Vol.40(2),180-181. (E)

Determination of a sugar chain and its linkage site on a glycoprotein TIME-EA4 from silkworm diapause eggs by means of LCESI -Q-TOF-MS and MS/MS.

KURAHASHI T., et al.

Lab. of Organic Chem., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., Chikusa,464-8601, Nagoya, Japan.

2002 *Bioorg. Med. Chem.*, Vol.10(6),1703-1710. (E)

Double copulation of a female with sterile diploid and polyploid males recovers fertility in *Bombyx mori*.

SAHARA K., KAWAMURA N.

Department of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

2002 *Zygote*, Vol.10(1),23-29. (E)

Androgenesis in mulberry silkworm *Bombyx mori* L. : a review.

SINGH R., RAGHAVENDRA RAO D., KARIAPPA B.K., JAYASWAL K.P.

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

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.3(2),109-112. (E)

The effect of W chromosome origin on sex-chromosome pairing in ZZWW tetraploid females of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the congeneric wild silkworm, *Bombyx mandarina*.

TANAKA N., YOKOYAMA T., ABE H., NINAGI O., OSHIKI T.

Laboratory for DNA Data Analysis, Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Yata Shizuoka, Japan.

2002 Genetica, Vol.114(1), 89-94. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Comparative structure analysis of tyrosine and valine residues in unprocessed silk fibroin (silk I) and in the processed silk fiber (silk II) from *Bombyx mori* using solid-state (13)C, (15)N, and (2)H NMR.

ASKURA T., SUGINO R., YAO J., TAKASHIMA H., KISHORE R.

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan.

2002 Biochemistry, Vol.41(13), 4415-4424. (E)

Synthesizing spider silk.

BENITO B.

2002 Trends Biotechnol., Vol.20(5),189. (E)

Analysis of expressed sequence tags of the spider, *Aaneus ventricosus*.

CHUNG E.H., *et al.*

College of Natural Ressources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.3(2),191-119. (E)

The silk of lepidoptera.

FEDIC R., ZUROVEC M., SEHNAL F.

Institute of Entomology, University of South Bohemia, Branisovka 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic.

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol.71(1),1-15. (E)

Evolution of spider silk proteins : insight from phylogenetic analyses.

HAYASHI CY.

Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, WY 82071, USA.

2002 EXS, Vol.92, 209-223. (E)

Effect of estradiol-17 beta on cell area, lumen area and trehalase activity of posterior silk gland of *Bombyx mori* L.

KESHAN B., RAY AK.

Department of Animal Physiology, Bose Institute, Calcutta, India.

2001 Indian J. Exp. Biol., Vol.39(11),1096-1102. (E)

Comparison of the spinning of selachian egg case ply sheets and orb web spider dragline filaments.

KNIGHT D.P., VOLLRATH F.

Department of Zoology, Oxford University, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK.

2001 Biomacromolecules, Vol. 2(2), 323-334. (E)

Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*.

NIRMALA X., MITA K., VANISREE V., ZUROVEC M., SEHNAL F.

Inst. of Entomology, Academy of Science, University of South Bohemia,
Budejovice, Czech Republic.

Ceske

*2001 Insect Mol. Biol., Vol.10(5), 437-445. (E)***A novel TATA-box-binding factor from the silk glands of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*.**

SRINIVASAN L., GOPINATHAN KP.

Microbiology and Cell Biology Department, Indian Institute of Science, Bangalore 560012, India.

*2002 Biochem. J., Vol.363(3), 503-513. (E)***A new chitinase-related gene, BmChiR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid.**

TAKAHASHI M., KIUCHI M., KAMIMURA M.

Department of Sericulture, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba,
305-8634, Ibaraki, Japan.*2002 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 32(2), 147-151. (E)***Silk : molecular organization and control of assembly.**

VALLUZZI R., WINKLER S., WILSON D., KAPLAN DL.

Tufts Univ., Dep. of Chemical & Biological Engineering, Biotechnology & Bioengineering Center,
Medford, MA 02155, USA.*2002 Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., Vol.357 (1418), 165-167. (E)***Molecular biology of spider silk.**

WINKLER S., KAPLAN DL.

Department of Chemical Engineering & Biotechnology Center, Tufts University,
MA 02155, USA.

Medford,

*2000 J. Biotechnol., Vol. 74(2), 85-93. (E)***Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*.**

ZUROVEC M., SEHNAL F.

Physiology, Academy of Sciences, Entomological Institute, Ceske Budejovice,
Budejovice 37005.

Ceske

2002 J.Biol.Chem., Mar 8. (E)

Soie :

Silk

Fibre science : Supercontraction stress in wet spider dragline.

BELL FL., McEWEN IJ., VINEY C.

Department of Chemistry, Heriot-Watt University, Edinburgh EH14 4AS, United Kingdom.

