

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

Statistiques 2001 / Statistics 2001	i
---	---

Mini-revue / Mini-review

Structure and development of silkworm (<i>Bombyx mori</i>) eggs	323
Structure et développement de l'œuf du ver à soie (<i>Bombyx mori</i>)	335
TRIBHUWAN SINGH, VIJAYALAKSHMI RAO, A. H. JINGADE & M. V. SAMSON	

Article scientifique / Scientific paper

Effects of ethyl methanesulfonate on meiotic chromosomes of silkworm <i>Bombyx mori</i> L.	343
Effets de l'éthyl-méthanosulfonate sur les chromosomes méiotiques du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	361
H. B. MAHESHA & S. HONNAIAH	

Rapports techniques / Technical reports

Development of a new method for collecting silkworm larvae hemolymph by laser beam incision	365
Une nouvelle méthode de recueil de l'hémolymph de larves de ver à soie par incision au laser	373
KOBAYASHI TORU	

Effect of casitose (P & PH) supplementation on the haemolymph protein profile and the reproductive characters of silkworm <i>Bombyx mori</i> L.	377
Effet de l'addition de casitose (P & PH) sur le profil protéique de l'hémolymph et les caractères reproductifs du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	389
G. RAVIKUMAR, U. BALASUBRAMANIAN & M. KRISHNAN	

Differential <i>in vitro</i> flowering response of mulberry shoot tips as influenced by maturity of explants and media composition	395
Réponse différentielle de floraison d'extrémités de pousses de mûrier <i>in vitro</i> en fonction de la maturité des explants et de la composition des milieux	403
DEEPU MATHEW	

Effect of <i>Seriboost</i> on yield attributes, leaf yield of mulberry and some commercial characters of silkworm	407
Effet du <i>Seriboost</i> sur les attributs de rendement, le rendement en feuilles de mûrier et certains caractères commerciaux du ver à soie	419
N. R. SINGHVI, A. SARKAR & R. K. DATTA	

Notes brèves / Brief notes

A brief report on the breeding of special silkworm varieties "Xinmiao" and "Mingri"	425
---	-----

Bref rapport sur le lignage de variétés spéciales de vers à soie "Xinmiao" et "Mingri"	431
XU M.-K, CHEN Y.-Y., JIANG Y.-H.	

Reversal of water logging effect through foliar spray of commercial plant growth regulator in mulberry	433
--	-----

Lutte contre l'excès d'eau grâce à la vaporisation foliaire d'un régulateur de croissance végétal chez le mûrier	439
--	-----

C. DAS, T. SENGUPTA, S. CHATTERJEE, A. K. MISRA, S. K. SEN & B. SARATCHANDRA	
--	--

Bibliographie / Bibliography	441
--	-----

Sériciculture générale / General sericulture	443
--	-----

Mûrier / Mulberry	445
-----------------------------	-----

<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	447
--	-----

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology	449
---	-----

Vers à soie : génétique / Silkworms : genetics	451
--	-----

Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms : physiology, biochemistry	455
---	-----

Vers à soie : œufs, embryologie / Silkworms : eggs, embryology	459
--	-----

Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms : silk glands	461
---	-----

Soie / Silk	463
-----------------------	-----

Statistiques 2001 - 2001 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 2001.

Table I. 2001 cocoon and raw silk production.

Pays <i>Country</i>	Cocons frais <i>Fresh cocoons</i> (tonnes)	Soie grège <i>Raw silk</i> (tonnes)
Brésil / <i>Brazil</i>	9 916 ⁽¹⁾	1 484
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	52	6.5
Cambodge / <i>Cambodia</i>	11	1
Chine / <i>China</i>	512 700	58 600
Colombie / <i>Colombia</i>	67	-
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	5	0.4
Egypte / <i>Egypt</i>	15	2
Georgie / <i>Georgia</i>	10	0
Grèce / <i>Greece</i>	40	4
Inde / <i>India</i> ⁽²⁾	126 136 ⁽³⁾	15 857 ⁽⁴⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	748.7	110.4
Iran	5 000	770
Italie / <i>Italy</i>	1	-
Japon / <i>Japan</i>	1 031	431
Philippines	17	1.1
Roumanie / <i>Romania</i>	2	0
Thaïlande / <i>Thailand</i>	3 473 ⁽⁵⁾	1 500
Turquie / <i>Turkey</i>	46.6	7
Vietnam	22 000 ⁽⁶⁾	2 000

- Non disponible / *Not available.*

(1) 2000/2001.

(2) avril 2000 - mars 2001 / *april 2000 - March 2001.*

(3) dont 1 473 tonnes de cocons eri / *including 1 473 tons eri cocoons.*

(4) dont 1 425 tonnes non mûrier / *including 1 425 tons non mulberry.*

(5) bivoltins / *bivoltine.*

(6) dont 350 tonnes non mûrier / *including 350 tons non mulberry.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 2001.*Table II. 2001 cocoon and raw silk imports and exports.*

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Brésil / Brazil	74	1 287 ⁽¹⁾	2	52
Bulgarie / Bulgaria	0	0	0	0
Cambodge / Cambodia	0	0	-	-
Colombie / Colombia	0	0	0	0
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	0	0	0	0
Egypt / Egypt	0	0	0	43.4
France	3.8	0.1	9.1	263.6
Georgie / Georgia	0	0	0	0
Grèce / Greece	0	0	0	1.8
Inde / India	8	45 ⁽²⁾	6	4 713 ⁽³⁾
Indonésie / Indonesia	1.3	3.3	-	5.8
Italie / Italy	0.3	139	0	2 760
Japon / Japan	60	2	402	1 849 ⁽⁴⁾
Philippines	-	-	-	0.1
Roumanie / Rumania	0	0	0	0
Thaïlande / Thailand	0.2	0.2	45.3	134
Turquie / Turkey	0	0	-	-
Vietnam	0	1 500	30	450

- Non disponible / Not available.

(1) dont 361 kg de soie ouvrée / including 361 kg of thrown silk yarn.

(2) dont 19 tonnes non mûrier / including 19 tons non mulberry.

(3) dont 1265 tonnes non mûrier / including 1265 tons non mulberry.

(4) dont 71 tonnes non mûrier / including 71 tons non mulberry.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 2001.

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 2001.

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
<i>Country</i>	<i>Price paid to producers (fresh cocoons)</i>	<i>Export price (dry cocoons)</i>	<i>Import price (dry cocoons)</i>
Brésil / <i>Brazil</i>	2	7.6	1
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	2.5	9	xx
Centre Afrique / <i>Central Africa</i>	2	-	-
Colombie / <i>Colombia</i>	2.8	xx	xx
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	1.5	xx	xx
Egypte / <i>Egypt</i>	3.9	xx	-
Grèce / <i>Greece</i>	2.5	xx	-
Inde / <i>India</i>	2.8	-	-
Indonésie / <i>Indonesia</i>	2	1.5	-
Iran	3	-	-
Japon / <i>Japan</i>	15	7.5	9
Philippines	2.4	-	-
Roumanie / <i>Romania</i>	2	xx	xx
Thaïlande / <i>Thailand</i>	2.5	8.8	5.4
Turquie / <i>Turkey</i>	4	xx	-
Vietnam	2	xx	5.5

- Non disponible / *Not available.*

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

No cocoon export / import.

STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) EGGS

TRIBHUWAN SINGH*, VIJAYALAKSHMI RAO, A. H. JINGADE & M. V. SAMSON*

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram – Post, Kodathi, Bangalore – 560 035, India

The silkworm, *Bombyx mori* eggs shows gradual loss in weight during the course of their development. Genesis of offspring inside the egg shell (oocyte covering which is complex, multilayered, multiregional, supra-molecular structure) proceeds safely to the stages of cleavage, blastoderm, germ band and amnion followed by histogenesis and organogenesis to launch new individual into future.

Proteins, lipid and glycogen associated in specific proportion in newly laid eggs exhibit different profile of utilization during the course of embryonic development.

The present review is an attempt to facilitate a brief account of the major achievements on the structure and development of silkworm (*Bombyx mori*) eggs along with metabolic changes associated with embryonic development, which can have positive significance to embryologists while studying the pattern of embryogenesis in tropical silkworm genotypes.

Keywords: *Bombyx mori*, eggs, development, metabolic changes.

INTRODUCTION

The structure of egg is the determiner of the pattern of development (Boswell & Mahowald, 1985). The structure and development of eggs in various insects have been described by many workers (Engelmann, 1970; Jura, 1972; Balinsky, 1981). The first detailed study on the development (embryogenesis) of silkworm *Bombyx mori* egg was carried out by Toyama (1902). Since then embryological studies were confined especially to solving the practical problems, such as identification of suitable stages for refrigeration of early embryos and the initiation, continuation and termination of diapause in order to develop an effective system for long term cold storage of silkworm eggs.

Takami (1969) was apparently the first who published a review on the embryogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*. During these studies, morphological changes occurring during different embryonic stages in the silkworm, *B. mori* were described (Nakada, 1932; Takami & Kitazawa, 1960). In these studies, morphological changes of embryos were used to assess their long term survival. Moreover, the tolerance of eggs to cold storage varies with the stage of embryonic development besides genotypes because of adaptation phenomenon, metabolic changes and also genetic variations etc. (Salt, 1961; Rockstein, 1974; Sander *et al.*, 1985 & Sonobe *et al.*, 1986) and hence the recent studies on silkworm eggs become more concerned with physiology, biochemistry and metabolic activity associated with termination of diapause (Yaginuma *et al.*, 1990; Yamashita & Yaginuma, 1991) for effective handling.

* Central Silk Board, 6th Floor, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore-560 068, India

In this review article an attempt has been made to review briefly the relevant information available on the structure and development of *Bombyx mori* eggs to provide an annotated outline of embryogenesis and various processes involved.

STRUCTURE OF EGG

1. Shape, Size and Colour:

Takami (1946) reported that the egg of the silkworm, *Bombyx mori* is short, spheroid, slightly attenuated at the anterior end where the micropyle is situated and laterally flattened. The shape of egg is entirely dependent on the shape of chorion, which is formed in maternal body. Hence, the egg shape is inherited pseudo-maternally.

However, the size and weight of eggs varies from breed to breed, voltinism to voltinism and even season to season but it is approximately 1.30 mm long, 1.00 mm wide and 0.6 mm thick (Miya, 1984) having 0.5 mg weight and about 1.075 specific gravity. Among the eggs of a moth, the ones which are being laid first are heavier than those laid later. The egg weight changes due to environmental conditions and even the eggs of same genotype have weight variations due to differences in the rearing conditions.

Except few exceptions (white and red eggs), the eggs of *Bombyx mori* are usually brownish yellow in colour. Generally deep coloured eggs are common in Japanese races, while eggs of Chinese races are commonly light in colour. Usually, the chorion is colourless and semitransparent and hence the yolk colour is easily observable through shell in newly laid eggs. Yolk is normally light yellow in colour but in some genotypes, it is dark yellow. The colour of yolk is entirely dependent on the maternal genotype, having a close relation to the haemolymph colour and cocoon colour of the mother moth (Tazima, 1964).

The colour of egg is also due to the colour of serosal cells. The pigment present in serosal cells is attributed to one of the amino acids - tryptophane. The pathway from tryptophane to ommochrome has been reviewed in detail by Linzen (1974). In general the pigment is formed in a series of steps in a sequence: tryptophane $\rightarrow$ α oxytryptophane $\rightarrow$ formylkynurenine $\rightarrow$ kynurenine $\rightarrow$ 3 hydroxykynurenine $\rightarrow$ ommochrome (pigment). In this series of reaction, tryptophane oxygenase, kynurenine formamidase, kynureninase, kynurenine 3 hydroxylase enzymes participate. The eggs in which the pigment is not formed indicate an absence of these enzymes resulting in yellow or white eggs (Koga & Osanai, 1967).

The eggs receive gluey substance of moth during deposition to adhere to the substratum / egg card. The gluey substance is secreted from the sebific gland or accessory gland opening at the vestibulum.

2. Eggshell (Chorion):

A new generation begins at the moment of fertilization of an oocyte by an appropriate sperm. After fertilization, a series of well defined structural and biochemical changes occurs within the oocyte leading to genesis of offspring (Margaritis, 1985). For these processes to occur successfully, the egg has to be enclosed in such an entity as to permit embryogenesis to proceed safely. The major role played in this direction is by an oocyte covering, which is commonly referred as eggshell (vitelline membrane and chorion). The physiological function of chorion is :

- To permit sperm penetration into the egg (Hinton, 1981) for fertilization.
- To protect oocyte from unfavourable environmental conditions such as extreme temperatures, high humidity, dryness (Yamashita & Hasegawa, 1985) and pathogenic attacks (Hinton, 1981).
- To ensure adequate oxygen supply for all biochemical reactions occurring within developing embryos and at the same time getting rid off carbon - dioxide (Mazur *et al.*, 1982).
- To provide elasticity for easy oviposition and facilitate hatching at the end of embryogenesis.

The insect eggshell or chorion in *B. mori* can be discriminated into four spatially differentiated regions i. e., the anterior pole region (which has the specialized area for sperm entry), the posterior pole region, the ventral and dorsal regions and lateral flat region (Kawaguchi *et al.*, 1996). The eggshell is very complex, multilayered, multiregional, supra-molecular structure. There are three major layers in any insect shell: the vitelline membrane, the endochorion and the exochorion. The major amino-acids observed in the egg chorion are presented in Table I.

Table I. Amino acid content in the chorion of *Bombyx mori* eggs.

Tableau I. Teneur en acides aminés du chorion des oeufs de *Bombyx mori*.

Amino acid	Outer layer	Middle layer	Inner layer
Acide aminé	Couche externe	Couche médiane	Couche interne
Glycine	36.8	35.0	18.2
Alanine	8.5	3.1	8.3
Serine	3.2	4.5	6.7
Tyrosine	8.1	1.5	2.2
Valine	6.1	5.1	6.0
Asparagine	4.0	4.9	9.6
Glutamic acid / Acide glutamique	3.7	3.5	11.6
Threonine	3.3	2.0	5.1
Lysine	0.1	0.4	2.5
Phenylalanine	1.9	1.2	0.15
Isoleucine	3.2	2.1	3.8
Arginine	2.3	3.2	3.5
Leucine	6.4	1.4	7.0
Proline	4.3	2.3	10.1
Histidine	0.4	0.0	1.1
Methionine	0.0	0.4	1.1
Cysteine	5.8	29.6	0.5
Tryptophan	1.8	0.8	0.7

The egg shell is produced by mesodermal follicular epithelial cells which are the parts of follicle. Each follicle is an unit within the paired ovary. In *Bombyx mori*, ovary is of polytrophic meroistic type. The number of ovarioles in each ovary is four and looks like a coiled spring of beads containing eggs. Each ovariole contains approximately 50-60 follicles at various stages of oogenesis. Egg shell formation is a gradual process involving certain cellular activities. Such activities have been recognized and analyzed morphologically and biochemically in *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori* (Regier & Kafatos, 1985; Regier *et al.*, 1980).

Chorion synthesis starts with the formation of 'trabecular layer' on the outer side of vitelline membrane by the release of micro-particles from follicular epithelium (Matsuzaki, 1968). The trabecular layer is covered by several layers of helicoidally arranged fibrillar lamellae. The outer region of egg contains unique 'osmiophilic' layer with 15-20 lamellae and very narrow micropyle. Rough surface endoplasmic reticular and golgi bodies increase greatly in number at the later stage of

inner layer formation and are dispersed throughout the cytoplasm of follicle cells. The middle layer of chorion is formed by secretory granules which are recognized in golgi regions. The middle layer of chorion consists of numerous fibrous elements which seem to be transformed from the secretory granules. Degenerative changes takes place remarkably in the components of follicle cells after the formation of chorion.

The studies on the synthesis of chorion in *B.mori* eggs was detailed by many workers (Ohtsuki *et al.*, 1977; Miya, 1978) and have been reviewed by Mazur *et al.*, 1982.

3. Micropyle and Vitelline membrane:

The surface of micropyle region shows a petal like pattern, with the opening of micropyle canals at its centre. The micropyle canals are normally 3 - 4 in number but in some cases 6 - 8 canals have also been reported (Kanada *et al.*, 1974; Ohtsuki, 1979). Each micropyle canal can be divided into two parts - a tube penetrating the chorion and a protrusion connecting the tube to the vitelline membrane (Akai, 1958). The former is designated as 'ectomicropyle' and the latter 'entomicropyle'. In addition to micropyle, there are about 5000 - 10000 tiny pores around the egg surface. These pores permit air entry to meet the requirement of oxygen during embryonic development.

Beneath the chorion is very thin vitelline membrane enclosing the serosa and semi-liquid fluid (yolk) which fills the eggs. The vitelline membrane is secreted uniformly and its formation starts after the degeneration of nurse cells i.e. at the time when oocyte occupies almost the entire egg chamber (Telfer & Smith, 1970). The vitelline membrane is composed of an electron dense outer layer and an inner layer containing abundant irregular shaped electron dense granules of various size (Akutsu & Yoshitake, 1977; Miya, 1978).

DEVELOPMENT OF EGG (EMBRYOGENESIS)

Different developmental stages of eggs are shown in figure 1 (stage 1 -30).

1. Fertilization:

The fertilization is a life-saving event which saves sperm and ovum from certain death, with the union of the two gametes acting as an evolutionary spring board to launch a new individual into the future (Shapiro *et al.*, 1981). When male and female moth of *Bombyx mori* copulates, ejaculation occurs and innumerable spermatozoa enter into the bursa copulatrix of female moth's reproductive organ. Through ductus seminalis, ductus tortuosus and receptaculum seminis, these sperms reach the lower part of ovipositor and wait for an egg to come down to the ovarian tube. Just before the egg is being laid, the spermatozoa enter into it through the micropyle.

The mature egg of the silkworm (*Bombyx mori*) is surrounded by two layers - the vitelline membrane and the chorion (Margaritis, 1985; Regier & Kafatos, 1985). The chorion consists of two groups of layers - the outer layer and the inner layer. The inner layer and the inner portion of outer layer are mechanically soft and pliable, while the outer portion of outer layer is mechanically rigid (Wilde & Loof, 1973). The morphological feature of the chorion which allows penetration of sperm is micropyle apparatus, situated at the anterior pole of the egg. Further, the morphological organisation of chorionic layers is extremely modified in the region of micropyle (Wilde & Loof, 1973).

The first maturation (reduction) division begins just before oviposition and terminates 5-6 minutes after the eggs are being laid. Thus, the nuclei in the egg which have been just oviposited are in anaphase stage of first reduction division. The female nucleus is divided into two, of which one is being eliminated under the vitelline membrane (the first polar body). The remaining one again divides into two, one of which is again being eliminated (second polar body). This second maturation division takes place in about 60 minutes after oviposition and is completed in about next 20 minutes, releasing

the second polar body. This whole process of reduction division takes approximately 90 - 100 minutes from oviposition (Ohtsuki & Murakami, 1968).

As soon as reduction division is completed only one nucleus will be seen in the egg, which becomes a female's nucleus. During the interval when all these changes take place in egg nucleus, the sperm sheds its tail. The central body of sperm divides into two and the anterior part swells into spherical body called male pronucleus. The female and male pronuclei unite to form the zygote. This process is known as syngamy which is being completed within 2 hrs of deposition of egg (stage 1). Thus after fertilization, the zygote restore the original chromosome number of the organism ($2n = 56$). Though, the number of spermatozoa entering the egg may be several, only one of them penetrates into an ovum and fertilizes the female pronucleus and the rest degenerate and are absorbed.

2. Cleavage and Blastoderm formation:

As in most insects, the silkworm (*B. mori*) eggs also undergo superficial cleavage. The content of eggs consists of two parts - the protoplasm and the endoplasm. Protoplasm forms a reticulum which pervades the substance of egg and forms a bounding layer beneath the vitelline membrane. This is termed as periplasm which is free from yolk spheres. The endoplasm (yolk), which occupies the central part of the egg, is contained within the protoplasmic reticulum. The zygote nucleus forms many nuclei by synchronous mitotic divisions, which is being reported 10 times approximately within 10 hrs of oviposition (Ohtsuki & Murakami, 1968; Miya, 1984) (stage 2). Afterwards, luminous circle of microtubules appear around the cleavage nuclei. Takesue *et al.* (1980) suggested that these microtubules are responsible for the movement of cleavage nuclei towards the egg surface.

These dividing nuclei surrounded by protoplasm will be transformed into cells. Subsequently, greater number of these cleavage cells migrates towards the periphery of the egg, merge in the periplasm and form a layer directly beneath the vitelline membrane called blastoderm. Some of the cleavage nuclei do not move to the periphery but persists and form yolk cells or vitellophages. These vitellophages have the function of supplying nutrients to the embryo. The nuclei projecting into the periplasm are then pinched off from the yolk system (Takesue *et al.*, 1980) and approximately 10-20 hrs of oviposition a uniform blastoderm appears (stage 3) (Kawamura, 1978).

3. Germ band and Amnion formation:

The cells which form the blastoderm are alike. About 20 hrs of oviposition, part of blastodermal cell divides asynchronously several times and become thicker and cuboidal in appearance on the ventral side. These cells changes gradually from cuboidal to cylindrical and then become distinguishable from the other part called germ band or germinal cord (stage 4). The yolk membrane forms enfolding during the late germ band stage. Afterwards, yolk system is divided into many masses, each enclosing one or several nuclei and yolk organelles. This process is known as yolk segmentation (Miya, 1984).

Parallel to the major axis of the germ band, an envelop like structure appears from both side and partly covers the germ band. These are amniotic folds. Amniotic fold consists of two layers (inner and outer) and grows inwards, towards each other and finally reaches to the centre of the germ band. The outer layer of the fold extends from all the sides and meets to form the serosa, which covers entire surface of the egg. The inner layer of the folds meets and unite in the thick portion of the blastoderm to form amnion. The cavity formed by the two amniotic folds in which germ band lies are known as amniotic cavity. The thick portion of the blastoderm covered by amnion develops into embryo. These steps have been reported to occur predominantly (Takami *et al.*, 1966; Takami, 1969; Ohtsuki, 1979) in *B. mori* eggs.

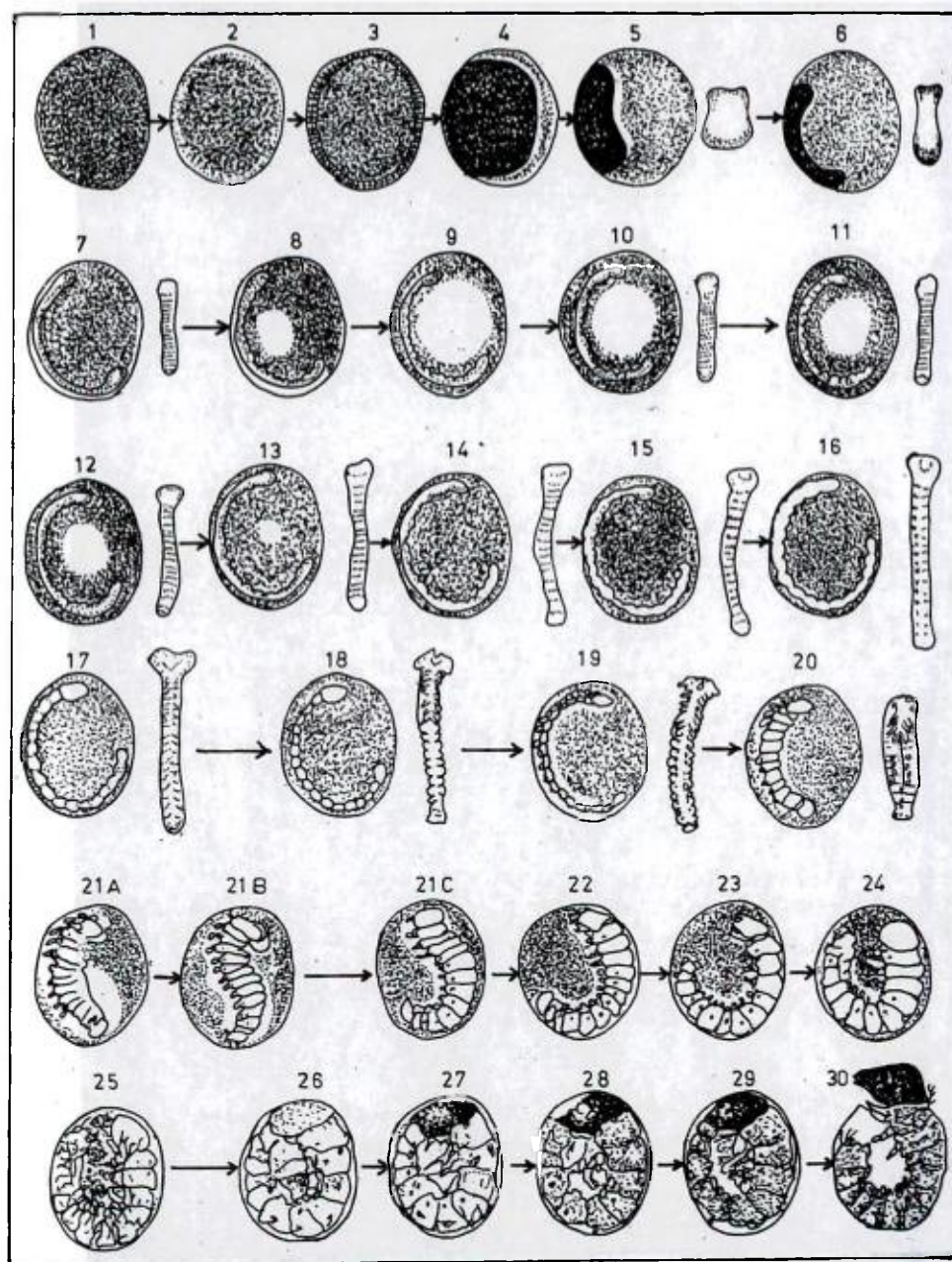


Fig. 1. Embryonic development in mulberry silkworm *Bombyx mori*.

Fig. 1. Développement embryonnaire du ver à soie mûrier, *Bombyx mori*.

4. Organogenesis:

A long and narrow depression (primitive groove) in the middle on the ventral side of the germ band is formed (stage 5). The primitive groove invaginates deeper and deeper and the tips of invaginations are brought together covering the groove. After completion of covering, the groove cannot be seen externally except leaving a small aperture (blastopore) on the head. Beneath this primitive groove, a group of spherical cells are found which leads to the formation of mesoderm or endomesoderm.

The ventral plate which is an elliptic disc at the end of 24 hrs of oviposition changes into spoon-shape at the end of 35 hrs and become enlarged (stage 6). Afterwards, the germ band sinks into yolk and primary yolk cells are formed by divisions of yolk cells, which later lead to the formation of secondary yolk cells. The anterior end of spoon (swollen part at the head region) is called 'procephalic' or 'protocephalic' lobe and that at the tail end is 'caudal lobe'. At this stage, mesoderm becomes morphologically distinguishable from the ectoderm.

At the end of approximately 2 days of oviposition, neural groove appears in embryos (stage 16, non-diapause). Appendages development in gnathal and thoracic regions starts at the very next stage (stage 17). After three days of oviposition, abdominal limb buds are formed from third to sixth abdominal segments (stage 18). Paired gonad analages also appears at the same time. Next stage of development indicates beginning of embryo shortening (stage 19), invagination of spiracles and silk glands besides formation of strand like gonad analages. After four days of oviposition, the head and thorax becomes differentiated (stage 20), with the grouping of gnathal appendages.

The anterior six segment of embryo fuse together to form the head. During fusion, two segments disappears and thus leaving four in the head region. Thoracic appendages develop into three segmented legs. In the abdominal region, except the five pairs of appendages which persists later in the larva, remaining disappears during the course of development. Last three segments of the abdomen fuse together to form single segment and thus leaving abdomen with only nine segments. Blastokinesis begins at this stage. Actually, blastokinesis is the characteristic of all those insects whose eggs are rich in yolk and the germ band is invaginated therein. Blastokinesis occurs 4 - 5 days after oviposition. The embryo starts to move around as it seeks its correct position in the egg (stage 21A, B & C). For instance, the embryo which was in the supine position with its abdomen facing outer of the egg turns round so that its abdomen faces the inner side. This whole process is called blastokinesis. The anterior and posterior ectodermal invaginations (stomodaeum and proctodaeum) form the fore intestine and hind intestine respectively. During this stage, the embryo which was located on the ventral side of the egg moves towards the dorsal side. A similar revolution of the embryo has been reported in eggs of various insects (Yokoyama, 1963).

After blastokinesis, histogenesis proceeds actively and continues till the larva hatches. The first embryonic moult takes place just after blastokinesis immediately followed by second moult, after which the larval cuticle is secreted (Ohtsuki *et al.*, 1976) (stage 24). After blastokinesis various organs are gradually formed and the eggs hatch about 5 days later. The number of embryonic segments in *B. mori* is reported to be 18 (Yamashita & Yaginuma, 1991). Of these, four anterior segments form the head, three segments form the thorax and the other eleven segments form the abdomen.

Mesodermal cells form four pairs of appendages on the head region and three pairs on the thoracic region. Besides these seven pairs of appendages, the mesodermic cells also form one pair of appendages on each of the eleven abdominal segments. Of these eleven pairs of appendages on the abdominal region, only 3rd, 4th, 5th, 6th and 11th abdominal segments appendages develop further and remaining six pairs disappear during the course of development (stage 18).

Antenna, skin, mouth parts, thoracic leg, abdominal leg, caudal leg, silk gland and other dermal glands besides fore and hind intestine, nervous system, trachae, sense organs, malphigian tube and external genitalia are formed from ectodermic cells, while internal genitalia, muscles, dorsal vessels, sub-oesophageal gland, corpuscles, pericardial cells, fat tissues originate from mesoderm.

In diapausing embryos, cell division is arrested and embryogenesis ceases immediately after formation of the cephalic lobe and segmentation of mesoderm (Kitazawa *et al.*, 1963) (stage 7). Yolk cells and yolk granules change their shape and properties as a part of diapause process (Miya *et al.*, 1972). The most striking feature of the diapausing eggs is the dark colouration of serosal cells due to the formation of ommochrome pigment (Koga & Osanai, 1967). When diapause is terminated (stage 15), embryogenesis resumes and follows the pattern as in non-diapause eggs.

In non-diapausing eggs, organogenesis begins 2-3 days after oviposition. At stage 6, the development rate in diapausing eggs become slower than in non-diapausing eggs. Hence, stage 8-15 are absent in non-diapausing eggs and all other stages of development in both the cases are similar (Takami, 1972). Further, in diapausing eggs, stage of development from 16 onwards is delayed approximately one day in comparison to non-diapausing eggs.

5. Respiration through the egg shell:

Respiration is a fundamental biological phenomenon necessary for the maintenance of biochemical reactions which are the characteristic of the living systems. The gas exchange process is passive and is based upon diffusion governed by coefficient and relative partial pressure of oxygen on either side of the egg shell (Mill, 1985).

Respiratory canals are funnel shaped tubes which becomes narrower as it enters inward. These respiratory canals are aeropyles and are responsible for gas exchange process during embryogenesis. These aeropyles are tiny holes transversing relatively thick chorion and conducting the ambient air directly to the trabecular layer and from there to the oocyte. These aeropyles functions during embryogenesis in gas exchange as per Bernoulli Velocity Gradients theory (Vogel & Bretz, 1972). The aeropyles are distributed in large numbers over the entire surface of the egg except around the micropyle. Structurally, the aeropyle openings are somehow elevated (Margaritis, 1985) and serves as a passage for the ambient air to the internal trabecular layer for both storage and immediate consumption.

Oxygen moves within the trabecular layer and cross the inner layers (endochorion and vitelline membrane) and reaches to the developing oocyte. The inner membranes are structurally porous, so that the oxygen can pass through, where the metabolic processes are taking place. Moreover, if the ambient environment is poor in oxygen, having a partial pressure lower than that within the embryo, it may prove fatal for the development. Carbon dioxide is driven easily from inside, since its partial pressure in the environment is virtually zero (Margaritis, 1985).

Since, the oxygen and carbon dioxide molecules are bigger than the water molecules, it was not possible for biological systems to evolve a kind of membrane which would be permeable only to oxygen and carbon dioxide but not to water (Hinton, 1969). Hence, the loss in water content during embryogenesis can not be ruled out.

A number of workers have described the phenomenon of gradual loss in weight of fertilized eggs during the course of their embryonic development (Shamachary & Jolly, 1985; Mathur & Singh, 1990). Therefore, the weight of silkworm eggs is not a constant factor during the course of development. The maximum loss in weight of eggs have been reported on the day of hatching (Mathur & Singh, 1990). The loss in weight of eggs in the course of embryogenesis is partly due to the exhalation of carbon dioxide and partly due to the loss in moisture content (Shamachary & Jolly, 1985). The difference in egg weight is also due to energy loss during embryogenesis (Tazima, 1978).

6. Metabolic changes during embryogenesis:

The information relating to biochemical events occurring during embryogenesis provides crucial understanding of the chemical aspects of embryology (Singh & Samson, 1999). Newly laid eggs of silkworm are composed of proteins (~10%), lipids (~8.5%), glycogen (~2.5%), chorion (~18%) and water (~60%) (Yamashita & Irie, 1980). More than 95% of the total protein is yolk protein: vitellin (~40%), 30 kDa protein (~35%) and egg-specific protein (ESP) (~20%). These proteins are quite

different from each other in their physiochemical and biological properties (Zhu *et al.*, 1986). Each protein exhibits a unique profile of degradation during embryogenesis, i. e.:

- Vitellin degradation occurred only at the later stage of embryogenesis and about 40% of the initial amounts remained unutilized in hatched larvae (Irie & Yamashita, 1980).

- Egg-specific protein is utilized early and completely disappeared by the time of hatching. ESP is degraded during embryogenesis by a process called hydrolysis catalyzed by trypsin like seryl protease and alters the carboxyl site of Lys114 and Arginine210 of ESP (Indrasith *et al.*, 1988). Therefore, the utilization of ESP is a programmed event correlated with embryogenesis.

- 30 kDa proteins are less utilized during embryogenesis (Zhu *et al.*, 1986). The second major component of egg is lipid (~ 8.5%), which is composed of triacylglycerols (~ 80%) and phospholipids (~ 20%). Other constituents such as free fatty acids, mono and di-glycerides are usually present in small quantities (Chen, 1971). Most of the metabolic energy (approximately 70% of the total energy) utilized during embryogenesis is derived from the oxidation of triacylglycerol. Phospholipids are distributed as major component of yolk protein and are used for the formation of embryonic cells. Kim *et al.* (1981) stated that the concentration of lipid is higher in diapausing silkworm eggs than in non-diapausing eggs. Chino (1958) reported that lipid is the major component consumed during diapause. Hence, lipid is used as an energy source during both diapause and post-diapause development (Nakasone, 1979).

Glycogen in silkworm eggs undergoes dramatic changes during diapause (Yamashita *et al.*, 1981; Yamashita & Hasegawa, 1985). Glycogen content is almost twice as high in newly oviposited diapause eggs as in non-diapause eggs (Chino, 1957; Yamashita *et al.*, 1981). At the initiation of diapause, glycogen is reported to decrease rapidly as it is transformed into sorbitol and glycerol (Chino, 1958; Yaginuma & Yamashita, 1979). In non-diapause eggs, the sorbitol content increased on 2nd day after oviposition and then decreased rapidly (Furasawa & Yang, 1987). Accumulation of sorbitol appears to occur at a specific embryonic stage (Yaginuma *et al.*, 1990).

The sequence of major physiological events occurring in *B. mori* eggs till the establishment of diapause at optimum temperature is as follows:

- **One day after oviposition**

- Optimum age for HCl treatment to block diapause initiation, beginning of ommochrome formation in serosal cells.

- Beginning of glycogen decrease and maximum glycogen consumption (Chino, 1957, 1958).

- **Two days after oviposition:**

- Steep decline in oxygen consumption (Chino, 1958).

- Abrupt increase of glycogen phosphorylase - a activity (Yamashita *et al.*, 1975) following gradual decrease.

- Decline in affinity of lysosomes in embryonic cells to acridine orange with supra-vital staining. The affinity is lost during diapause (Okada, 1970b).

- Arrest of increase in DNA content (Kurata *et al.*, 1980).

- **Three days after oviposition:**

- Arrest of nucleic acid synthetic activity in nuclei of embryonic cells and gradual decrease in yolk cells in-vitro (Park & Yoshitake, 1970)

- **Four days after oviposition:**

- Arrest of mitotic activity in embryo (Kitazawa *et al.*, 1963; Okada, 1970a).

- Continued steep decline in glycogen content and gradual accumulation of sorbitol and glycerol respectively (Yaginuma & Yamashita, 1977).

REFERENCES

- AKAI H. (1958) Observation of the micropyle region of the chorion in the silkworm, *Bombyx mori* L. Acta Sericol., 26, 19-21.
- AKUTSU S., YOSHITAKE N. (1977) Electron microscopic observation on the vitelline membrane formation in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn., 46, 509-514.
- BALINSKY B. I. (1981) An Introduction to Embryology – Saunders College, Philadelphia.
- BOROVSKY D., VAN-HANDEL E. (1980) Synthesis of ovary specific proteins in mosquitoes. Intl. J. Invertebr. Reprod., 2, 153-164.
- BOSWELL R. E., MAHOWALD A. P. (1985) Cytoplasmic determinants in embryogenesis. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. I., pp. 387-405., Pergamon Press, Oxford.
- CHEN P. S. (1971) Biochemical Aspects of Insect Development. S. Karger, Basel, Switzerland.
- CHINO H. (1957) Carbohydrate metabolism in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* L. Diapause and changes of glycogen content. Embryologia, 3, 295-316.
- CHINO H. (1958) Carbohydrate metabolism in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* L. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. Insect Physiol., 2, 1-12.
- ENGLEMANN F. (1970) The Physiology of Insect Reproduction. Pergamon Press, Oxford.
- FURASAWA T., YANG, WON-JIN (1987) Fluctuations of free sugars with embryonic developments of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn., 56, 143-149.
- HINTON H. E. (1969) Respiratory system of insect egg shells. Annu. Rev. Ent., 14, 343-368.
- HINTON H. E. (1970) Insect egg shell. Sci. Amer., 14, 343-368.
- HINTON H. E. (1981) Biology of insect eggs. Pergamon Press, Oxford.
- INDRASITH L. S., SASAKI T., YAMASHITA O. (1988) A unique protease responsible for selective degradation of yolk protein in *Bombyx mori* – Purification, characterization and cleavage profiles. J. Biol. Chem. 263, 1045-1051.
- IRIE K., YAMASHITA O. (1980) Changes in vitellin and other yolk proteins during embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol., 26, 811-817.
- JURA C. (1972) Development of apterygote insects. In Developmental Systems – Insects, eds. Counce, S. J. and Waddington, C. H., Vol. I. PP. 49-94, Academic Press, London and New York.
- KANADA T., MATSUMURA H., OHTSUKI Y. (1974) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) egg. I. Fine structure of micropyle apparatus. J. Sericult. Sci. Jpn., 43, 379-383.
- KAWAGUCHI Y., XU M.-K., BANNO Y., KOGA K., KAWARABATA T., DOIRA H. (1996) Egg shell architecture in the wild silk moth, *Bombyx mandarina* inhibiting China. Sericologia, 36(4), 609-618.
- KITAZAWA T., KANADA T., TAKAMI T. (1963) Changes in the mitotic activity in the silkworm eggs in relation to diapause. Bull. Sericult. Exp. Stn., 18, 283-295.
- KIM S. E., SHIKATA M., AKAI H. (1981) Egg-shell lipids in relation to water evaporation and diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn., 50, 94-100.
- KOGA N., OSANAI M. (1967) Der Gehalt an Tryptophan, Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und Ommochromen bei den überwinternden Eiern des Seidenspinners *Bombyx mori*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 979-982.
- KURATA S., YAGINUMA T., KOBAYASHI Y., KOGA K., SAKAGUCHI B. (1980) DNA content and cell number during embryogenesis of *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Jpn., 49, 107-110.
- LINZEN B. (1974) The tryptophan-ommochrome pathway in insects. Adv. Insect Physiol., 10, 117-246.
- MARGARITIS L. H. (1985) Structure and physiology of egg shell. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. I., pp. 153-230, Pergamon Press, Oxford.
- MATHUR S. K., SINGH T. (1990) Abnormal eclosion in silkworm, *Bombyx mori*. Indian Text. J., 100(9), 150-151.
- MATSUZAKI M. (1968) Electron microscopic studies on the chorion formation of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn., 37, 383-490.

- MAZUR G. D., REGIER J. C., KAFATOS F. C. (1982) Orders and defects in the silkworm chorion, a biological analogue of a cholesteric liquid crystal. In *Insect Ultra-structure*, Vol. I, eds. Akai, H., and King, R. C., pp. 150-185. Plenum Press, New York.
- MILL P. J. (1985) Structure and physiology of respiratory system. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. III., pp. 518-593, Pergamon Press, Oxford.
- MIYA K. (1978) Electron microscopic studies on the early embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Architecture of the newly laid eggs and the changes by sperm entry. *J. Fac. Agric. Iwate Univ., Jpn.*, 14, 11-35.
- MIYA K. (1984) Early embryogenesis of *Bombyx mori*. In *Insect Ultra-structure*, Vol. II, eds. Akai, H. and King, R. C., pp. 49-72, Plenum Press, New York.
- MIYA K., KURIHARA M., TANIMURA I. (1972) Changes in the fine structure of the serosa cell and yolk cell during diapause and post-diapause development in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Fac. Agric. Iwate Univ. Jpn.*, 8, 51-87.
- NAKADA T. (1932) The resistance of silkworm embryo to abnormal high temperature and dryness on the external morphology of the embryo. *Bull. Fukuoka Sericult. Expt. Stn.*, 1, 1-26.
- NAKASONE S. (1979) Changes in lipid components during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 48, 526-532.
- OHTSUKI Y. (1979) Silkworm eggs. In 'A General Text Book of Sericulture', edited Sericultural Society of Japan, pp. 156-173, Nihon Sanshi Shinbun-sha, Tokyo, Japan.
- OHTSUKI Y., KANADA T., MATSUMURA H. (1977) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) eggs. II. Characteristics of different areas of egg surface. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 46, 45-50.
- OHTSUKI Y., MURAKAMI A. (1968) Nuclear division in the early embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Zool. Mag.*, 77, 383-387.
- OHTSUKI Y., MORI S., KANADA T., KITAZAWA T. (1976) Morphological observation on the embryonic moult in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 45, 225-237.
- OKADA M. (1970a) Electron microscopic studies on diapause embryos of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku Sect B.*, 14, 95-111.
- OKADA M. (1970b) Changes in affinity of lysosomes to acridine orange during diapause and development of embryos of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Zool. Mag.*, 79, 204-210.
- PARK K. E., YOSHITAKE N. (1970) A radio autographic study of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 16, 1655-1663.
- REGIER J. C., KAFATOS F. C. (1985) Molecular aspects of chorion formation. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. I., pp. 113-151, Pergamon Press, Oxford.
- REGIER J. C., MAZUR G. D., KAFATOS F. C. (1980) The silk moth chorion: Morphological and biochemical characterization of four surface regions. *Devel. Biol.*, 76, 286-304.
- ROCKSTEIN M. (1974) The insect and external environment. In: *The Physiology of Insects* – Vol. II, Academic Press, New York.
- SALT R. W. (1961) Principles of cold hardiness. *Annu. Rev. Ent.*, 6, 55-74.
- SANDER K., GUTZEIT H. O., JACKLE H. (1985) Insect embryogenesis: Morphology, Physiology and Molecular aspects. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. I., pp. 321-385, Pergamon Press, Oxford.
- SHAPIRO B. M., SCHACKMANN R. W., GABEL C. A. (1981) Molecular approaches to the study of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 815-843.
- SHAMACHARY, JOLLY M. S. (1985) Observations on the pattern of diapause in three silkworm breeds of *Bombyx mori* (L). *Indian J. Seric.*, 24(2), 83-84.
- SINGH T., SAMSON M. V. (1999) Embryonic diapause and metabolic changes during embryogenesis in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric.*, 7(1&2), 1-11.
- SONOBE H., MAOTANI K., NAKAJIMA H. (1986) Studies on embryonic diapause in the PND mutant of the silkworm, *Bombyx mori* – Genetic control of embryogenesis. *J. Insect Physiol.*, 32, 215-220.