2002 Nature, Vol.416(6876), 37. (E)

Influence of different surface modification treatments on poly (D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro.

CAI K., YAO K., CUI Y., YANG Z., LI X., XIE H., QING T., GAO L.

Research Institute of Polymeric Materials Tianjin University, Tianjin 300072, People's Republic of China.

2001 Biomaterials, Vol.23,1603-1611. (E)

Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro.

CAI K., YAO K., CUI Y., YANG Z., LI X., XIE H., QING T., GAO L.

Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, People's Republic of China.

2002 Biomaterials, Vol.23(7),1603-1611. (E)

Poly(D,L-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin : effects on the culture of osteoblast in vitro.

CAI K., YAO K., LIN S., YANG Z., LI X., XIE H., QING T., GAO L.

Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, People's Republic of China.

2002 Biomaterials, Vol.23(4), 1153-1160 (E)

Microbial production of spider silk proteins.

FAHNESTOCK S.R., YAO Z., BEDZYK L.A.

Dupont Experimental Station, Dupont Central Research and Development, P.O. Box 80328, Wilmington, DE 19880-0328, USA.

2000 J. Biotechnol., Vol. 74(2), 105-119. (E)

Lessons from nature-protein fibers.

GUHRS K.H., WEISSHART K., GROSSE F.

Abteilung Biochemie, Institut für Molekulare Biotechnologie E. V., PF 100813, D-07708 Jena, Germany.

2000 J. Biotechnol., Vol. 74(2), 121-134. (E)

Biological liquid crystal elastomers.

KNIGHT D.P., VOLLRATH F.

Zoology Department, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, United Kingdom.

2002 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, Vol.357(1418), 155-163. (E)**Spinning an elastic ribbon of spider silk.**

KNIGHT DP., VOLLRATH F.

Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS.

2002 *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, Vol.357 (1418), 219-227. (E)**Characteristics of crepes made of super hybrid silk, blended yarns of silk and nylon.**

KURIOKA F., AOKI A.

2001 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.70(3), 177-180. (J,e)**Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells.**LAZARIS A., *et al.*

Nexia Biotechnologies, Vaudreuil-Dorion, Quebec J7V 8P5, Canada.

2002 *Science*, Vol.295(5554), 472-476. (E)**Structure and properties of silk fibroin-poly (vinyl alcohol) gel.**

LI M., LU S., WU Z., TAN K., MINOURA N., KUGA S.

Material Engineering Institute of Suzhou University, No. 178 East Gang-Jaing Road, Suzhou, PR China.

215021,

2002 *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol.30(2), 89-94. (E)**Study of enzyme immunosensor immobilized by regenerated silk fibroin.**

LI W., LI YR., PAN N.

Institute of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China.

2001 *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, Vol.17(6), 639-642. (C)**New silk protein : modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials.**

MORI H., TSUKADA M.

Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan.

2000 *J. Biotechnol.*, Vol. 74(2), 95-103. (E)**Development of non-twisted wrapping silk yarn.**

SHIMIZU S., AOKI A., MATSUMOTO N

Hyakunin-cho 3-25-1, Shinju-ku, Tokyo 169-0073, Japan.

2001 *The journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.70(3), 171-176. (J,e)**Strength and structure of spiders' silk.**

VOLLRATH F.

Department of Zoology South Parks Road, Oxford OX1 3PS. Angleterre.

2000 *J. Biotechnol.*, Vol.74(2), 67-83. (E)**Silk biotechnology.**

WEISSHART K.

2000 *J. Biotechnol.*, Vol 74(2), 65-66. (E)**Comparison analysis of degumming procedures for silkworm silk.**

YUQING Z.

Sericultural Department, Soochow University, Suzhou 215151, China.

2002 *Canye Kexue Acta Sericologica Sinica*, Vol.28(1), 75-79. (C,e)

Study on microscopic structure of cocoon filament from silkworm varieties with significantly different size of spinning silk.

YUYIN C., MENGKUI X., LIPING H., YONGHUANG J., YUANXIANG J.

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

2002 Canye Kexue Acta Sericologica Sinica, Vol.28(1),80-81. (C,e)

Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation.

ZHAORIGETU S., SASAKI M., WATANABE H., KATO N.

Faculty of Applied Biochemistry, Hiroshima University Higashi-Hiroshima, Japan.

2001 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 65(10), 2181-2186. (E)

Genetically directed synthesis and spectroscopic analysis of a protein polymer derived from a flagelliform silk sequence.

ZHOU Y., WU S., CONTICELLO V.P.

Departement of Chemistry, Emory University, Atlanta, Georgia 30322, USA.

2001 Biomacromolecules, Vol. 2(1), 111-125. (E)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans SERICOLOGIA ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.
- Remerciements.
- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Seric. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