- TAKAMI T. (1946) Experimental studies on the embryo formation in *Bombyx mori*. V. Presumptive mesodermal and neural regions of the eggs. Seibutu, 1, 208-211.
- TAKAMI T. (1969) 'A General Text Book of the Silkworm Eggs'. Zenkoku Sanshu Kyokai, Tokyo, Japan.
- TAKAMI T. (1972) In-vitro: Development of insect embryos. In Invertebrate Tissue Culture, ed. Vago, C., Vol. II., pp. 137-159, Academic Press, New York and London.
- TAKAMI T., KITAZAWA T. (1960) External observation of embryonic development in the silkworm. Sanshi Shikenjo, Hokoku, Sericult. Expt. Stn. Tech. Bull., 75, 1-31.
- TAKAMI T., TOTANI K., SUGIYAMA H., KITAZAWA T., KANADA T. (1966) Embryonic growth of the silkworm, *Bombyx mori* (L) at the early post-diapause stage with special reference to the connection between the growth and nuclear division. Bull. Sericult. Expt. Stn., 20, 57-69.
- TAKESUE S., KEINO H., ONITAKE K. (1980) Blastoderm formation in the silkworm eggs (*Bombyx mori* L.). J. Embryol. Exp. Morphol., 60, 117-124.
- TAZIMA Y. (1964) 'The Genetics of silkworm'. Logos Press, London.
- TAZIMA Y. (1978) 'Silkworm Egg' - Published by Central Silk Board, India.
- TELFER W. H., SMITH D. S. (1970) Aspects of egg formation. Symp. R. Ent. Soc. London, 5, 117-134.
- TOYAMA K. (1902) Contribution to the study of silkworm. I. On the embryology of the silkworm. Bull. Coll. Agric. Tokyo. Imp. Univ., 5, 73-118.
- VOGEL S., BRETZ W. L. (1972) Interfacial organisms - passive ventilation in the velocity gradients near surfaces. Science, 175, 210-211.
- WILDE-DE J., LOOF-DE A. (1973) Reproduction - In 'The Physiology of Insects', ed. Rockstein, M., pp. 11-95, Academic Press, New York.
- YAGINUMA T., YAMASHITA O. (1977) Changes in glycogen, sorbitol and glycerol content during diapause of the silkworm eggs. J. Sericult. Sci. Jpn., 46, 5-10.
- YAGINUMA T., YAMASHITA O. (1979) NAD-dependent sorbitol dehydrogenase activity in relation to the termination of diapause in eggs of *Bombyx mori*. Insect Biochem., 9, 547-553.
- YAGINUMA T., KOBAYASHI M., YAMASHITA O. (1990) Effects of low temperatures on NAD-sorbitol dehydrogenase activity and morphogenesis in non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol., 97B(3), 495-506.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K. (1985) Embryonic Diapause. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I., Vol. I., pp. 407-434, Pergamon Press, Oxford.
- YAMASHITA O., IRIE K. (1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in the male hosts of the silkworm. Nature, 283, 385-386.
- YAMASHITA O., SUZUKI K., HASEGAWA K. (1975) Glycogen phosphorylase activity in relation to diapause initiation in *Bombyx mori* eggs. Insect Biochem., 5, 707-718.
- YAMASHITA O., YAGINUMA T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures: Implications for sericulture. In 'Insects at Low Temperature', eds. Lee, R. E. and Denlinger, D. L., pp. 424-445, Chapman and Hall, New York.
- YAMASHITA O., YAGINUMA T., HASEGAWA K. (1981) Hormonal and metabolic control of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Ent. Gen., 7, 195-211.
- YOKOYAMA T. (1963) 'Sericulture' - Annu. Rev. Ent., 8, 287-306.
- ZHU J., INDRASITH L. S., YAMASHITA O. (1986) Characterization of vitellin, egg specific protein and 30 kDa proteins from *Bombyx mori* eggs and fates during oogenesis and embryogenesis. Biochem. Biophys. Acta., 882, 427-436.

STRUCTURE ET DEVELOPPEMENT DE L'ŒUF DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI*)

TRIBHUWAN SINGH*, VIJAYALAKSHMI RAO, A. H. JINGADE & M. V. SAMSON*

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram – Post, Kodathi, Bangalore – 560 035, Inde.

*Les œufs du ver à soie **Bombyx mori** présentent une perte progressive de poids au cours de leur développement. La genèse de la descendance à l'intérieur de la coque de l'œuf (enveloppe de l'ovocyte qui est une structure complexe, à couches multiples, multi-régionale et supra-moléculaire) atteint sans dommage les stades de clivage, blastoderme, bande germinative et amnios, suivis par l'histogenèse et l'organogenèse.*

Les protéines, les lipides et le glycogène associés en proportions spécifiques dans les œufs fraîchement pondus sont utilisés de manières différentes au cours du développement embryonnaire.

*L'étude actuelle se propose de présenter rapidement les principales étapes structurelles et de développement chez les œufs du ver à soie (**Bombyx mori**) et les changements métaboliques associés au développement embryonnaire, qui peuvent avoir un certain intérêt pour les embryologistes quand ils étudient l'embryogenèse chez les vers à soie tropicaux.*

INTRODUCTION

La structure de l'œuf détermine le type de développement (Boswell et Mahowald, 1985). La structure et le développement des œufs de divers insectes ont été décrits par de nombreux chercheurs (Engelmann, 1970 ; Jura, 1972 ; Balinsky, 1981). La première étude détaillée sur le développement (embryogenèse) de l'œuf du ver à soie *Bombyx mori* a été réalisée par Toyama (1902). Depuis, les études embryologiques se sont surtout proposées de résoudre des problèmes pratiques tels que l'identification des étapes adaptées à la réfrigération des embryons précoces et l'observation du début, du développement et de la fin de la diapause afin de mettre au point un système efficace de stockage au froid à long terme des œufs de vers à soie.

Takami (1969) a été apparemment le premier à publier une revue sur l'embryogenèse du ver à soie, *Bombyx mori*. Ces études ont décrit les changements morphologiques qui se produisent pendant les différents stades embryonnaires chez *B. mori* (Nakada, 1932 ; Takami & Kitazawa, 1960). Dans ces études, les changements morphologiques des embryons sont utilisés pour évaluer leur survie à long terme. De plus, la tolérance des œufs au stockage au froid varie non seulement en fonction du stade de développement embryonnaire mais aussi en fonction des génotypes en raison du phénomène d'adaptation, des changements métaboliques et aussi des variations génétiques, etc... (Salt, 1961 ; Rockstein, 1974 ; Sander et coll., 1985 & Sonobe et coll., 1986) et donc les études récentes sur les œufs de vers à soie concernent plus la physiologie, la biochimie et l'activité métabolique, qui ont lieu à la fin de la diapause, (Yaginuma et coll., 1990 ; Yamashita & Yaginuma, 1991) afin de promouvoir une manipulation efficace.

* Central Silk Board, 6th Floor, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore – 560 068, Inde.

Dans cette étude, nous avons essayé de passer brièvement en revue l'information disponible sur la structure et le développement des œufs de *Bombyx mori* afin de fournir un aperçu sur l'embryogenèse et les diverses étapes qu'elle comprend.

STRUCTURE DE L'ŒUF

1. Forme, taille et couleur :

Takami (1946) a signalé que l'œuf de ver à soie, *Bombyx mori* est court, sphéroïde, légèrement aplati à l'extrémité antérieure, où est situé le micropyle, et aplati latéralement. La forme de l'œuf dépend entièrement de la forme du chorion, qui se forme dans le corps de la mère. Ainsi, la forme de l'œuf est un héritage pseudo-maternel.

Cependant, la taille et le poids des œufs varient d'une lignée à l'autre, d'une ponte à l'autre et même d'une saison à l'autre, mais il fait environ 1,30 mm de long, 1 mm de large et 0,6 mm d'épaisseur (Miya, 1984), avec un poids de 0,5 mg et une densité d'environ 1,075. Les premiers œufs pondus par le papillon sont plus lourds que ceux qui sont pondus après. Le poids de l'œuf change en fonction des conditions environnementales et même les œufs du même génotype montrent des variations de poids dues aux différences de conditions d'élevage.

A part quelques exceptions (œufs blancs et rouges), les œufs de *Bombyx mori* sont en général de couleur jaune marron. Généralement les œufs de couleur foncée sont courants chez les races japonaises, tandis que les œufs des races chinoises sont en général de couleur claire. En principe, le chorion est sans couleur et semi-transparent, ce qui permet d'observer facilement la couleur du vitellus au travers de la coque des œufs venant d'être pondus. Le vitellus est normalement de couleur jaune clair mais chez certains génotypes il est jaune foncé. La couleur du vitellus dépend du génotype maternel, et a une relation étroite avec la couleur de l'hémolymphe et la couleur du cocon du papillon mère (Tazima, 1964).

La couleur de l'œuf est aussi due à la couleur des cellules de la séreuse. Le pigment présent dans les cellules de la séreuse est attribué au tryptophane. Le circuit du tryptophane à l'ommochrome a été étudié en détail par Linzen (1974). En général, le pigment se forme selon une série d'étapes dans l'ordre : tryptophane $\rightarrow$ α Oxytryptophane $\rightarrow$ Formylcynurénine $\rightarrow$ cynurénine $\rightarrow$ 3 hydroxycynurénine $\rightarrow$ ommochrome (pigment).

La tryptophane-oxygénase, la cinurénine-formidase, la cinuréninase, la cynurénine 3 hydroxylase participent à cette série de réactions. Les œufs dans lesquels il n'y a pas de formation de pigment indiquent une absence de ces enzymes qui donnent des œufs jaunes ou blancs (Koga et Osanai, 1967).

Les œufs reçoivent une substance collante du papillon pendant l'oviposition pour adhérer au substrat / au carton de ponte. La substance collante est sécrétée par la glande sébifique ou la glande accessoire qui débouche sur le vestibulum.

2. Coque de l'œuf (chorion) :

Une nouvelle génération débute au moment de la fécondation d'un ovocyte par un sperme approprié. Après la fécondation, une série de changements structuraux et biochimiques bien définis se produisent à l'intérieur de l'ovocyte, qui entraînent la genèse de la descendance (Margaritis, 1985). Pour que ces processus aient lieu sans dommage, l'œuf doit être enfermé dans une entité qui permette à l'embryogenèse de se réaliser sans problème. A cet effet, l'enveloppe de l'ovocyte que l'on désigne couramment sous le nom de coque de l'œuf (membrane vitelline et chorion), joue un rôle majeur. La fonction physiologique du chorion est :

- De permettre la pénétration du sperme dans l'œuf (Hinton, 1981).
- De protéger l'ovocyte contre des conditions environnementales défavorables telles que les températures extrêmes, l'humidité élevée, la sécheresse (Yamashita & Hasegawa, 1985) et des attaques de pathogènes (Hinton, 1981).

- D'apporter une quantité adéquate d'oxygène pour toutes les réactions biochimiques qui se produisent à l'intérieur des embryons en développement et en même temps de se débarrasser du gaz carbonique (Mazur et coll., 1982).

- D'offrir une élasticité pour une ponte facile et de faciliter l'éclosion à la fin de l'embryogenèse.

On peut distinguer quatre zones différenciées spatialement sur la coque de l'œuf de l'insecte ou le chorion chez *B. mori* : la zone du pôle antérieur (ou se situe la zone spécialisée pour l'entrée du sperme), la zone du pôle postérieur, les zones ventrale et dorsale et la zone latérale aplatie (Kawaguchi et coll., 1996). La coque de l'œuf a une structure très complexe, à plusieurs couches, plusieurs régions et est supra-moléculaire. Il y a trois couches principales dans la coque de l'œuf de n'importe quel insecte : la membrane vitelline, l'endochorion et l'exochorion. Les principaux acides aminés que l'on observe dans le chorion de l'œuf sont présentés dans le Tableau I.

La coque de l'œuf est produite par les cellules épithéliales folliculaires mésodermes qui sont des parties du follicule. Chaque follicule est une unité à l'intérieur de la paire d'ovaires. Chez *Bombyx mori*, l'ovaire est de type méroïstique polytrophique. Il y a 4 ovarioles dans chaque ovaire et elles ressemblent à un ressort hélicoïdal avec des perles contenant des œufs. Chaque ovariole contient approximativement 50 à 60 follicules à divers stades de l'ovogénèse. La formation de la coquille d'œuf est un processus progressif qui comprend certaines activités cellulaires. De telles activités ont été reconnues et analysées morphologiquement et biochimiquement chez *Antheraea polyphemus* et *Bombyx mori* (Regier & Kafatos, 1985 ; Regier et coll., 1980).

La synthèse du chorion commence avec la formation d'une "couche trabéculaire" sur le côté externe de la membrane vitelline, avec la libération de micro-particules à partir de l'épithélium folliculaire (Matsuzaki, 1968). La couche trabéculaire est recouverte de plusieurs couches de lamelles fibrillaires disposées de manière hélicoïdale. La zone externe de l'œuf contient une couche "osmophile unique" avec 15 à 20 lamelles et un micropyle très étroit. Les corps endoplasmiques réticulaires à la surface rugueuse et les corps de golgi augmentent en nombre au dernier stade de la formation de la couche interne et sont dispersés sur tout le cytoplasme des cellules folliculaires. La couche moyenne du chorion est formée par des granules sécréteurs qui sont reconnus dans les zones de golgi. La couche moyenne du chorion est constituée d'éléments fibreux nombreux qui semblent être transformés à partir des granules sécréteurs. Des changements dégénératifs remarquables ont lieu dans les composants des cellules du follicule après la formation du chorion.

Des études détaillées sur la synthèse du chorion dans les œufs de *B. mori* ont été publiées par de nombreux chercheurs (Ohtsuki et coll., 1977 ; Miya, 1978) et ont été passées en revue par Mazur et coll., 1982.

3. Micropyle et membrane vitelline :

La surface de la zone du micropyle présente un dessin en forme de pétales avec l'ouverture des canaux du micropyle au centre. Les canaux du micropyle sont normalement au nombre de 3 à 4 mais dans certains cas on en a observé 6 à 8 (Kanada et coll., 1974 ; Ohtsuki, 1979). Chaque canal du micropyle peut être divisé en deux parties – un tube pénétrant le chorion et une protrusion reliant le tube à la membrane vitelline (Akai, 1958). Le premier est désigné comme "ectomicropyle" et l'autre comme "entomicropyle". En plus du micropyle, il y a environ 5000 à 10 000 minuscules pores à la surface de l'œuf. Ces pores permettent à l'air d'entrer pour répondre à la demande en oxygène pendant le développement embryonnaire.

En-dessous du chorion, on trouve une très fine membrane vitelline qui entoure la sereuse et le fluide semi-liquide (le vitellus) qui remplit les œufs. La membrane vitelline est sécrétée de manière uniforme et sa formation commence après la dégénération des cellules nourricières, c'est à dire au moment où l'ovocyte occupe presque toute la chambre de l'œuf (Telfer & Smith, 1970). La membrane vitelline est composée d'une couche externe dense aux électrons et d'une couche interne contenant des granules de forme irrégulière et de taille variée denses aux électrons (Akutsu & Yoshitake, 1977 ; Miya, 1978).

DEVELOPPEMENT DE L'ŒUF (EMBRYOGENESE)

Les différents stades de développement des œufs sont présentés dans la figure 1 (étapes 1 à 30).

1. Fécondation :

La fécondation est un événement qui sauve le spermatozoïde et l'ovule d'une mort certaine, avec l'union de deux gamètes agissant comme un tremplin de lancement d'un nouvel individu dans le futur (Shapiro et coll., 1981). Quand les papillons mâle et femelle de *Bombyx mori* s'accouplent, il y a une éjaculation et de nombreux spermatozoïdes entrent dans la *Bursa copulatrix* de l'organe de reproduction du papillon femelle. Le sperme atteint la partie inférieure de l'ovipositeur par le *Ductus seminalis*, le *Ductus tortuosus* et le *Receptaculum seminis* et attend qu'un œuf descende du tube ovarien. Juste avant la descente de l'œuf, le spermatozoïde y entre par le micropyle.

L'œuf mûr du ver à soie (*Bombyx mori*) est entouré par deux couches : la membrane vitelline et le chorion (Margaritis, 1985 ; Regier & Kafatos, 1985). Le chorion est constitué de deux couches — la couche externe et la couche interne. La couche interne et la partie intérieure de la couche externe sont mécaniquement souples et pliables, tandis que la partie externe de la couche externe est mécaniquement rigide (Wilde & Loof, 1973). La caractéristique morphologique du chorion qui permet la pénétration du sperme est le système du micropyle, situé sur le pôle antérieur de l'œuf. De plus, l'organisation morphologique des couches chorioniques est fortement modifiée dans la zone du micropyle (Wilde & Loof, 1973).

La première division de maturation (réduction) se produit juste avant la ponte et finit 5 à 6 minutes après la ponte des œufs. Ainsi, les noyaux des œufs venant d'être pondus sont au stade de l'anaphase, la première division de réduction. Le noyau femelle se divise en deux, l'un des deux est éliminé sous la membrane vitelline (le premier globule polaire). Celui qui reste se divise à nouveau en deux et l'un des deux est à nouveau éliminé (deuxième globule polaire). Cette deuxième division de maturation a lieu environ 60 minutes après la ponte et se termine dans les 20 minutes qui suivent, en libérant le deuxième globule polaire. Tout ce processus de division de réduction prend environ 90 à 100 minutes après la ponte (Ohtsuki & Murakami, 1968).

Dès que la division de réduction est terminée, on voit seulement un noyau dans l'œuf, qui devient un noyau femelle. Pendant la période où tous ces changements se produisent dans le noyau de l'œuf, le spermatozoïde perd sa queue. Le corps central du spermatozoïde se divise en deux et la partie antérieure gonfle jusqu'à ce qu'elle devienne un corps sphérique qui s'appelle le pronucleus mâle. Les pronuclei mâle et femelle s'unissent pour former le zygote. Ce processus est connu sous le nom de syngamie qui se termine deux heures après la ponte de l'œuf (stade 1). Ainsi, après la fertilisation le zygote reprend le nombre originel de chromosomes de l'organisme ($2n = 56$). Bien qu'il puisse y avoir plusieurs spermatozoïdes qui entrent dans l'œuf, seul l'un d'entre eux pénètre dans un ovule et fusionne avec le pronucleus femelle. Les autres dégénèrent et sont absorbés.

2. Clivage et formation du blastoderme :

Comme chez la plupart des insectes, les œufs du ver à soie (*B. mori*) subissent aussi un clivage superficiel. Le contenu des œufs se divise en deux parties — le protoplasme et l'endoplasme. Le protoplasme forme un réticulum qui se répand à la surface de l'œuf et forme une couche de liaison en-dessous de la membrane vitelline. C'est le périplasme qui est complètement exempt de vitellus. L'endoplasme (le vitellus), qui occupe la partie centrale de l'œuf, est contenu dans le réticulum protoplasmique. Le noyau du zygote forme de nombreux noyaux par divisions mitotiques synchrones, qui ont lieu approximativement 10 fois dans les 10 heures qui suivent la ponte (Ohtsuki & Murakami, 1968 ; Miya, 1984) (étape 2). Après, un cercle clair de microtubules apparaît autour des noyaux de clivage. Takesue et coll., (1980) ont suggéré que ces microtubules sont responsables du mouvement des noyaux de clivage vers la surface de l'œuf.

Ces noyaux qui se divisent entourés par le protoplasme se transforment en cellules. Par la suite, un grand nombre de ces cellules de clivage migrent vers la périphérie de l'œuf, se fondent dans le périplasme et forment une couche directement en-dessous de la membrane vitelline appelée blastoderme. Certains des noyaux de clivage ne se déplacent pas vers la périphérie mais restent et forment des vitellophages. La fonction de ces vitellophages est d'apporter des nutriments à l'embryon. Les noyaux qui se projettent dans le périplasme se séparent ensuite du système du vitellus (Takesue et coll., 1980) et approximativement 10 à 20 heures après la ponte un blastoderme uniforme apparaît (étape 3) (Kawamura, 1978).

3. Bande germinative et formation de l'amnios :

Les cellules qui forment le blastoderme sont semblables. Environ vingt heures après la ponte, une partie des cellules blastodermiques se divise de manière asynchrone plusieurs fois et devient plus épaisse et d'apparence cuboïdale sur leur côté ventral. Ces cellules passent progressivement d'une forme cuboïdale à cylindrique et deviennent ensuite distinctes d'une autre partie appelée bande germinative ou cordon germinatif (étape 4). La membrane de vitellus forme une enveloppe pendant le dernier stade de la bande germinale. Après, le système vitellaire se divise en de nombreuses masses, qui contiennent chacune un ou plusieurs noyaux et des organites. Ce processus est connu sous le nom de segmentation du vitellus (Miya, 1984).

Parallèlement à l'axe principal de la bande germinative, une structure comme une enveloppe apparaît sur les deux côtés et recouvre en partie la bande germinative. Ce sont les plis amniotiques. Le pli amniotique est constitué de deux couches (interne et externe) qui croissent à l'intérieur l'une vers l'autre, et atteignent finalement le centre de la bande germinative. La couche externe du pli s'étend de tous les côtés et se fusionne pour former la sereuse, qui couvre toute la surface de l'œuf. La couche interne des plis fusionne et s'unit à une portion épaisse du blastoderme pour former l'amnios. La cavité formée par les deux plis amniotiques où repose la bande germinale est connue sous le nom de cavité amniotique. La portion épaisse du blastoderme recouverte par l'amnios se développe en un embryon. Ces étapes se produisent principalement dans les œufs de *B. mori* (Takami et coll., 1966 ; Takamai, 1969 ; Ohtsuki, 1979).

4. Organogénèse :

Une dépression longue et étroite (sillon primitif) au milieu du côté ventral de la bande germinative se forme (étape 5). Le sillon primitif se creuse de plus en plus profondément et les bords des invaginations se rapprochent pour couvrir la dépression. Après la fin du rapprochement, on ne peut plus voir la dépression extérieurement sauf une petite ouverture (blastophore) sur la tête. En-dessous de cette dépression primitive, on trouve un groupe de cellules sphériques qui conduisent à la formation du mésoderme ou de l'endomésoderme.

La plaque ventrale qui est un disque elliptique 24 h après la ponte prend une forme de cuillère au bout de 35 hr et s'agrandit (étape 6). Puis, la bande germinative plonge dans le vitellus et les cellules primaires du vitellus se forment grâce aux divisions des cellules du vitellus, qui entraînent plus tard la formation de cellules secondaires du vitellus. L'extrémité antérieure de la cuillère (la partie renflée de la zone de la tête) s'appelle le lobe " procéphalique " ou " protocéphalique " et l'extrémité située à l'autre bout est " le lobe caudal ". A ce stade, le mésoderme devient distinct morphologiquement de l'ectoderme.

Deux jours environ après la ponte, la dépression neurale apparaît dans les embryons (étape 16, non-diapause). Le développement des appendices dans les zones gnathale et thoracique commence au stade suivant (étape 17). Trois jours après la ponte, des ébauches de membre abdominal se forment au niveau des troisième à sixième segments abdominaux (étape 18). Les analages de gonade appariés apparaissent aussi en même temps. La prochaine étape de développement indique le début du raccourcissement de l'embryon (étape 19), l'invagination des spiracles et des glandes séricigènes et

la formation d'ébauches de gonades ressemblant à des brins. Quatre jours après la ponte, la tête et le thorax se différencient (étape 20), avec le groupement des appendices gnathaux.

Les six segments antérieurs de l'embryon fusionnent pour former la tête. Pendant la fusion, deux segments disparaissent et il en reste quatre dans la zone de la tête. Les appendices thoraciques se développent en trois pattes segmentées. Dans la région abdominale, à l'exception de cinq paires d'appendices qui persistent plus tard chez la larve, les autres disparaissent au cours du développement. Les trois derniers segments de l'abdomen fusionnent pour former un segment unique et ne laissent plus qu'un abdomen avec neuf segments. La blastokinèse commence à ce stade. En fait, la blastokinèse est la caractéristique de tous les insectes dont les œufs sont riches en vitellus et dont la bande germinative est invaginée à l'intérieur. La blastokinèse se produit 4 à 5 jours après la ponte. L'embryon commence à bouger alors qu'il cherche sa position correcte dans l'œuf (étape 21A, B & C). Par exemple, l'embryon qui était dans une position allongée avec son abdomen faisant face à l'extérieur de l'œuf se retourne de manière à ce que l'abdomen soit en face du côté interne. Tout ce processus s'appelle la blastokinèse. Les invaginations antérieures et postérieures ectodermiques (stomodaeum et proctodaeum) forment respectivement l'intestin antérieur et l'intestin postérieur. Au cours de ce stade, l'embryon qui est situé sur le côté ventral de l'œuf bouge vers le côté dorsal. On a rapporté une révolution similaire de l'embryon chez les œufs d'insectes variés (Yokoyama, 1963).

Après la blastokinèse, il y a une histogénèse active qui continue jusqu'à ce que la larve éclore. La première mue embryonnaire a lieu immédiatement après la blastokinèse et est suivie par la deuxième mue, après laquelle la cuticule larvaire est sécrétée (Ohtsuki et coll., 1976) (étape 24). Après la blastokinèse, des organes variés se forment progressivement et les œufs éclosent 5 jours plus tard. On rapporte que le nombre de segments embryonnaires chez *B. mori* est de 18 (Yamashita & Yaginuma, 1991). Parmi eux, quatre segments antérieurs forment la tête, trois segments forment le thorax et les onze autres segments forment l'abdomen.

Les cellules mésodermiques forment quatre paires d'appendices sur la zone de la tête et trois paires dans la zone thoracique. En plus de ces sept paires d'appendices, les cellules mésodermiques forment aussi une paire d'appendices sur chacun des onze segments abdominaux. Sur ces onze paires d'appendices de la zone abdominale, seuls les appendices des 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} et 11^{ème} segments abdominaux se développent au-delà et les six autres paires disparaissent au cours du développement (étape 18).

Les antennes, la peau, les parties buccales, les pattes thoraciques, les pattes abdominales, les glandes séreigènes et d'autres glandes dermiques à côté de l'intestin antérieur et postérieur, le système nerveux, les trachées, les organes sensoriels, les tubes de Malpighi et les organes génitaux externes se forment à partir des cellules ectodermiques, tandis que les organes génitaux internes, les muscles, le vaisseau dorsal, la glande sub-oesophagienne, les corpuscules, les cellules péricardiques, le tissu adipeux proviennent du mésoderme.

Chez les embryons à diapause, la division cellulaire s'arrête et l'embryogenèse cesse immédiatement après la formation du lobe céphalique et la segmentation du mésoderme (Kitazawa et coll., 1963) (étape 7). Les cellules du vitellus et les granules du vitellus changent de forme et de propriétés en tant que partie intégrante du processus de diapause (Miya et coll., 1972). Le caractère le plus remarquable des œufs à diapause est la coloration foncée des cellules sérosales due à la formation du pigment ommochrome (Koga & Osanai, 1967). Quand la diapause est terminée (étape 15), l'embryogenèse reprend et suit le même modèle que chez les œufs sans diapause.

Chez les œufs sans diapause, l'organogénèse commence 2 à 3 jours après la ponte. Au stade 6, le développement des œufs à diapause devient plus lent que chez les œufs sans diapause. Ainsi, les étapes 8 à 15 sont absentes chez les œufs sans diapause et toutes les autres étapes de développement sont similaires dans les deux cas (Takami, 1972). De plus, chez les œufs à diapause, l'étape de développement no. 16 est retardée d'un jour approximativement par comparaison aux œufs sans diapause.

5. Respiration au travers de la coque de l'œuf :

La respiration est un phénomène biologique fondamental nécessaire au maintien des réactions biochimiques qui sont la caractéristique des systèmes vivants. Le processus d'échange de gaz est passif et se base sur la diffusion gouvernée par le coefficient et la pression partielle relative de l'oxygène de chaque côté de la coque de l'œuf (Mill, 1985).

Les canaux respiratoires sont des tubes en forme d'entonnoir qui deviennent plus étroits alors qu'ils arrivent à l'intérieur. Ces canaux respiratoires sont les aéroyles et sont responsables du processus de l'échange de gaz au cours de l'embryogenèse. Ces aéroyles sont des trous minuscules qui traversent un chorion relativement épais et conduisent l'air ambiant directement à la couche trabéculaire et de là jusqu'à l'ovocyte. Ces aéroyles participent à l'échange de gaz pendant l'embryogenèse d'après la théorie de Bernoulli (Voget & Bretz, 1972). Les aéroyles sont distribués en nombre important sur toute la surface de l'œuf sauf autour du micropyle. De manière structurée, les ouvertures des aéroyles sont un peu surélevées (Margaritis, 1985) et servent de passage pour l'air ambiant jusqu'à la couche trabéculaire interne à la fois pour le stockage et la consommation immédiate.

L'oxygène se déplace au travers de la couche trabéculaire et traverse les couches internes (endochorion et membrane vitelline) et atteint l'ovocyte en développement. Les membranes intérieures sont structurellement poreuses, de sorte que l'oxygène peut passer à travers, là où des processus métaboliques ont lieu. Si l'environnement ambiant est pauvre en oxygène, avec une pression partielle plus faible que celle à l'intérieur de l'embryon, cela peut s'avérer fatal pour le développement. Il est facile de rejeter le gaz carbonique de l'intérieur puisque sa pression partielle dans l'environnement est presque nulle (Margaritis, 1985).

Puisque les molécules d'oxygène et de gaz carbonique sont plus grosses que les molécules d'eau, il n'a pas été possible pour les systèmes biologiques de mettre au point un type de membrane qui ne serait perméable qu'à l'oxygène et au gaz carbonique mais non à l'eau (Hinton, 1969). Ainsi, il n'est pas exclu qu'il y ait une perte de teneur en eau pendant l'embryogenèse.

Un certain nombre de chercheurs ont décrit le phénomène de perte progressive de poids des œufs fécondés au cours de leur développement embryonnaire (Shamachary & Jolly, 1985 ; Mathur & Singh, 1990). Le poids des œufs de vers à soie n'est donc pas un facteur constant au cours du développement. La perte maximum du poids des œufs a lieu le jour de l'éclosion (Mathur & Singh, 1990). La perte de poids des œufs au cours de l'embryogenèse est en partie due à l'exhalation de gaz carbonique et en partie due à la perte en humidité (Shamachary & Jolly, 1985). La différence de poids de l'œuf est aussi due à la perte d'énergie pendant l'embryogenèse (Tazima, 1978).

6. Changements métaboliques au cours de l'embryogenèse :

Les informations concernant les événements biochimiques se produisant au cours de l'embryogenèse permettent de comprendre les aspects chimiques de l'embryologie (Singh & Samson, 1999). Les œufs de vers à soie venant d'être pondus sont composés de protéines (~ 10 %), de lipides (~ 8,5 %), de glycogène (~ 2,5 %), du chorion (~ 18 %) et d'eau (~ 60 %) (Yamashita & Irie, 1980). Plus de 90 % des protéines totales sont des protéines du vitellus : vitelline (~ 40 %), protéine 30 kDa (~ 35 %) et protéine spécifique de l'œuf (ESP). Ces protéines sont assez différentes les unes des autres de par leurs propriétés physicochimiques et biologiques (Shu et coll., 1986). Chaque protéine présente un profil unique de dégradation pendant l'embryogenèse, c'est à dire :

- La dégradation de la vitelline se produit seulement au dernier stade de l'embryogenèse et environ 40 % des quantités initiales demeurent inutilisées chez les larves ayant éclos (Irie & Yamashita, 1980).
- La protéine spécifique de l'œuf est utilisée au début et disparaît complètement au moment de l'éclosion. L'ESP se dégrade au cours de l'embryogenèse grâce à un processus qui s'appelle l'hydrolyse qui est catalysée par une protéase de la serine qui ressemble à de la trypsine et altère le

site carboxyl de Lys114 et l'Arginine 210 de l'ESP (Indrasith et coll., 1988). L'utilisation de l'ESP est donc un événement programmé corrélé avec l'embryogénèse.

- Les protéines 30 kDa sont moins utilisées pendant l'embryogénèse (Zhu et coll., 1986). Le second composant principal de l'œuf sont les lipides (~ 8.5 %) qui sont composés des triacyl glycérols (~ 80 %) et des phospholipides (~ 20 %). Les autres constituants tels que les acides gras libres, les mono et les di-glycérides sont habituellement présents en petites quantités (Chen, 1971). La majorité de l'énergie métabolique (approximativement 70 % de l'énergie totale) utilisée pendant l'embryogénèse dérive de l'oxydation de triacylglycérol. Les phospholipides sont distribués comme un composant principal du vitellus et sont utilisés pour la formation des cellules embryonnaires.

Kim et coll., (1981) ont affirmé que la concentration en lipides est plus élevée chez les œufs de vers à soie à diapause que chez les œufs sans diapause. Chino (1958) a rapporté que les lipides sont les composants principaux consommés pendant la diapause. Ainsi, les lipides sont utilisés comme source d'énergie à la fois pendant le développement de la diapause et après la diapause (Nakasone, 1979).

Le glycogène présent dans les œufs de vers à soie subit des changements importants pendant la diapause (Yamashita et coll., 1981 ; Yamashita & Hasegawa, 1985). La teneur en glycogène est presque deux fois plus importante chez les œufs à diapause venant d'être pondus que chez les œufs sans diapause (Chino, 1957 ; Yamashita et coll., 1981). Au début de la diapause, on rapporte que le glycogène baisse rapidement parce qu'il se transforme en sorbitol et en glycérol (Chino 1958, Yaginuma & Yamashita, 1979). Chez les œufs sans diapause, la teneur en sorbitol augmente le 2^{ème} jour après la ponte et puis baisse rapidement (Furasawa & Yang, 1987). L'accumulation de sorbitol semble se produire à un stade embryonnaire spécifique (Yaginuma et coll., 1990).

L'ordre dans lesquels les principaux événements physiologiques se produisent dans les œufs de *B. mori* jusqu'à l'établissement de la diapause à la température optimum est le suivant :

- **Un jour après la ponte :**

- Age optimum pour le traitement HCl pour bloquer le commencement de la diapause, début de la formation d'ommochrome dans les cellules de la séreuse.

- Début de la baisse en glycogène et consommation maximum de glycogène (Chino, 1957, 1958).

- **Deux jours après la ponte :**

- Déclin brutal de la consommation d'oxygène (Chino, 1958).

- Augmentation brutale de l'activité de la glycogène-phosphorylase (Yamashita et coll., 1975).

- Déclin de l'affinité des lysosomes dans les cellules embryonnaires à l'acridine orange et coloration supra-vitale. L'affinité est perdue pendant la diapause (Okada, 1970b).

- Arrêt de l'augmentation de la teneur en ADN (Kurata et coll., 1980).

- **Trois jours après la ponte :**

- Arrêt de l'activité synthétique d'acides nucléiques dans les noyaux des cellules embryonnaires et baisse progressive dans les cellules du vitellus *in vitro* (Park & Yoshitake, 1970).

- **Quatre jours après la ponte :**

- Arrêt de l'activité mitotique dans l'embryon (Kitazawa et coll., 1963 ; Okada, 1970a).

- Déclin abrupt continu de la teneur en glycogène et accumulation progressive respectivement de sorbitol et de glycérol (Yaginuma & Yamashita, 1977).

EFFECTS OF ETHYL METHANESULFONATE ON MEIOTIC CHROMOSOMES OF SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

H. B MAHESHA* & S. HONNAIAH

Department of Studies in sericultural science, University of Mysore, Manasagangotri,
Mysore- 570 006, India.

*The effects of ethyl methanesulfonate (EMS), on meiotic chromosomes in general and translocations in particular was studied during spermatogenesis in two races of silkworm **Bombyx mori** L. Different concentrations of EMS like 2.5, 5, 10, 20 and 40 mM in 0.75 % NaCl was employed by 'oral injection'. The results indicated that increase in concentration of EMS would enhance the frequency of aberrations in total as well as individual types. They include loops, partially paired bivalents, fragments, stickiness and, stickiness and clumping. This basic knowledge could be useful in silkworm breeding programme.*

Keywords: Ethyl methanesulfonate, meiotic chromosomes, chromosomal aberrations, translocation, auto-sexing breeds.

INTRODUCTION

The silkworm *Bombyx mori* L. though found to be economically important still appears to be an untapped insect in cytological aspects. The reason attributed for the lack of information in this line is mainly due to the presence of large number of smaller chromosomes ($2n=56$). As in the other lepidoptera, silkworm chromosomes are almost round or rod shaped except in prophase I stages, which renders the identification of individual chromosomes difficult. Although several scientists succeeded in the induction of mutations like inversions (Tazima, 1938; Tanaka, 1934), fragmentations (Kawaguchi, 1936), and translocations (Kawaguchi, 1936; Aruga, 1943; Tazima, 1943) (quoted from Tazima, 1964) in the silkworm, cytological evidence is very scanty. The nature of effects of mutagens on the structure and behavior of silkworm chromosomes has not been elucidated. Such a line of investigation is needed to understand the cytological features of the genetic material. This paper presents the effects of ethyl methanesulfonate on silkworm chromosomes in general and on translocations in particular, as the translocation between autosomes and the 'W' chromosome has an important role in the evolution of auto-sexing breeds.

MATERIALS AND METHODS

Two silkworm races, namely Pure Mysore (multivoltine) and NB4D₂ (bivoltine), were selected as an experimental system in the present investigation. Disease free layings of both races were obtained from the germplasm of the Department of Sericultural Science, University of Mysore, and the rearing was conducted following the method described by Krishnaswami (1978, 1979).

* Author for correspondence. Department of sericulture, Yuvaraja's college, University of Mysore, Mysore- 570 005, India.

Silkworm larvae at the age of the first day fifth instar were used for treatment. During treatment, the average weight of Pure Mysore and NB₄D₂ larvae was calculated to be 0.57 and 1.05 g, respectively.

The alkylating agent, ethyl methanesulfonate (EMS) (Loba Chemie), was used for experiments. Various concentrations of EMS like 2.5, 5, 10, 20 and 40 mM were prepared in 0.75 % NaCl solution just before treatment. Forty μ l of each concentration was administered separately to each worm into the gut through the mouth by 'oral injection'. The control larvae received 40 μ l of 0.75 % NaCl solution. For each concentration 60 larvae were treated in triplicate. After the treatment, the larvae were allowed to continue further development.

Male larvae of both EMS and control batches from 24 h of treatment until the day of spinning were used for the preparation of meiotic chromosomes from the testis. The testes were dissected out and dipped immediately into freshly prepared 1% potassium chloride (KCl) solution. Just before treatment with hypotonic solution (1% KCl), the cells were squeezed out by pressing with grooved forceps. After treating for 10 min in hypotonic solution, the cells were centrifuged at about 1500 rpm for 10 min at room temperature, and the supernatant was discarded. The pellet was dispersed in fresh hypotonic solution and incubated at 37° C for 25 min. Mixing of the pellet with hypotonic solution, incubation at 37° C for 25 min, and centrifugation were repeated twice. Thereafter, the pellet was fixed by 3 successive treatments with freshly prepared fixative (acetic acid: methanol, 1:3; v/v) for 30 min, centrifuged at 1000 rpm for 10 min and the supernatant discarded. After the last change, the pellet was mixed in the required quantity of fixative and dropped over a clean slide from a distance of 30 cm, air dried and subsequently stained for 60 min in 10% Giemsa stain in Sorenson's phosphate buffer (pH 6.8). The slides were then washed in distilled water, dried on a slide warmer and mounted in DPX with a coverglass.

The slides were screened for chromosomal aberrations at various stages of meiosis using a light microscope (Leitz photomicroscope equipped with 35 mm Leica camera) under 100 $\times$ 10X magnification. Frequencies of individual aberrations were tabulated by scoring fragments, loops, partially paired bivalents, translocations, stickiness and, stickiness and clumping.

One way ANOVA was employed to determine the level of significance between control and treated batches as well as among treated batches (Fisher and Yates 1953). Regression analysis was employed to determine the dose-effect relationships between the doses of EMS used and the yield of chromosomal aberrations using the equation $Y = a + bx$ (Snedecor and Cochran, 1967).

RESULTS AND DISCUSSION

The ethyl methanesulfonate induced aberrations in the silkworm chromosomes were of gross as well as individual types. The gross type of aberrations included stickiness, clumping and pulverisation. Individual types represented so-called point mutations including fragmentation, loops, partially paired bivalents and reciprocal translocation. Different types of aberrations and frequencies are presented in plates I, II, III and IV, and tables I, II, III, IV, V and VI respectively. The regression analysis revealed that there was a linear increase in the percentage of total chromosomal aberrations in relation to the dose of EMS tested (figures 1,2,3,4,5 and 6).

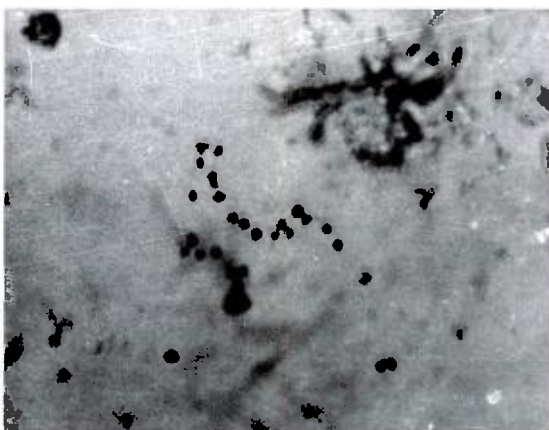
Of the tested races, Pure Mysore larvae were more sensitive to EMS than those of NB₄D₂ race. Total aberrations at 40 mM concentration in the Pure Mysore race at pachytene, metaphase I and metaphase II were 50.28 ± 0.2 , 84.58 ± 0.37 and 86.18 ± 0.3 percent, respectively. On the other hand, in the NB₄D₂ race the total aberrations at pachytene, metaphase I and metaphase II were 46.30 ± 0.14 , 73.03 ± 0.39 and 76.93 ± 0.23 percent, respectively. A similar type of variation was observed in all individual types of aberrations considered as well as at all doses of EMS tested (Tables I-VI).



a.Pachytene. / a. *Pachytène.*

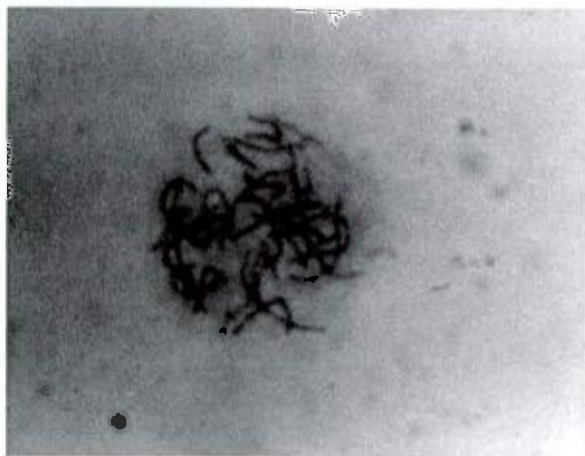


b. Metaphase I. / b. *Métaphase I.*



c. Metaphase II. / c. *Métaphase II.*

Plate I. Sequence of meiosis in the testes of control silkworms of Pure Mysore race.
Planche I. Séquence de la méiose dans les testicules des vers à soie témoins de la race Pure Mysore.



a. Pachytene. / a. Pachytène.



b. Metaphase I. / b. Métaphase I.



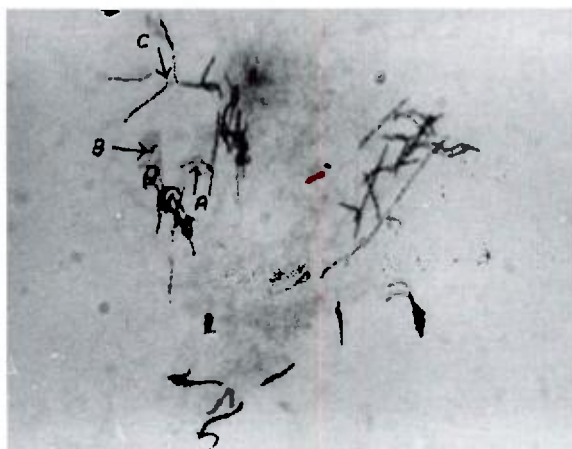
c. Metaphase II. / c. Métaphase II.

Plate II. Sequence of meiosis in the testes of control silkworms of NB₄D₂ race.
Planche II. Séquence de la méiose dans les testicules des vers à soie témoins de la race NB₄D₂.



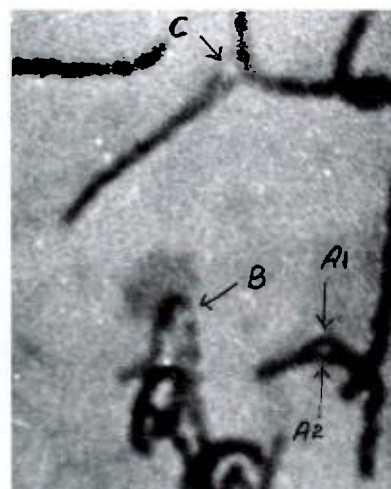
a. Pachytene showing a fragment (arrow).

a. Pachytène présentant un fragment (flèche).



b. Pachytene showing two loops (arrow A & B) and a unpaired bivalent (arrow C).

b. Pachytène présentant deux boucles (flèches A & B) et un bivalent non apparié (flèche C).



c. Aberrant chromosomes loops (arrow A & B) and unpaired bivalent (arrow C) [Figure b. magnified].

c. Boucles de chromosomes aberrants (flèches A & B) et un bivalent non apparié (flèche C) [Figure b, agrandie].

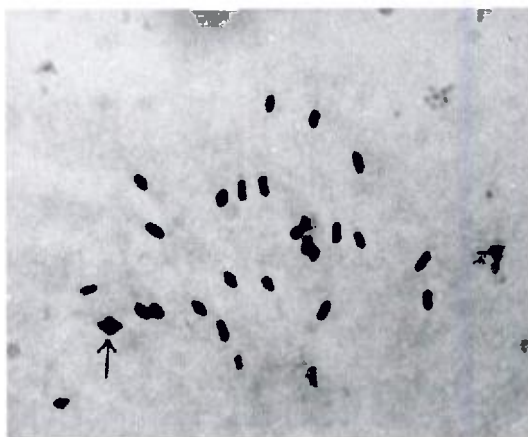
Plate III. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated Pure Mysore silkworms.

Planche III. Séquence des aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie de Pure Mysore traités à l'EMS.



d. Metaphase I showing a fragment (arrow) and stickiness.

d. Métaphase I présentant un fragment (flèche) et un attachement.



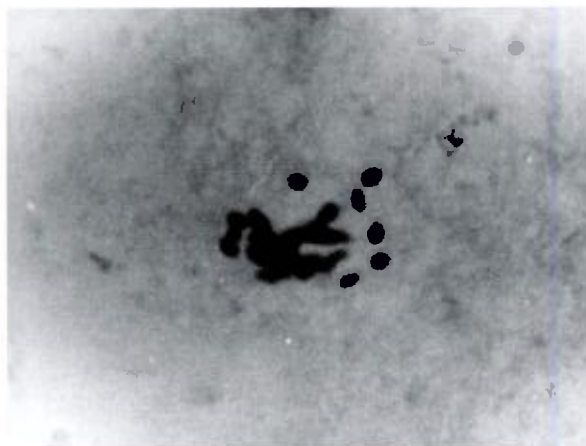
e. Translocated quadrivalent (arrow).

e. Quadrivalent transloqué (flèche).



f. Translocated quadrivalent (figure (e) magnified).

f. Quadrivalent transloqué (figure (e) agrandie).



g. Metaphase I showing stickiness.

g. Métaphase I présentant un attachement.

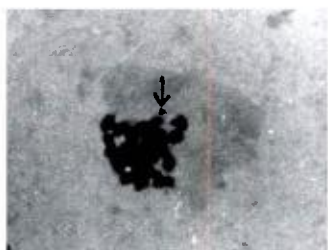
Plate III. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated Pure Mysore silkworms.

Planche III. Séquence des aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie de Pure Mysore traités à l'EMS.



h. Metaphase I showing clumping.

h. *Métaphase I présentant un rétrécissement.*



i. Metaphase II showing a minute fragment (arrow) and stickiness.

i. *Métaphase II présentant un fragment minuscule (flèche) et un attachement.*

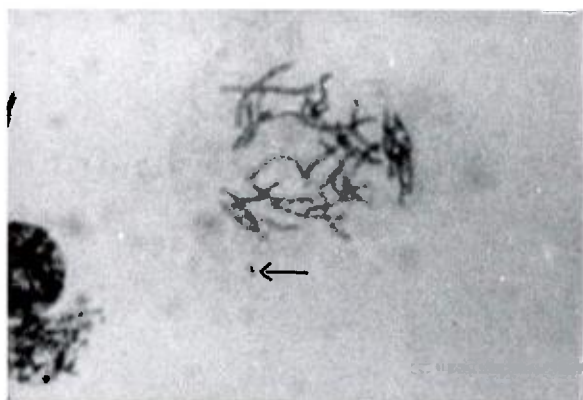


j. Metaphase II showing clumping.

j. *Métaphase II présentant un rétrécissement.*

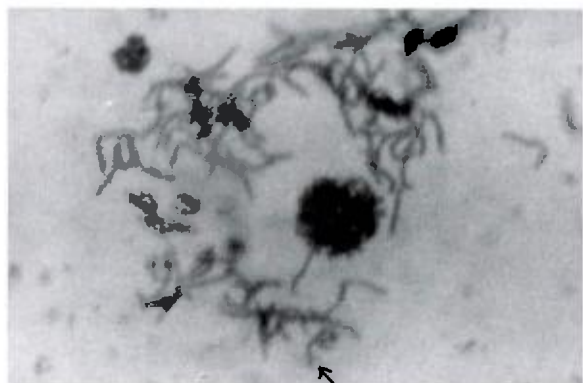
The increased level of aberrations in Pure Mysore larvae compared to NB4D2 worms might be due to the smaller biomass of the former race compared to the later.

Among different types of aberrations observed, chromosome stickiness and clumping (plate III d, g, h, i, & j, and plate IV g, h, i & j) were prominent with very high frequencies. In stickiness and clumping, the chromosome complements stuck together and formed an irregular mass. In extreme clumping, the individuality of the chromosomes was lost. Various biochemical views for this phenomenon have been put forth by many workers. Stickiness results from the breakdown of the nucleic acid into nuclear sap (Darlington, 1942; De Roberties *et al.*, 1948). According to Leuchtenberger, it is due to high proteolytic activity (Kumaraswamy, 1977). Mc Gill *et al.*, (1974), reported that the stickiness is due to formation of submicroscopic chromatin strands between unrelated chromosomes. It is also possible that the protein component of the chromosomes might get depolymerised and increases stickiness upon treatment with EMS. Most of the reports suggest that metaphases show highest susceptibility to treatment with mutagens, perhaps due to the maximum condensation of the chromosomes at this stage, with metaphase II being more sensitive. The present results confirm this observation. Mohamood and Vasudev (1993) made a similar observation in the grasshopper *Poicelocerus pictus* using EMS.



a. Pachytene showing a fragment (arrow).

a. Pachytène présentant un fragment (flèche).



b. Pachytene showing unpaired bivalent (arrow).

b. Pachytène présentant un bivalent non apparié (flèche).

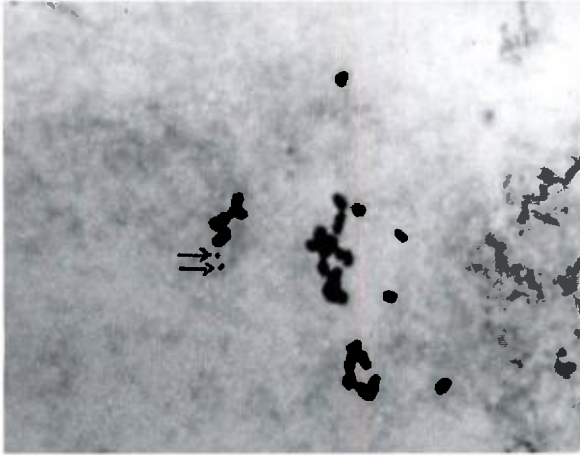


c. Pachytene showing a loop (arrow)

c. Pachytène présentant une boucle (flèche).

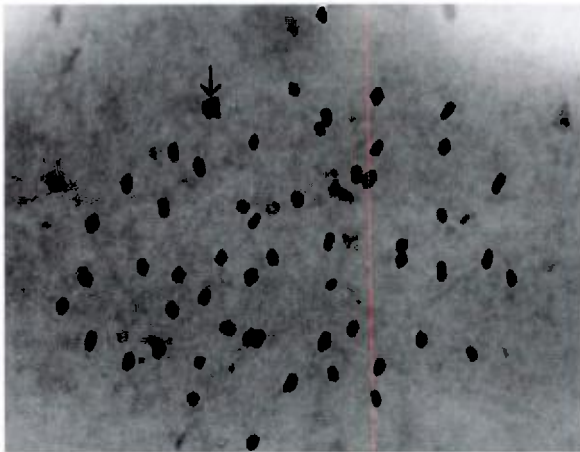
Plate IV. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated NB₄D₂ silkworms .

Planche IV. Séquence d'aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie NB₄D₂ traités à l'EMS.



d. Metaphase I showing two minute fragments (arrows).

d. Métaphase I présentant deux fragments minuscules (flèches).



e. Metaphase I showing translocated quadrivalent (arrow).

e. Métaphase I présentant un quadrivalent transloqué.



f. Translocated quadrivalent (arrow) [figure (e) magnified].

f. Quadrivalent transloqué (flèche) [figure (e) agrandie].

Plate IV. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated NB₄D₂ silkworms.

Planche IV. Séquence d'aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie NB₄D₂ traités à l'EMS.



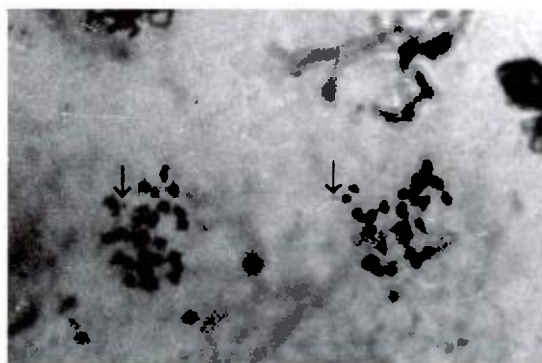
g. Metaphase I showing stickiness.

g. Métaphase I présentant un attachement.



h. Metaphase I showing clumping.

h. Métaphase I présentant un rétrécissement.

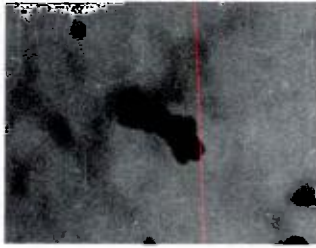


i. Metaphase II showing a fragment (arrow) and stickiness.

i. Métaphase II présentant un fragment (flèche) et un attachement.

Plate IV. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated NB₄D₂ silkworms.

Planche IV. Séquence d'aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie NB₄D₂ traités à l'EMS.



j. Metaphase II showing clumping.

j. Métaphase II présentant un attachement.

Plate IV. Sequence of chromosomal aberrations in the testes of EMS treated NB₄D₂ silkworms.

Planche IV. Séquence d'aberrations chromosomiques dans les testicules de vers à soie NB₄D₂ traités à l'EMS.

Table I. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Pachytene stage in *Bombyx mori* induced by EMS. Race: Pure Mysore.

Tableau I. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade pachytène chez *Bombyx mori* induites par EMS. Race : Pure Mysore.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Loops / Boucles	0.69 ± 0.12	3.76 ± 0.12	5.46 ± 0.07	9.48 ± 0.17	12.38 ± 0.10	14.98 ± 0.20	0.8996
Fragments	2.88 ± 0.14	13.84 ± 0.14	20.02 ± 0.17	21.74 ± 0.09	23.66 ± 0.28	27.12 ± 0.11	1.1088
Unpaired chromosomes (Y-shaped) <i>Chromosomes non appariés (en forme de Y)</i>	0.39 ± 0.08	2.79 ± 0.09	4.50 ± 0.26	5.90 ± 0.26	7.04 ± 0.12	8.18 ± 0.17	1.0039
Total aberration <i>Total</i>	3.96 ± 0.18	20.39 ± 0.26	29.98 ± 0.19	37.12 ± 0.44	43.08 ± 0.37	50.28 ± 0.20	1.8550

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives à un seuil de 1 % par comparaison aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne.

Table II. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Pachytene stage in *Bombyx mori* induced by EMS, Race; NB₄D₂.Tableau II. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade pachytène chez *Bombyx mori* induites par EMS, Race NB₄D₂.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Loops/ Boucles	0.72 ± 0.08	3.96 ± 0.18	6.87* ± 0.08	7.22* ± 0.13	10.68 ± 0.17	12.99 ± 0.13	0.8104
Fragments	2.18 ± 0.15	8.84 ± 0.23	13.42 ± 0.06	19.27** ± 0.17	20.18** ± 0.19	24.12 ± 0.19	1.1209
Unpaired chromosomes (Y-shaped) Chromosomes non appariés (en forme de Y)	0.36 ± 0.08	2.07 ± 0.12	3.40 ± 0.08	4.51 ± 0.17	7.78 ± 0.17	9.19 ± 0.11	0.6690
Total aberration Aberration totale	3.26 ± 0.21	14.87 ± 0.48	23.69 ± 0.07	31.00 ± 0.39	38.64 ± 0.29	46.30 ± 0.14	1.7741

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives à un seuil de 1 % par rapport aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne. * Not significant. / Non significatif.

** Significant at 5% level (CD= 0.753). / Significatif au seuil de 5 % (DC = 0.753).

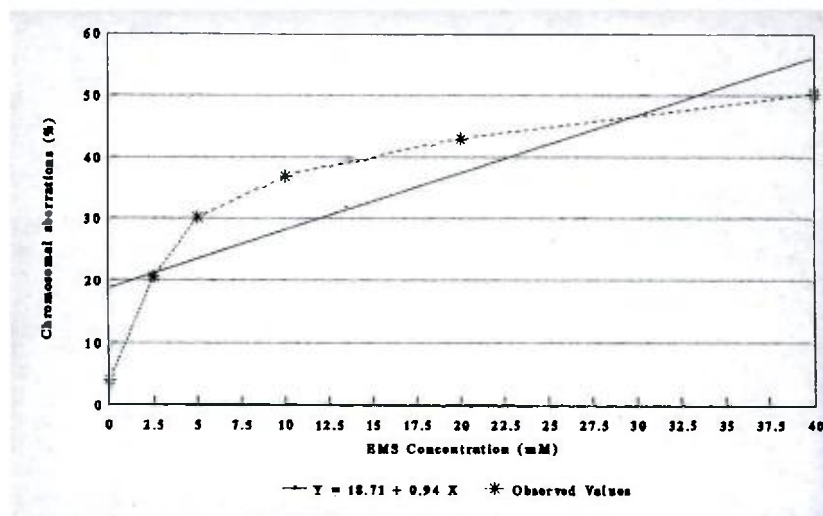


Figure 1. Dose effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Pachytene of Pure Mysore silkworms.

Figure 1. Relations entre les doses et les aberrations chromosomiques induites par EMS pendant le stade Pachytène des vers à soie Pure Mysore.

Table III. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Metaphase I stage in *Bombyx mori* induced by EMS, Race; Pure Mysore.

Tableau III. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade de la métaphase I chez *Bombyx mori* induites par EMS.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Translocations	0.00 ± 0.0	1.04 ± 0.07	2.19 ± 0.10	3.27 ± 0.12	4.08 ± 0.08	4.97 ± 0.12	0.6240
Fragments	0.00 ± 0.0	4.21 ± 0.12	6.39* ± 0.10	6.28* ⁺ ± 0.09	6.83 ⁺ ± 0.08	8.89 ± 0.16	0.6895
Stickiness <i>Attachement</i>	1.29 ± 0.12	18.42 ± 0.10	24.74 ± 0.10	25.78 ± 0.11	28.34 ± 0.23	30.24 ± 0.18	0.9112
Stickiness and Clumping <i>Attachement et rétrécissement</i>	1.44 ± 0.12	20.04 ± 0.25	26.32 ± 0.10	30.32 ± 0.07	33.06 ± 0.10	40.48 ± 0.19	0.9960
Total aberration <i>Total</i>	2.73 ± 0.21	43.71 ± 0.45	59.64 ± 0.11	65.65 ± 0.19	72.31 ± 0.24	84.54 ± 0.37	1.7862

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives au seuil de 1 % par comparaison aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne. * Not significant. / Non significatif.

⁺ Significant at 5% level (CD- 0.471). / Significatif au seuil de 5 %. (DC - 0,471).

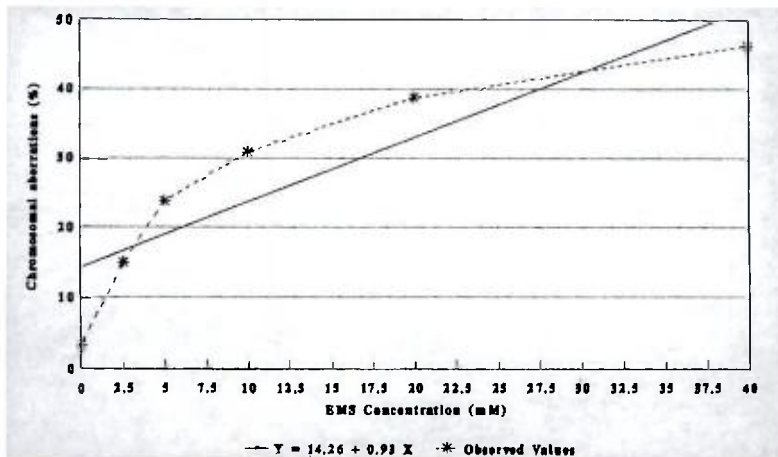


Figure 2. Dose-effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Pachytene of NB₄D₂ silkworms.

Figure 2. Relations entre la dose et les aberrations chromosomiques induites par l'EMS au cours du Pachytène chez les vers à soie NB₄D₂.

Table IV. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Metaphase I stage in *Bombyx mori* induced by EMS. Race: NB₄D₂.Tableau IV. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade de la métaphase I chez *Bombyx mori* induites par EMS. Race: NB₄D₂.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Translocations	0.00 ± 0.0	1.82 ± 0.07	2.85** ± 0.06	3.29** ± 0.14	4.15 ± 0.11	4.91 ± 0.11	0.6048
Fragments	0.00 ± 0.0	2.50 ± 0.13	4.02* ± 0.12	4.26* ± 0.06	4.74* ± 0.06	7.11 ± 0.25	0.8024
Stickiness Attachement	1.22 ± 0.11	12.18 ± 0.43	16.61 ± 0.17	21.43 ± 0.15	26.93 ± 0.25	28.33 ± 0.32	1.6814
Stickiness and Clumping Attachement et rétrécissement	1.32 ± 0.13	13.87 ± 0.43	17.95 ± 0.14	24.51 ± 0.12	30.66 ± 0.17	32.68 ± 0.17	1.4390
Total	2.54 ± 0.13	30.37 ± 0.84	41.43 ± 0.42	53.49 ± 0.29	66.48 ± 0.36	73.06 ± 0.39	2.8300

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes sont analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives au seuil de 1% par comparaison aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne. * Not significant. / Non significatif.

** Significant at 5% level (CD= 0.4065). / Significatif au seuil de 5% (DC= 0.4065).

+ Significant at 5% level (CD= 0.539). / Significatif au seuil de 5% (DC= 0.539).

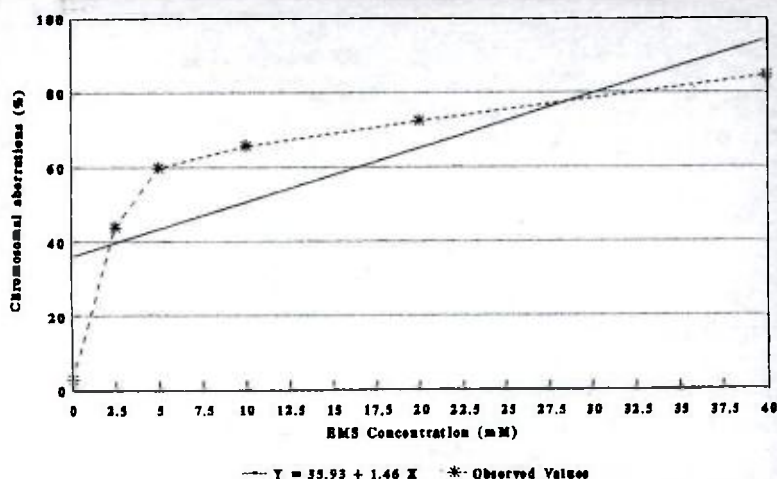


Figure 3. Dose-effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Metaphase-I of Pure Mysore silkworms.

Figure 3. Relations entre la dose et les aberrations chromosomiques induites par l'EMS au cours de la Métaphase-I chez des vers à soie Pure Mysore.

Table V. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Metaphase II stage in *Bombyx mori* induced by EMS. Race : Pure Mysore.

Tableau V. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade de la métaphase II chez Bombyx mori induites par EMS. Race : Pure Mysore.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Fragments	0.00 ± 0.0	1.56* ± 0.10	2.36* ± 0.09	4.08 ± 0.11	6.04 ± 0.29	7.36 ± 0.16	0.9760
Stickiness <i>Attachement</i>	1.08 ± 0.07	19.34 ± 0.10	23.54 ± 0.18	31.54 ± 0.10	33.32 ± 0.16	38.26 ± 0.20	0.9636
Stickiness and Clumping <i>Attachement et rétrécissement</i>	1.24 ± 0.07	22.07 ± 0.20	29.43 ± 0.12	35.09 ± 0.11	38.07 ± 0.10	40.56 ± 0.17	0.9475
Total aberration <i>Total</i>	2.32 ± 0.10	42.97 ± 0.16	55.33 ± 0.29	70.71 ± 0.15	77.43 ± 0.36	86.18 ± 0.30	1.6970

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes sont analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives au seuil de 1 % par comparaison aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne.

* Significant at 5% level (CD- 0.656). / Significatif au seuil de 5 %.

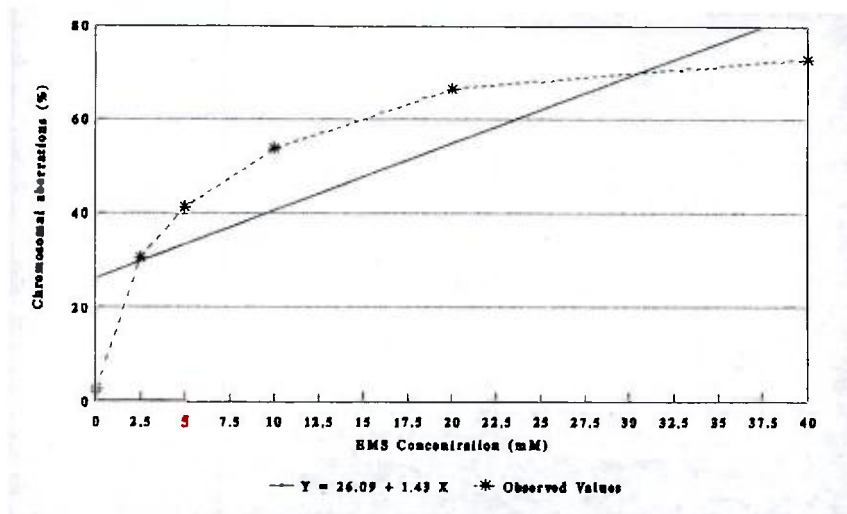


Figure 4. Dose-effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Metaphase-I of NB₄D₂ silkworms.

Figure 4. Relations entre les doses et les aberrations chromosomiques induites par l'EMS au cours de la Métaphase-I chez des vers à soie NB₄D₂.

Table VI. Frequencies (in percentage) of Aberration in the Metaphase II stage in *Bombyx mori* induced by EMS, Race : NB4D2.Tableau VI. Fréquences (en pourcentage) d'aberrations au stade de la métaphase II chez *Bombyx mori* induites par EMS. Race : NB4D2.

Types	EMS Concentration (mM)						CD at 1%
	0.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	
Fragments	0.00 ± 0.0	0.98* ± 0.04	1.06* ± 0.02	2.40 ± 0.08	4.50 ± 0.17	6.91 ± 0.14	0.6089
Stickiness Attachement	0.54 ± 0.03	12.01 ± 0.30	4.50 ± 0.	19.77 ± 0.12	22.49 ± 0.09	32.04 ± 0.24	1.2380
Stickiness and Clumping Attachement et rétrécissement	1.25 ± 0.07	13.98 ± 0.16	18.35 ± 0.28	29.72 ± 0.11	34.38 ± 0.13	37.98 ± 0.09	0.9959
Total aberration Total	1.79 ± 0.08	26.97 ± 0.26	39.18 ± 0.33	54.61 ± 0.20	68.31 ± 0.15	76.93 ± 0.23	1.3790

500 sets of chromosomes were screened per dose. / 500 lots de chromosomes sont analysés par dose.

All the values are significant at 1% level compared to controls and among different doses. / Toutes les valeurs sont significatives au seuil de 1 % par comparaison aux témoins et entre les différentes doses.

± SEM. / Intervalle de confiance de la moyenne.

* Not significant. / Non significatif.

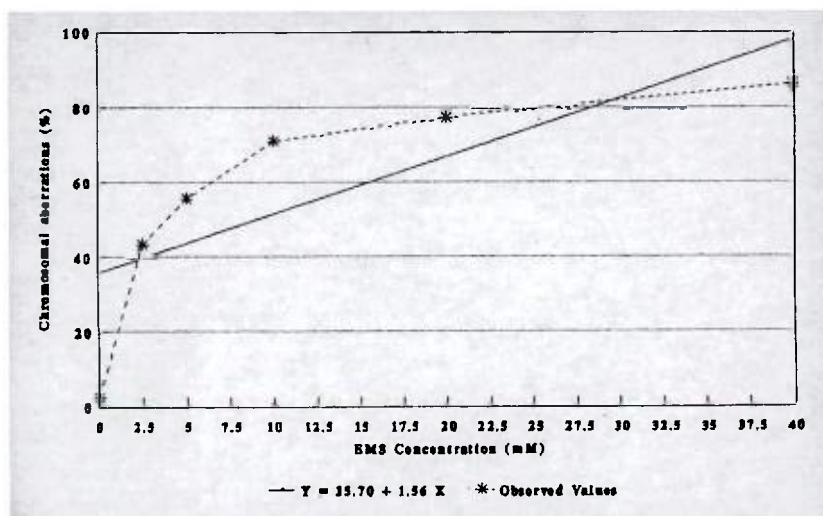


Figure 5. Dose-effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Metaphase-II of Pure Mysore silkworms.

Figure 5. Relations entre les doses et les aberrations chromosomiques induites par EMS au cours de la métaphase-II chez des vers à soie de Pure Mysore.

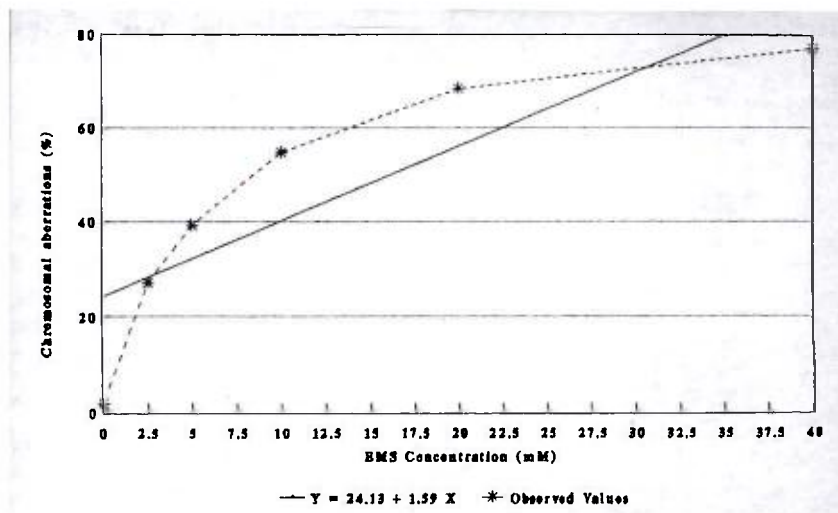


Figure 6. Dose effect relationships of chromosomal aberrations induced by EMS during Metaphase-II of NB₄D₂ silkworms.

Figure 6. Relations entre les doses et les aberrations chromosomiques induites par EMS au cours de la métaphase II chez des vers à soie NB₄D₂.

Fragmentation represents the second major type of aberration, which is identified by the presence of minute chromosome(s) (plate IIIa, d & i, and plate IVa, d and i). However, mechanisms involved are not well understood. The hypothesis often cited is that DNA bases are ethylated by EMS and gets gradually hydrolyzed from the deoxyribose, leaving behind an apurinic or possibly an apyrimidine site, which leads to single strand breakage of DNA (Sega, 1984). Eventually this might lead to fragmentation.

Loops and partially paired bivalents occur due to the unpairing of some chromosomal segments (plate IIIb & c, and plate IVb and c) ; it might be due to the presence of non-homologous segment in the homologous chromosomes. Both these types of aberrations might be due to either inversion or translocation or duplication or deletion. As shown in the plate III, the loop formed by chromosome labelled A1 bulged out over the chromosome labelled A2. This might be due to either deletion of interstitial segment of lower chromosome (A2) or interstitial duplication of the upper chromosome (A1).

Reciprocal translocation (plate IIIe & f, and plate IVe and f) might occur either between the autosomes and sex chromosomes or between autosomes only. As there are no marker chromosomes nor morphologically identifiable sex chromosomes in *Bombyx mori*, the identification of sex chromosomes in spermatogenic cells under light microscope is difficult (Tazima, 1964); therefore, translocations in general were considered. However, it is necessary to study the frequency of translocations between autosomes and sex chromosomes with the influence of EMS as it helps in the evolution of sex-limited races.

Since the silkworm is an economically important insect, induction of sterility or lethality is not a good criterion; unlike in other insects which are pests to agricultural crops, animals and human beings. According to Mahesha, 1997 the lower doses like 2.5 and 5 mM do not cause any sterility or lethality in *Bombyx mori*. Hence these lower doses of EMS can be used in sericulture industry to

induce beneficial mutations, which go a long way to improve the industry and at the same time the higher doses of EMS, which cause sterility can be used to overcome the menace caused by other lepidopteron to mankind.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to University of Mysore, for the financial assistance as well as for providing laboratory facilities to carryout the research work.

REFERENCES

- DARLINGTON C.D. (1942) Chromosome chemistry and gene action. Nature (London), 149, 66-69.
- DE ROBERTIS E.D.P., NOWINSKI W.W., SAEZ F.A. (1948) General cytology. W.B. Saunders co., London.
- FISHER A. R., YATES F. (1953) Statistical tables for biological, agricultural and medical research. 6th Ed. Published by Longmann Group Ltd. England.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Sericultural Research & Training Institute Bulletin No. 2, Central Silk Board, India, 2, 1-23.
- KRISHNASWAMI S. (1979) Improved method of rearing young age (chawki) silkworms. CSR & TI Bulletin No. 3, Central Silk Board, India, 1-24.
- KUMARASWAMI K.R. (1977) Contributions to the cell biology of orthoptera. Ph. D. thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- MAHESHA H.B. (1997) Cytogenetic and biochemical studies in a few races of *Bombyx mori* L., treated with cytoplasmic polyhedrosis virus and a mutagen. Ph. D. thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- MC GILL M., PATHAK S. & HSU T. C. (1974) Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. Chromosoma, 47, 157-167.
- MOHAMOOD, R & VASUDEV, V. (1993) Effects of ethyl methanesulfonate on meiotic chromosomes of grasshopper *Poicelocerous pictus*. Dose-effect relationships. Biol. Zent. bl. 112:228-299.
- SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G. (1967) Statistical methods. Oxford and IBH Publishing co., New Delhi, India.
- SEGA G.A. (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate, Mutation Res., 134, 113-142.
- TAZIMA Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logus press, London.

EFFETS DE L'ETHYL-METHANOSULFONATE SUR LES CHROMOSOMES MEIOTIQUES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

H. B. MAHESHA * & S. HONNAIAH

Department of Studies in Sericultural Sciences, University of Mysore, Manasagangothri,
Mysore – 570 006, Inde.

*Nous avons étudié les effets de l'éthyl-méthanosulfonate (EMS) sur les chromosomes méiotiques en général et les translocations en particulier pendant la spermatogénèse chez deux races du ver à soie *Bombyx mori* L. Nous avons employé différentes concentrations d'EMS : 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 40 mM dans une solution de NaCl à 0,75 % par " injection orale ". Les résultats indiquent que l'augmentation de la concentration en EMS accroît la fréquence des aberrations en général et de chaque type. Elles comprennent des boucles, des bivalents partiellement appariés, des fragments, des accollements et des accollements et resserrements. Ces connaissances de base pourraient être utiles pour les programmes de lignage du ver à soie.*

INTRODUCTION

Bien que le ver à soie *Bombyx mori* L. soit important sur le plan économique, c'est un insecte qui reste inexploité sur le plan cytologique. La raison à ce manque d'informations dans ce domaine pourrait être principalement due à la présence importante d'un grand nombre de chromosomes très petits ($2n = 56$). Comme chez les autres lépidoptères, les chromosomes du ver à soie sont presque ronds ou en forme de bâtonnets sauf au stade de la prophase I, ce qui rend difficile l'identification des chromosomes individuels. Bien que plusieurs scientifiques aient réussi l'induction de mutations comme les inversions (Tazima, 1938 ; Tanaka, 1934), les fragmentations (Kawaguchi, 1936) et les translocations (Kawaguchi, 1936 ; Aruga, 1943 ; Tazima, 1943) (cité d'après Tazima, 1964) chez le ver à soie, on dispose de très peu de preuves cytologiques. On n'a pas éclairci la nature des effets des mutagènes sur la structure et le comportement des chromosomes du ver à soie. Une telle étude est donc nécessaire pour comprendre les caractères cytologiques du matériel génétique. Cet article présente les effets de l'éthyl-méthanosulfonate sur les chromosomes du ver à soie en général et sur les translocations en particulier, puisque la translocation entre les autosomes et le chromosome " W " a un rôle important dans l'évolution des lignées auto-sexables.

MATERIELS ET METHODES

Deux races de vers à soie, à savoir Pure Mysore (polyvoltine) et NB₄D₂ (bivoltine) ont été sélectionnées comme système expérimental dans cette étude. Des pontes saines des deux races sont obtenues à partir de la banque génétique du *Department of Sericultural Science*, Université de Mysore et on procède à l'élevage en suivant la méthode décrite par Krishnaswami (1978, 1979).

Les larves de ver à soie du premier jour du cinquième âge sont utilisées pour le traitement. Au cours du traitement, on utilise des larves de Pure Mysore et de NB₄D₂ dont le poids moyen est respectivement de 0,57 et de 1,05 g.

L'agent alkylant, éthyl-méthanosulfonate (EMS) (Loba Chemie) est utilisé pour les expériences. Des concentrations variées d'EMS / 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 40 mM sont préparées dans une solution de NaCl à 0,75 % juste avant le traitement. Quarante µl de chaque concentration sont administrés séparément à chaque ver dans l'intestin par la bouche grâce à une " injection orale ". Les larves témoins reçoivent 40 µl de solution de NaCl. Pour chaque concentration, 60 larves sont traitées en triple. Après le traitement, on laisse les larves poursuivre leur développement.

On utilise les larves mâles des lots EMS et témoins au bout de 24 h de traitement jusqu'au jour du filage pour la préparation des chromosomes méiotiques à partir des testicules. Les testicules sont disséqués et trempés immédiatement dans une solution de chlorure de potassium fraîchement préparée à 1 % (KCl). Juste avant le traitement avec la solution hypotonique (KCl 1 %), les cellules sont essorées en les pressant avec un forceps cannelé. Après traitement pendant 10 minutes dans une solution hypotonique, les cellules sont centrifugées à environ 1500 tpm pendant 10 min. à température ambiante et le surnageant est jeté. Le culot est dispersé dans une solution hypotonique fraîche et incubé à 37° C pendant 25 minutes et la centrifugation est répétée deux fois. Le culot est ensuite fixé avec 3 traitements successifs avec un fixatif fraîchement préparé (acide acétique : méthanol, 1 : 3 v/v) pendant 30 minutes, centrifugé à 1000 tpm pendant 10 min et le surnageant est jeté. Après le dernier changement, le culot est mélangé dans la quantité nécessaire de fixatif et aspergé sur une lame propre à une distance de 30 cm. La lame est séchée à l'air et colorée pendant 60 minutes dans une solution de Giemsa à 10 % dans un tampon phosphate de Sorenson (pH 6,8). Les lames sont ensuite lavées dans de l'eau distillée, séchées sur un chauffe-lames et montées dans du DPX avec une lame de couvre-objet.

Les lames sont observées pour voir s'il y a des aberrations chromosomiques à divers stades de la méiose en utilisant un microscope optique (photomicroscope Leitz équipé avec un appareil photo Leica à 35 mm) avec un grossissement de 100 × 10X. Les fréquences des types d'aberrations individuelles sont enregistrées en classant les fragments, les boucles, les bivalents partiellement appariés, les translocations, les attachements et les attachements et rétrécissements.

On utilise une analyse de variance à un facteur contrôlé pour déterminer le niveau de signification entre le témoin et les lots traités ainsi que chez les lots traités (Fisher et Yates, 1953). On emploie l'analyse de régression pour déterminer les relations entre les doses d'EMS utilisées et la fréquence d'aberrations chromosomiques en utilisant l'équation $Y = a + bx$ (Snedecor et Cochran, 1967).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les aberrations induites par l'éthyl-méthanosulfonate chez les chromosomes du ver à soie se produisent soit en masse soit individuellement. Le type d'aberrations en masse inclut l'attachement, le rétrécissement et la fragmentation. Les types individuels représentent des mutations ponctuelles comprenant la fragmentation, les boucles, des bivalents partiellement appariés et des translocations réciproques. Les planches I, II, III et IV et les tableaux I, II, III, IV, V et VI présentent différents types d'aberrations et de fréquences. L'analyse de régression révèle qu'il y a une augmentation linéaire du pourcentage d'aberrations chromosomiques totales en fonction de la dose d'EMS utilisée (figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6).

Les larves Pure Mysore sont plus sensibles à l'EMS que les larves de la race NB₄D₂.

Les aberrations totales avec une concentration de 40mM chez la race Pure Mysore aux stades pachytène, métaphase I et métaphase II sont de respectivement $50,28 \pm 0,2$; $84,58 \pm 0,37$ et $86,18 \pm 0,3$ pour cent. Chez la race NB₄D₂, les observations au stade pachytène de la métaphase I et de la métaphase II sont respectivement de $46,30 \pm 0,19$; de $73,03 \pm 0,39$ et de $76,93 \pm 0,23$.

On observe une variation de même type pour tous les types d'aberrations individuelles considérées ainsi qu'avec toutes les doses d'EMS testées (Tableaux I à VI).

L'augmentation du niveau d'aberrations chez les larves Pure Mysore par comparaison aux vers NB₄D₂ pourrait être due à la plus petite biomasse de cette race par comparaison avec cette dernière.

Parmi les différents types d'aberrations observées, les attachements et les rétrécissements des chromosomes (planche III d, g, h, i & j et planche IV g, h, i et j) sont plus importants avec des fréquences très élevées. Pour l'attachement et le rétrécissement, les compléments de chromosomes se collent entre eux et forment une masse irrégulière. Avec un attachement extrême, l'individualité des chromosomes se perd. Des points de vue biochimiques variés ont été avancés sur ce phénomène par différents chercheurs. L'attachement provient de la dégradation de l'acide nucléique en suc nucléaire (Darlington, 1942 ; De Robertis et coll., 1948). Selon Leuchtenberger, elle est due à l'activité protéolytique élevée (Kumaraswamy, 1977). Mc Gill et coll. (1974), ont signalé que l'attachement est dû à la formation de brins de chromatine submicroscopiques entre des chromosomes non appariés. Il est aussi possible que le composant de protéine des chromosomes se dépolymérise et augmente la viscosité avec le traitement EMS. La plupart des rapports suggère que les métaphases présentent la susceptibilité la plus élevée aux mutagènes, ce qui pourrait être dû à la condensation maximum des chromosomes à ce stade, la métaphase II étant la plus sensible. Les résultats actuels confirment ces observations. Mohamood et Vasudev (1993) ont fait une observation similaire chez la sauterelle *Poeciloceris pictus* en utilisant l'EMS.

La fragmentation représente le deuxième type principal d'aberrations, qui se manifeste par la présence de chromosomes minuscules (Planche III a, d & i et planche IV a, d et i). Cependant, on ne comprend pas tellement quels sont les mécanismes impliqués. L'hypothèse que l'on cite souvent est que les bases de l'ADN sont éthylées par l'EMS et sont progressivement hydrolysées à partir du désoxyribose, ce qui laisse un site apurinique ou éventuellement apyrimidine, qui entraîne la rupture du brin d'ADN (Sega, 1984). En fin de compte, cela pourrait entraîner la fragmentation.

Il y a une production de boucles et de bivalents partiellement appariés en raison du non-appariement de certains segments chromosomiques (planche III b & c et planche IV b et c) : qui pourrait être due à la présence de segments non-homologues chez les chromosomes homologues. Ces deux types d'aberrations pourraient être dues soit à l'inversion, soit à la translocation, à la duplication ou à la délétion. Comme le montre la planche III, la boucle formée par le chromosome marqué A1 forme une saillie sur le chromosome marqué A2. Cela pourrait être dû soit à la délétion du segment interstitiel du chromosome inférieur (A2) ou à la duplication interstitielle du chromosome supérieur (A1).

La translocation réciproque (planche III e & f, et planche IV e et f) pourrait se produire soit entre les autosomes et les chromosomes sexuels ou seulement entre les autosomes. Comme il n'y a pas de chromosomes marqueurs ni de chromosomes morphologiquement identifiables chez *Bombyx mori*, il est difficile d'identifier des chromosomes sexuels dans les cellules spermatogéniques avec un microscope optique (Tazima, 1964) : on considère donc les translocations en général. Cependant, il est nécessaire d'étudier la fréquence des translocations entre les autosomes et les chromosomes sexuels sous l'influence de l'EMS parce que cela facilite la mise au point de races limitées au sexe.

Puisque le ver à soie est un insecte important sur le plan économique, l'induction de la stérilité ou de la mortalité n'est pas un caractère recherché, contrairement à ce que l'on recherche chez d'autres insectes qui sont nuisibles pour les récoltes agricoles, les animaux et les êtres humains. Selon Mahesha, 1997, les doses inférieures telles que 2,5 et 5 mM n'entraînent pas de stérilité ou de mortalité chez *Bombyx mori*. Ces doses inférieures d'EMS pourraient donc être utilisées dans l'industrie séricicole pour induire des mutations bénéfiques, qui améliorent considérablement l'industrie et parallèlement les doses élevées d'EMS qui induisent la stérilité peuvent être utilisées chez d'autres lépidoptères qui sont menaçants pour l'espèce humaine.

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR COLLECTING SILKWORM LARVAE HEMOLYMPH BY LASER BEAM INCISION

KOBAYASHI TORU

Biomimetic Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences, Oowashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

For one of the trials to establish an "Insect factory" system which produces useful substances by silkworm larvae in large scale, a new method was developed for rapid collection of hemolymph from 5th instar larvae by incising the integument with CO₂ laser.

The larvae are anesthetized by exposure to low temperature (0°C) for 20 minutes. Then, the larvae are fixed to the infrared ray of CO₂ laser. The laser beam with several watts power is applied to the surface of the larva for 0.5 seconds at a scanning speed of 2.5 cm/s. The beam was applied straight along the midline of the silkworm larvae body to the integument at the center of the posterior dorsal area of the larvae body. In this method, the author could incise the integument alone and hemolymph could be collected efficiently. The amount of hemolymph collected during one minute after incision was about 16% of the silkworm larva body weight.

Keywords: Silkworm, larva, laser, hemolymph, incision, integument.

INTRODUCTION

Mass-production system of pharmaceutically valuable products using baculovirus vectors and their silkworm host as an "Insect factory" was firstly proposed by Maeda (1989). A Japanese industrial company commercialized the interferon for cat calicivirus as "Inter-cat" since 1992. Furthermore another company commercialized the order-made protein production and delivering system using the same method. However in these cases most of procedures of protein production system are manual methods. There is an urgent need for developing integrated mechanical automated production techniques to replace the conventional manual procedures.

One of the greatest difficulties in the establishment of an insect factory composed of 20,000 silkworm larvae is how to enable rapid mechanical collection of hemolymph from silkworms, which have been inoculated with recombinant baculovirus. The conventional manual method for collecting hemolymph is to incise the caudal horn or the abdominal leg of the silkworm larvae with scissors. Recently, several methods have been devised to replace these labor-intensive methods (Arakawa *et al.*, 1999; Ito and Yonezawa, 1997; Ito *et al.*, 1997; Yonezawa, 1994). However, none of them uses a method whereby only the integument is incised for collection. There has thus been a desired for a method of mechanical collection in which only the integument is incised.

In this paper the author tried to develop a method applying an infrared laser beam to incise only larval integument and to collect high purity hemolymph efficiently.

MATERIALS AND METHODS

1. CO₂ laser device:

CO₂ laser device was designed by modeling after a medical laser knife, for efficient non-contact perforation and incision of the silkworm integument. Schematic diagram of laser device is shown in Fig. 1.

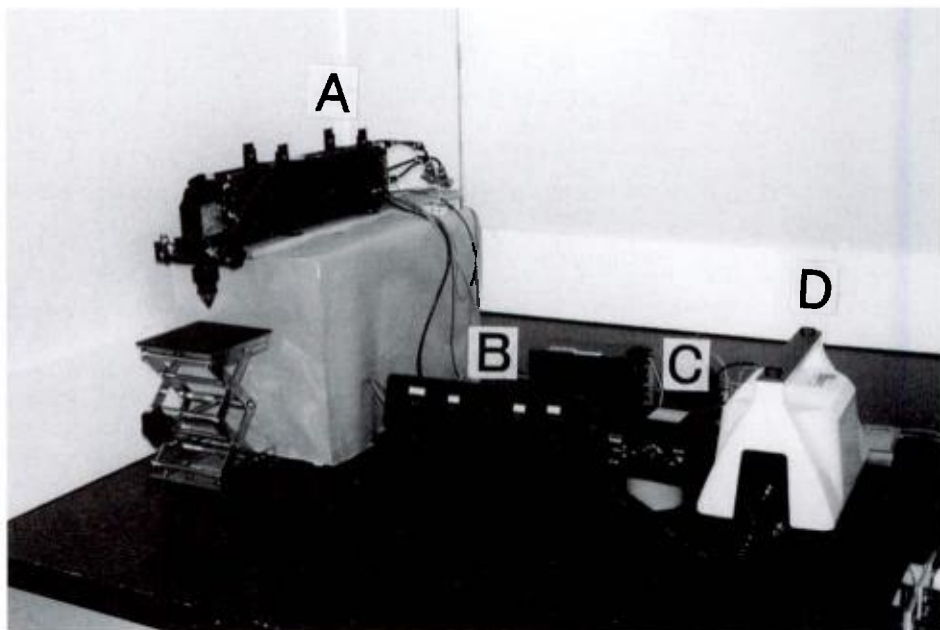


Fig. 1. Schematic diagram of laser device.

A: Laser, B: System controller, C: Power controller, D: Air compressor.

Fig. 1. Schéma du système laser.

A : Laser, B : Système de contrôle, C : Système de contrôle de la puissance, D : Compresseur d'air.

The device is a water-cooled CO₂ laser generator that radiates infrared rays from a nozzle. The outline of the device is shown in Table I.

In present experiment, to protect the condensing lens from contamination by hemolymph or smoke released during incision, clean air (0.1 Mpa) was sprayed from the nozzle while the laser was on, and the focal length was set 30 mm longer than usual, to 93.5 mm.

2. Silkworms:

Silkworm used were hybrid races, "Shin-asagiri" and "Ariake", which were reared on artificial diet in all larval period. Female and male larvae were separated on the first day of the 5th instar.

3. Laser beam incision and collecting the hemolymph:

The silkworms (4 and 5 days of the 5th instar) were anesthetized for 20 minutes at a low temperature (0°C) to be rod like and semi-stiffened before fixing them on laser device.

Table I. Specification of used CO₂ laser device for silkworm larvae.Tableau I. Caractéristiques du système laser CO₂ utilisé pour les larves de ver à soie.

CO ₂ laser	Water-cooled, Maximum output: 10 watts, Focal distance: 63.5 mm, Wavelength: 10.6 μ m
Laser CO ₂	Refroidissement à l'eau, Puissance maximum : 10 watts, Distance focale : 63,5 mm, Longueur d'onde : 10,6 μ m
Controller	Only single pulse mode, Irradiation output: Adjusted in 0.1 W steps to Max. 10 W, Pulse times: Adjusted 0.1 second steps to Max 10 seconds.
Contrôleur	Seulement mode d'impulsion unique, Envoi d'irradiation : Ajustements par pas de 0,1 W jusqu'à un maximum de 10 W. Durée d'impulsion : Ajustements: Pas de 0,1 seconde jusqu'à un maximum de 10 secondes.
Air compressor Compresseur d'air	Rated pressure: 0.1 MPa, Discharge rate: 16 L/min Pression : 0,1 MPa, Taux de décharge 16 L / min.

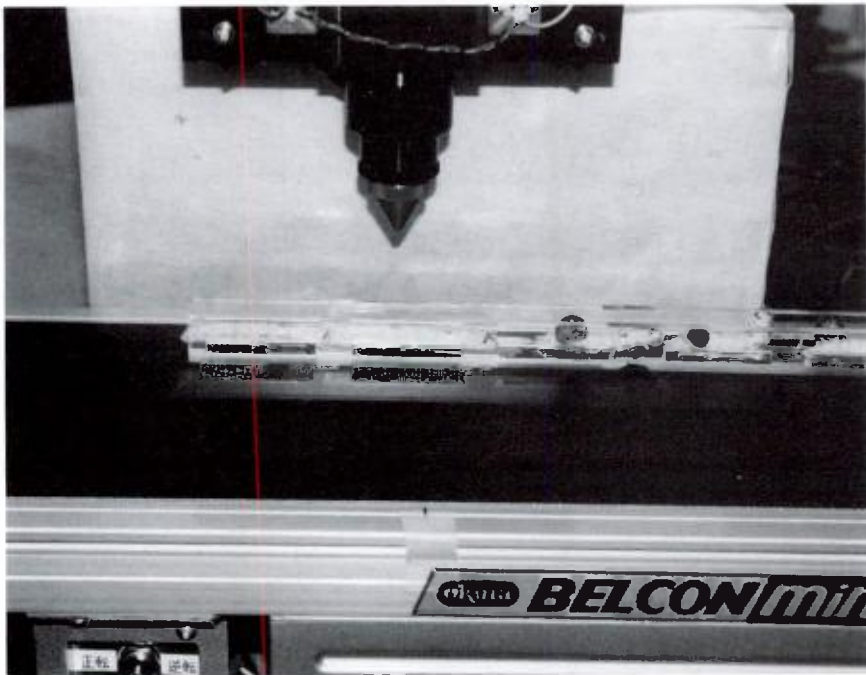


Fig. 2. Continuous incision of silkworms by laser.

Fig. 2. Incision continue des vers à soie au laser.

To incise the silkworm integument linearly by approximately 1 cm, larva was placed on a belt conveyor moving horizontally at a rate of 2.5 cm/sec. The laser at a power of 3-5 W for 0.5 or 0.7 seconds applied to the center of the posterior dorsal area of the larvae (Fig. 2).

Each larva was weighed before incision. One minute after incision, the hemolymph was spout out, and any residual hemolymph left on the body's surface was wiped off. The silkworm was then reweighed. The decrease in weight was regarded as the weight of the hemolymph collected from the silkworm larva.

The ratio of hemolymph (RH) collected was shown using the following equation:

$$RH = (A-B)/A \times 100 (\%)$$

A is the weight (g) of pre-incision silkworm larva; B is that (g) of the larva after hemolymph collection.

RESULTS

1. Preliminary experiment of laser incision:

After low-temperature anesthesia, laser was applied straight to the integument of each silkworm, assuming a prone position, from just above the silkworm, at a scanning speed of 2.5 cm/sec. As a result, a reliable incision confined to the integument was possible by 5 W laser beam of irradiation for 0.5 seconds. At lower laser powers, incision was incomplete. Following laser application, the midgut (a digestive organ) protruded from the incised area, but it remained almost intact. The length and width of the incision are about 11, 0.7 mm respectively. As shown in Table II, the weight of the hemolymph collected during one minute after the incision was around 14% of the body weight. There was no clear difference between the amounts of hemolymph collected with the 0.5 seconds irradiation and with 0.7 seconds irradiation.

From these results, it is suggested that by applying 5 W of laser beam to the silkworms for 0.5 seconds at a scanning speed of 2.5 cm/sec, only integument can be incise and hemolymph alone is collected efficiently.

2. Efficiency of the hemolymph collection by laser beam incision from different region of the larvae:

To examine the relationship between the region of the incision and the volume of hemolymph collected, larvae were irradiated with the laser beam straight along the median line of the integument in the center of the dorsal, lateral and ventral areas near the 8th segment of each silkworm (Fig.3).

In this experiment 6 W power of laser beam for 0.5 sec. was adopted to incise the larval integument. The scanning speed (the speed of the belt conveyor's movement) was 2.5 cm/sec. The results are shown in Table III. In both males and females, the percentage of hemolymph collected on 4 days of the 5th instar, relative to the body weight, was high in the order of dorsal area > lateral area > ventral area. This tendency was observed in both silkworm races, "Shin-asagiri" and "Ariake". Thus, the dorsal incision was the most effective for hemolymph collection from larvae. On day 5 of the 5th instar, the percentage of hemolymph collected was high in the order of dorsal > lateral > ventral, for both the male group and the female group of Shin-asagiri silkworms. At the same age, the order was dorsal > ventral > lateral for the male and female groups of "Ariake" silkworms, with the highest percentage (16.2%) recorded by females. When the dorsal area was incised on 5th day of the 5th instar, the percentage of hemolymph collected was in the order of 15% for both the male and female groups of each race, higher than the percentage on day 4 of the 5th instar.

Table II. Amount of hemolymph collected from larvae in one-minute after laser beam incision.

Tableau II. *Quantité d'hémolymph recueillie en une minute chez les larves après incision au rayon laser.*

Days in 5h instar	Time of irradiation (sec.)	No. of larvae	Amount of hemolymph	
			Male (%)	Female (%)
<i>Jours du 5ème âge</i>	<i>Durée d'irradiation (sec.)</i>	<i>Nbre de larves</i>	<i>Quantité d'hémolymph</i>	
			<i>Mâle (%)</i>	<i>Femelle (%)</i>
4	0.5	10	13.9 (3.4)	14.7 (4.0)
	0.7	6	14.3 (3.5)	14.4 (3.9)
5	0.5	10	15.2 (3.8)	14.1 (4.6)
	0.7	5	14.7(3.6)	14.6 (4.4)

Note 1. Silkworm race: Shin-asagiri. / *Race de ver à soie : Shin asagiri.*

Note 2. Amount of haemolymph is indicated as the ratio of collected hemolymph weight to silkworm weight, sec in the Materials and Methods. / *La quantité d'hémolymph est indiquée comme le rapport du poids d'hémolymph recueillie sur le poids du ver à soie, voir Matériels et Méthodes.*

Note 3. () :Weight (g) of pre-incision silkworm larva. / *Poids (g) des larves de ver à soie avant l'incision.*

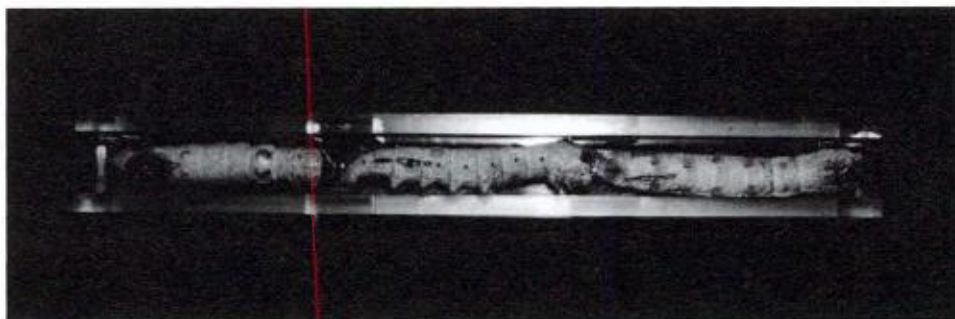


Fig. 3. Laser beam incision on different region of silkworms.

Left: dorsal, Middle: lateral, Right: ventral.

Fig. 3. Incision au rayon laser dans différentes zones du ver à soie.

Gauche : dorsale, Milieu : latérale, Droit : ventrale.

DISCUSSION

Only larval integument can be incised by the infrared laser beam applied to the anesthetized larva.. This suggests that since the energy of the infrared laser beam that penetrated the integument tends to be absorbed by water (Sato, 1987), it was absorbed by the hemolymph with 90-95% water and did not heat the midgut located below the integument. This means that the purity of the hemolymph is unlikely to be reduced by contamination caused by the leakage of digestive fluid from the midgut.

The method described in this study was more efficient than the former one which perforates the integument by laser (Kobayashi, unpublished), since the time needed to collect a similar volume of hemolymph was about 1/5 of the time needed with the former method.

Table III. Amount of hemolymph collected by CO₂ laser incision at different region of silkworm larvae.

Tableau III. Quantité d'hémolymphes recueillie par incision au laser CO₂ à différents endroits chez les larves de ver à soie.

Days in 5th instar	Silkworm races	No. of larvae	Sex	Region		
				Dorsal %	Lateral %	Ventral %
<i>Jours du 5ème âge</i>	<i>Races de vers à soie</i>	<i>Nbre de larves</i>	<i>Sexe</i>	<i>Zone</i>		
				<i>Dorsale %</i>	<i>Latérale %</i>	<i>Ventrale %</i>
4	Shin-asagiri	10*	Male / <i>Mâle</i>	13.5 (3.4)	10.9 (3.3)	9.4 (3.4)
			Female / <i>Femelle</i>	14.9 (4.0)	12.2 (3.8)	10.5 (3.7)
	Ariake	20**	Male / <i>Mâle</i>	11.9 (4.1)	10.5 (3.9)	9.4 (4.0)
			Female / <i>Femelle</i>	13.6 (4.7)	11.7 (4.9)	10.1 (5.0)
5	Shin-asagiri	10*	Male / <i>Mâle</i>	15.3 (4.0)	12.9 (4.0)	12.3 (3.9)
			Female / <i>Femelle</i>	15.8 (4.5)	12.2 (4.5)	10.2 (4.7)
	Ariake	20**	Male / <i>Mâle</i>	15.0 (4.3)	12.5 (4.3)	12.9 (4.2)
			Female / <i>Femelle</i>	16.2 (5.1)	13.7 (5.1)	14.9 (5.1)

Note 1. Amount of hemolymph is indicated as the ratio of collected hemolymph weight to silkworm weight, see in the Materials and Methods. / *La quantité d'hémolymphes est indiquée comme le rapport du poids d'hémolymphes recueillie sur le poids du ver à soie.*

Note 2. (): Weight (g) of pre-incision silkworm larva. / *Poids (g) de la larve de ver à soie avant l'incision.*

Note 3. *: 10 for each region respectively, * *10 pour chaque zone respectivement.* **: 20 for each region respectively. / ***20 pour chaque zone respectivement.*

Hemolymph amount of the silkworm larvae is estimated to account for about 25% of the body weight on 4 and 5 days of the 5th instar (Horie *et al.*, 1971; Nagata *et al.*, 1980). These results obtained in this study may be considered that this method allows collecting a maximum of slightly higher than 60% of the hemolymph.

At both ages (4 and 5 days of the 5th instar), incision by laser beam application was the easiest when the silkworm larvae were in the prone position than in the lateral decubitus or supine position, since the dorsal area was relatively wide and flat. This tendency was observed for both male and female groups of each silkworm races based on the data to be obtained concerning the amounts of hemolymph collected and the efficiency of its collection work, using laser for the silkworm larvae in the prone position seems to be optimal. Moreover, the time needed for incision by this method may be further cut if a laser device fitted with a scanner is used.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks Dr. S. Takeda, Director of National Institute of Agrobiological Sciences, for his critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- ARAKAWA T., TOMITA S., MIYAZAWA M., KIUTI M., KATO M. (1999) Freeze- thawing method: a bleeding method from lepidopteran larvae utilizing a spontaneous insect body contraction after a freezing-thawing treatment. *J. Appl. Ent.* 123,443-446.
- HORIE Y., INOKUTI T., WATANABE K., YANAGAWA H. (1971) On the haemolymph volume of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Seric. Sic., Jpn.*, 40, 330-334.
- ITO T., YONEZAWA Y. (1997) Incision of silkworm. Patent Application Disclosure, Hei-9-19238, JP.
- ITO T., YONEZAWA Y., TAKEGAWA S. (1997) Dissection of silkworm. Patent Application Disclosure, Hei-9-70241, JP.
- MAEDA S. (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 34,351-372.
- NAGATA M., II SEONG SU., YOSHITAKE N. (1980) Variation of the haemolymph volume with larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sic., Jpn.*, 49,453-454.
- SATO T. (1987) Laser. Denki Shoin, Tokyo, p.181.
- YONEZAWA Y. (1994) Method for extracting hemolymph from silkworms. Patent Application Disclosure Hei-6-90778, JP.

UNE NOUVELLE METHODE DE RECUEIL DE L'HEMOLYPHE DE LARVES DE VER A SOIE PAR INCISION AU RAYON LASER

KOBAYASHI TORU

Biomimetic Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences, Oowashi 1-2, Tsukuba,
Ibaraki 305-8634, Japon.

Dans le cadre d'un essai pour créer une " usine d'insectes " afin de produire des substances utiles par les larves de vers à soie a grande échelle, une nouvelle méthode a été mise au point pour un recueil rapide de l'hémolymph chez des larves du 5^{ème} âge en incisant le tégument avec un laser à CO₂.

Les larves sont anesthésiées en les exposant à une température basse (0° C) pendant 20 minutes. Puis, elles sont fixées au rayon infrarouge du laser à CO₂. Le rayon laser avec une puissance de plusieurs watts est appliqué à la surface des larves pendant 0,5 seconde à une vitesse de balayage de 2,5 cm / s. Le rayon est appliqué le long de la ligne médiane du corps des larves de vers à soie jusqu'au tégument au centre de la zone dorsale postérieure de la larve. Avec cette méthode, l'auteur peut inciser le tégument seul et l'hémolymph peut être recueillie efficacement. La quantité d'hémolymph recueillie en une minute après incision est d'environ 16 % du poids de la larve.

INTRODUCTION

Maeda (1989) a été le premier à proposer un système de production en masse de produits pharmaceutiques de valeur par une "usine d'insectes" en utilisant des vecteurs baculovirus et des vers à soie hôtes. Une entreprise industrielle japonaise commercialise l'interféron pour le virus carici du chat sous le nom "d'Inter-cat" depuis 1992. De plus, une autre société commercialise la production de protéines faites à la demande et un système de livraison en utilisant la même méthode. Cependant, la plupart des procédures de production de protéines sont des méthodes manuelles. Il y a une demande importante pour mettre au point des techniques de production automatisée mécanique intégrée pour remplacer les procédures manuelles conventionnelles.

L'une des plus grandes difficultés pour créer une "usine d'insectes" composée avec 20 000 larves de vers à soie est le recueil rapide de l'hémolymph de ces vers à soie inoculés avec le baculovirus recombinant. La méthode manuelle conventionnelle pour le recueil de l'hémolymph consiste à inciser l'éperon caudal ou la patte abdominale chez les larves de vers à soie avec des ciseaux. Récemment, plusieurs méthodes ont été mises au point pour remplacer ces méthodes qui demandent beaucoup de main d'œuvre (Arakawa et coll., 1999 ; Ito et Yonezawa, 1997 ; Ito et coll., 1997 ; Yonezawa, 1994). Cependant, aucune d'elles n'utilise de technique qui n'incise que le tégument pour le recueil. On a donc voulu trouver une méthode de recueil mécanique où seul le tégument est incisé. Dans cet article, l'auteur a essayé de mettre au point une méthode d'application d'un rayon laser à infra-rouge permettant de n'inciser que le tégument larvaire et pour recueillir efficacement une hémolymph d'une grande pureté.

MATERIELS ET METHODES

1. Système laser à CO₂ :

Le système laser à CO₂ est conçu en s'inspirant d'un bistouri laser médical, pour une perforation et une incision efficaces sans contact du tégument du ver à soie. Le schéma de l'appareil laser est présenté dans la Fig. 1.

Le système est un générateur laser CO₂ refroidi à l'eau qui diffuse des rayons infra-rouge à partir de la canule. La configuration du système est présentée dans le Tableau I.

Dans cette expérience, pour protéger la lentille de condensation de la contamination par l'hémolymphe ou de la fumée émise pendant l'incision, on vaporise de l'air propre (0,1 Mpa) à partir de la canule pendant que le laser fonctionne et la distance focale est fixée à 30 mm de plus que les 93,5 mm habituels.

2. Vers à soie :

Les vers à soie utilisés sont des races hybrides "Shin-asagiri" et "Ariake" qui sont élevés sur un milieu artificiel pendant toute la période larvaire. Les larves femelles et mâles sont séparées le premier jour du 5^{ème} âge.

3. Incision au rayon laser et recueil de l'hémolymphe :

Les vers à soie (4^{ème} et 5^{ème} jour du 5^{ème} âge) sont anesthésiés pendant 20 minutes à une température basse (0° C) pour être droits comme une baguette et semi-raidis avant de les fixer sur un appareil laser.

Pour inciser le tégument du ver à soie d'environ 1 cm d'une manière linéaire, les larves sont placées sur un tapis roulant se déplaçant horizontalement à une vitesse de 2,5 cm/sec. Le laser d'une puissance de 3 à 5 W est appliqué au centre de la zone dorsale postérieure des larves pendant 0,5 ou 0,7 seconde (Fig. 2).

Chaque larve est pesée avant l'incision. Une minute après l'incision, l'hémolymphe est rejetée et tout résidu d'hémolymphe qui reste à la surface du corps est enlevé. Puis, on pèse à nouveau les vers à soie. La baisse de poids est considérée comme le poids de l'hémolymphe recueillie.

Le ratio d'hémolymphe recueillie (RH) est obtenu à partir de l'équation suivante :

$$RH = (A - B) / A \times 100 (\%)$$

A est le poids (g) des larves de vers à soie avant incision ; B est celui (g) des larves après le recueil de l'hémolymphe.

RESULTATS

1. Expérience préliminaire d'incision au laser :

Après une anesthésie à basse température, le laser est appliqué directement sur le tégument de chaque ver à soie allongé sur le ventre, juste au-dessus du ver à soie à une vitesse de balayage de 2,5 cm/sec. Il en résulte une incision correcte limitée au tégument avec une irradiation au rayon laser de 5 W pendant 0,5 seconde. Avec des puissances de laser plus faibles, l'incision est incomplète. Suite à l'application du laser, l'intestin moyen (organe digestif) sort de la zone incisée, mais il reste presque intacte. La longueur et la largeur de l'incision sont respectivement d'environ 11 et 0,7 mm. Comme le montre le Tableau II, le poids de l'hémolymphe recueillie en une minute après l'incision est autour de 14 % du poids du corps. Il n'y a pas de différence claire entre les quantités d'hémolymphe recueillie avec une irradiation de 0,5 seconde et de 0,7 seconde.

D'après ces résultats, en utilisant un rayon laser de 5 W sur les vers à soie pendant 0,5 seconde à une vitesse de balayage de 2,5 cm / sec., seul le tégument est incisé et on peut efficacement ne recueillir que l'hémolymph.

2. Efficacité du recueil de l'hémolymph par incision au rayon laser dans différentes zones :

Pour examiner la relation entre la zone incisée et le volume d'hémolymph recueillie, les larves sont irradiées au laser le long de la zone médiane du tégument au centre des zones dorsale, latérale et ventrale près du 8^{ème} segment de chaque ver à soie (Fig. 3).

Dans cette expérience, on adopte un rayon laser d'une puissance de 6 W pour inciser le tégument larvaire pendant 0,5 seconde. La vitesse de balayage (la vitesse du mouvement du tapis roulant) est de 2,5 cm / sec. Les résultats sont présentés dans le Tableau III. Chez les mâles comme chez les femelles, le pourcentage d'hémolymph recueillie le 4^{ème} jour du 5^{ème} âge, par rapport au poids du corps se classe dans l'ordre zone dorsale > zone latérale > zone ventrale. On observe cette tendance chez les deux races de vers à soie, " Shin-asagiri " et " Ariake ". Ainsi, l'incision dorsale est la plus efficace pour le recueil de l'hémolymph des larves. Le 5^{ème} jour du 5^{ème} âge, le pourcentage d'hémolymph recueillie se classe dans l'ordre dorsal > latéral > ventral à la fois pour le groupe mâle et le groupe femelle des vers à soie Shin-asagiri. Au même âge, pour les groupes mâles et femelles des vers à soie " Ariake ", l'ordre est dorsal > ventral > latéral avec le pourcentage le plus élevé (16,2 %) enregistré pour les femelles. Quand la zone dorsale est incisée le 5^{ème} jour du 5^{ème} âge, le pourcentage d'hémolymph recueillie est de l'ordre de 15 %, à la fois pour les groupes mâle et femelle de chaque race, plus que le pourcentage le 4^{ème} jour du 5^{ème} âge.

DISCUSSION

Le tégument larvaire seul peut être incisé en utilisant le rayon laser infrarouge sur les larves anesthésiées.

Cela suggère que puisque l'énergie du rayon laser infrarouge qui pénètre le tégument tend à être absorbée par l'eau (Sato, 1987), elle est absorbée par l'hémolymph à 90 à 95 % d'eau et ne réchauffe pas l'intestin moyen situé en-dessous du tégument. Cela signifie qu'il est peu probable que la pureté de l'hémolymph diminue par la contamination provoquée par la perte du liquide digestif de l'intestin moyen.

La méthode décrite dans cette étude est plus efficace que la précédente qui perce le tégument avec le laser (Kobayashi, non publié) puisque le temps nécessaire pour recueillir un volume similaire d'hémolymph est d'environ 1/5^{ème} du temps nécessaire avec la méthode précédente.

On estime que la quantité d'hémolymph des larves de vers à soie représente environ 25 % du poids du corps le 4^{ème} et le 5^{ème} jour du 5^{ème} âge (Horie et coll., 1971 ; Nagata et coll., 1980). D'après les résultats obtenus dans cette étude, on peut considérer que cette méthode permet de recueillir un maximum d'environ un peu plus de 60 % du poids de l'hémolymph.

Aux deux âges (4^{ème} et 5^{ème} jour du 5^{ème} âge), l'incision au rayon laser est la plus facile quand les larves de vers à soie sont allongées sur le ventre plutôt que dans la position latérale décubitus ou allongées sur le dos puisque la zone dorsale est relativement large et plate. Cette tendance a été observée à la fois chez les groupes femelle et mâle de chaque race de ver à soie d'après les données obtenues concernant les quantités d'hémolymph recueillie et l'efficacité du travail de recueil en utilisant un laser pour les larves de vers à soie allongées sur le ventre qui semble être la position optimale. De plus, le temps nécessaire pour l'incision avec cette méthode pourrait encore diminuer si on utilise un système laser équipé d'un scanner.

EFFECT OF CASITOSE (P & PH) SUPPLEMENTATION ON THE HAEMOLYMPH PROTEIN PROFILE AND THE REPRODUCTIVE CHARACTERS OF SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

G. RAVIKUMAR¹, U. BALASUBRAMANIAN¹ & M. KRISHNAN²

1. Department of Zoology, A.V.V.M. Sri Pushpam College (Autonomous), Poondi,
Tamil Nadu 613 503, India.

2. Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamil Nadu 620 024,
India.

*The present study reports on the effect of P-casitose and PH-casitose supplementation on the haemolymph protein profile and reproductive potentialities of silkworm *Bombyx mori*. From the bioassay analysis three different ideal concentrations of P-casitose (2.75, 3.00 and 3.25%) and PH-casitose (1.50, 1.75 and 2.00%) were selected for the protein profile study. The V instar larvae were fed with the mulberry leaves immersed in different selected concentrations of P-casitose and PH-casitose separately. The reproductive characters such as ovariole length, fecundity, egg hatchability and the haemolymph protein intensity were found to be maximum at 3.00 per cent P-casitose and 1.75 per cent PH-casitose supplemented groups than the control and other concentrations of P-casitose and PH-casitose. From the above result it is confirmed that hydrolyzed P-casitose and PH-casitose is an ideal nutrient that will probably benefit the silk industry.*

Key words: *Bombyx mori*, haemolymph protein, P and PH Casitose.

INTRODUCTION

The most important physiological factor in silkworm growth and silk productivity is nutrition (Nagesh and Devaiah, 1996). Provision of nutritionally rich mulberry leaves to the worm plays a significant role in the development and cocoon production (Horie *et al.*, 1967). Significant development in the research on silkworm nutrition started with formulation of artificial diets. The need to develop artificial diets increased because in most of the temperate areas of the world, mulberry leaves were not available throughout the year, hence the work can be done round the year. But in India where mulberry leaves are available throughout the year, enrichment of mulberry leaves through fortification is in progress. Various nutrients like proteins, aminoacids, minerals, vitamins, carbohydrates, antibiotics, hormones etc. have been supplemented along with mulberry to *B. mori* to improve the silk production (Horie *et al.*, 1971; Kamioka *et al.*, 1971; Mathavan *et al.*, 1984; Chauhan and Singh, 1992; Faruki and Khan 1992; Subburathinam *et al.*, 1993; Magudam *et al.*, 1993; Krishnan *et al.*, 1995; Bongale and Krishna, 1996; Nagesh and Devaiah, 1996; Birendro Nath Saha and Ataur Rahman Khan, 1997; Dechu *et al.* 1997; Santhosh Kumar, 1998). Of the various supplementations, dietary protein has a significant impact on silkworm growth, silk production (Ito and Tanaka, 1962; Ito and Mukaiyama, 1970; Horie *et al.*, 1971; Kamioka *et al.*, 1971; Subba Rao *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1991) and haemolymph proteins (Horie and Watanabe, 1983; Nagata and Kobayashi, 1990; Krishnan *et al.*, 1995). A myriad of proteins like soybean, casein, egg albumin, single cell protein have been used as supplementary sources (Sengupta *et al.*, 1972; Kumararaj, 1972; Horie and Watanabe, 1983; Mathavan *et al.* 1984; Subbarao *et al.*, 1989). The importance of amino acid

composition of the diet for reproduction in insects has been elegantly documented in several species of aphids (Retnakaran and Beck, 1968; Van Emden, 1973) adult mosquitoes (Briegleb, 1985) and the larvae of commercial silk moth *B. mori* (Horie and Inokuchi, 1978; Horie and Watanabe, 1983). Similarly the egg production and egg weight in silkworm, *B. mori* were increased by the soy protein in the artificial diet (Zhang *et al.*, 1991). In *B. mori* development of heavy females with more number of eggs resulted from the supplementation of amino acids (Kumarilalitha *et al.*, 1992) and hydrolyzed soy protein (Krishnan *et al.*, 1995; Subburathinam, 1995; Vanishree *et al.*, 1996). Supplementation of hydrolyzed soy protein (P-soyatoso) has increased the haemolymph storage protein in the silkworm *B. mori* (Krishnan *et al.*, 1995; Subburathinam, 1995; Vanishree *et al.*, 1996; Subburathinam and Krishnan, 1998). In the larvae of holometabolous insects, storage proteins are the major haemolymph proteins playing important functions as reservoir for amino acids that are utilized for larval and adult development (Levenbook, 1985). Therefore in the present work an attempt was made to determine the effect of P-casitose and PH-casitose supplementation on the haemolymph protein profile and reproductive characters of silkworm *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

In the present study freshly moulted fifth instar larvae of *Bombyx mori* (Crossbreed : L, a multivoltine $\times$ NB4D2 a bivoltine) were used. The hydrolyzed protein P-casitose and PH-casitose were obtained from Warkem Company, Mumbai. This hydrolyzate milk protein is soluble in water, neutral in pH and free from pathogenic organisms. To find out the effective dose suspensions of P-casitose and PH-casitose were prepared in distilled water at different concentrations from 0.5 to 5.0 per cent. Fresh mulberry leaves (MR2) were collected between the months of July and October having the average protein content 17.41 ± 0.41 g %. These leaves were soaked in each of the selected concentrations of P-casitose and PH-casitose for 10 minutes (Krishnan *et al.*, 1995). These leaves were air dried, chopped and offered as food, at the first feeding among the four feedings of a day (Benjamin *et al.*, 1983). A control group was maintained and fed with mulberry leaves without supplementation. Bioassay was carried out ten times for each group with 50 animals per replica. Mortality and larval weight of male and female larvae were recorded daily for all the experimental and control groups. From these bio-assay analysis a narrow range of five ideal concentrations i. e. 2.25, 2.50, 2.75, 3.00 and 3.25 per cent of P-casitose and 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 and 2.25 per cent of PH-casitose were chosen for conducting the detailed study.

Haemolymph of both sexes were collected daily during the development of fifth-instar larvae from both the experimental and control groups. Haemolymph was collected in eppendorf tubes pre-rinsed with saturated phenyl thiourea (PTU) solution (by making incision at the distal region of the prothoracic leg). The haemolymph samples were diluted with phosphate buffer saline (PBS) in 1:5 ratio. The diluted haemolymph samples were centrifuged at 12,000 g for 5 minutes to remove the haemocytes and other tissue debris. Haemolymph samples were then stored at -20°C until use.

Electrophoresis was performed to determine the storage proteins daily during the development of fifth instar larvae. Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in the presence of sodium dodecyl sulphate (10% SDS-PAGE), according to the method of Laemmli (1970). Densities of protein bands were measured with a microdensitometer (MD 1000 Carlzeiss, Germany). Storage proteins (Sp1 and Sp2) were identified by their positions.

The female moth that emerged from experimental and control groups, were allowed to lay eggs after mating and their fecundity was counted separately. The hatching percentage was calculated in both supplemental and control groups. To determine the length of the ovariole, freshly emerged females of both experimental and control groups were anesthetized. The abdomen was dissected out and the length of each ovariole was measured.

RESULTS

Haemolymph protein profile:

Fig.1 and 2 show the results of SDS-PAGE of the haemolymph proteins of fifth instar larvae from day-1 to day-7 of control and day-1 to day-6 of supplemented groups. Several polypeptides with molecular weights ranging from 200-18 kDa were observed in all groups. Among these there are two major polypeptides 80 kDa and 30 kDa. The 80 kDa has two polypeptides SP1 (82kDa) and Sp2 (76 and 72 kDas) an arylphorin were identified as storage proteins. The storage protein-1 (Sp1: 82kDa) was prominently noted only in the haemolymph of female; the storage protein-2 (SP2: 76 & 72 kDas) were found in both sexes. The next major group of polypeptide was localized at 30kDa region with 3 subunits with a molecular weight 31, 29 and 26 kDas. This is commonly known as BmLSP (*Bombyx mori* Larval Serum Protein).

In the supplemented groups, there was an increase in the intensity of coomassie blue staining protein bands. In P-casitose supplementation at 3.00 per cent level the staining intensity of 82 kDa in female and 76 and 72 kDas in both the sexes, were comparatively maximum than with the 2.75 and 3.25 per cent level of supplementation. Similar to Γ -casitose, 1.75 per cent PH-casitose supplementation increased the accumulation of 82 kDa in female and 76 and 72 kDas in both the sexes than the 1.50 and 2.00 per cent level of PH-supplementation. Apart from SP-1 and SP-2 the peptides resolved at 30 kDa were also found to be increased in the haemolymph of supplemented groups. However, the accumulation of storage and 30 kDa were more in PH-casitose supplemented groups than the P-casitose supplementation. Densitometer scanning revealed that the peak observed for storage and 30 kDa proteins on the sixth day in the larvae fed on 3.00 per cent P-casitose and 1.75 per cent PH-casitose supplementation were more or less equal to the peak area of storage and 30 kDa proteins on the seventh day in the control larvae (Fig.3 and 4).

Ovariole length:

The freshly emerged adult female moth of control was having the ovariole length of 126.5 mm. The ovariole length reached the maximum of 138.8 mm at 3.00 per cent level but it decreased to 130.3 mm at 3.25 per cent level (Table I). Similarly in PH-casitose supplementation, maximum ovariole length of 140.4 mm was observed at 1.75 per cent level. But it decreased to 132.7 mm at 2.00 per cent level (Table II). Ovariole length was significantly increased by both P-casitose and PH-casitose supplementation at optimal dose.

Fecundity:

In the control group, the female moth laid 410 eggs/female. The fecundity was maximum of 508 eggs/female at 3.00 per cent P-casitose supplementation, but it was reduced to 452 eggs/female at 3.25 per cent protein level (Table I). Similarly at 1.75 per cent PH-casitose level it reached the maximum of 536 eggs/female, but decreased to 456 eggs/female at 2.00 per cent protein level (Table II).

Egg hatchability:

The egg hatchability was 72.00 per cent in the control groups. In P-casitose supplementation it increased to 74.8 per cent at 2.25 per cent protein level. Maximum of 82.4 per cent hatchability was observed at 3.00 per cent level. At 3.25 per cent protein level the hatchability decreased to 74.6 per cent (Table I). In PH-casitose supplementation also the egg hatchability reached the maximum of 84.6 per cent at 1.75 per cent protein level and decreased to 75.4 per cent at 2.00 per cent protein level (Table II).

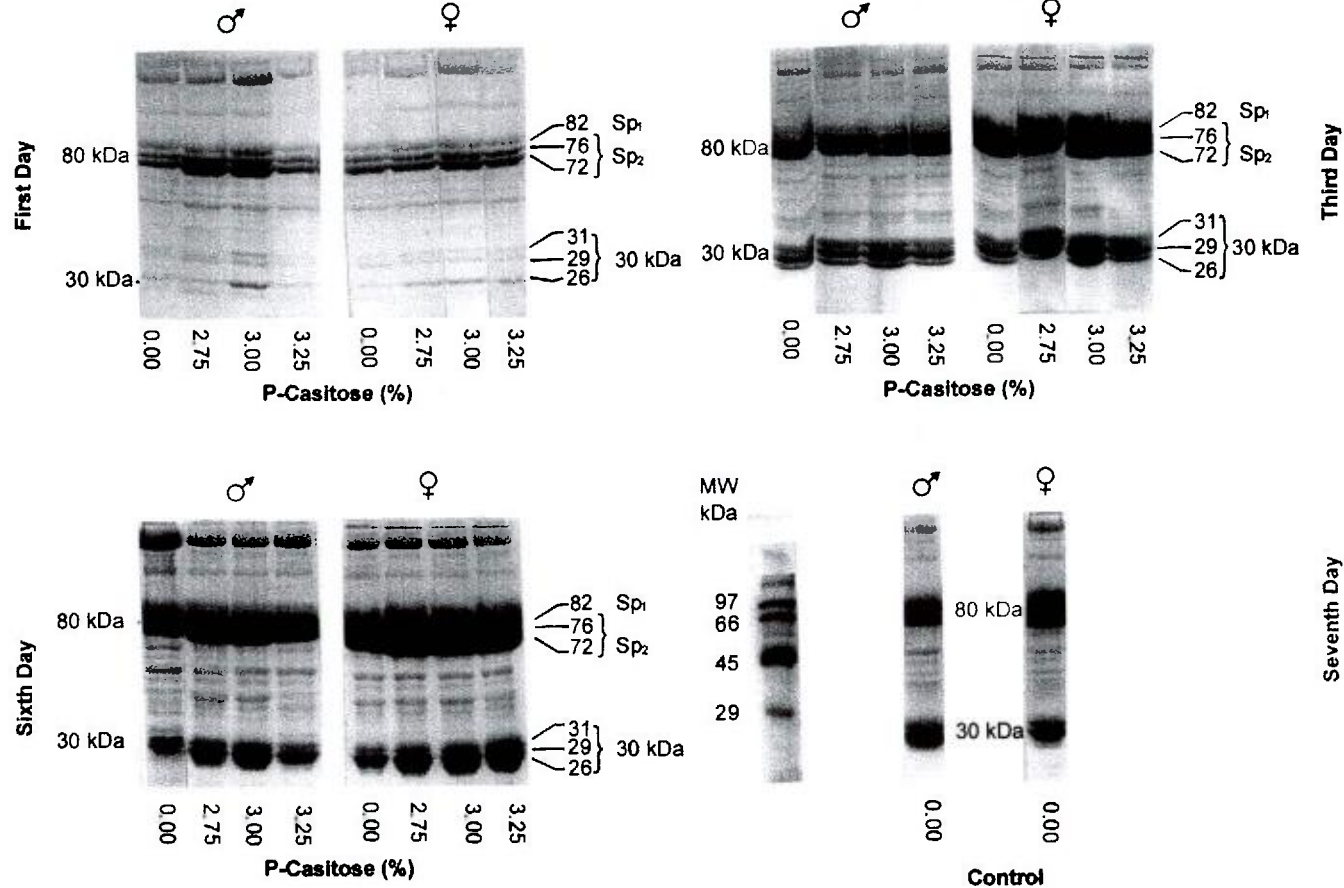


Fig. 1. Electrophoretic pattern of haemolymph protein of first, third, sixth and seventh day control and P-casitose supplemented groups of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* on a 10% SDS-Page.
 Fig. 1. Profil électrophorétique (SDS-PAGE à 10 %) des protéines de l'hémolymphe chez le tétoin et chez les groupes supplémentés en castose-P du premier, troisième, sixième et septième jour chez les larves du ver à soie *Bombyx mori* du 5^{ème} âge.

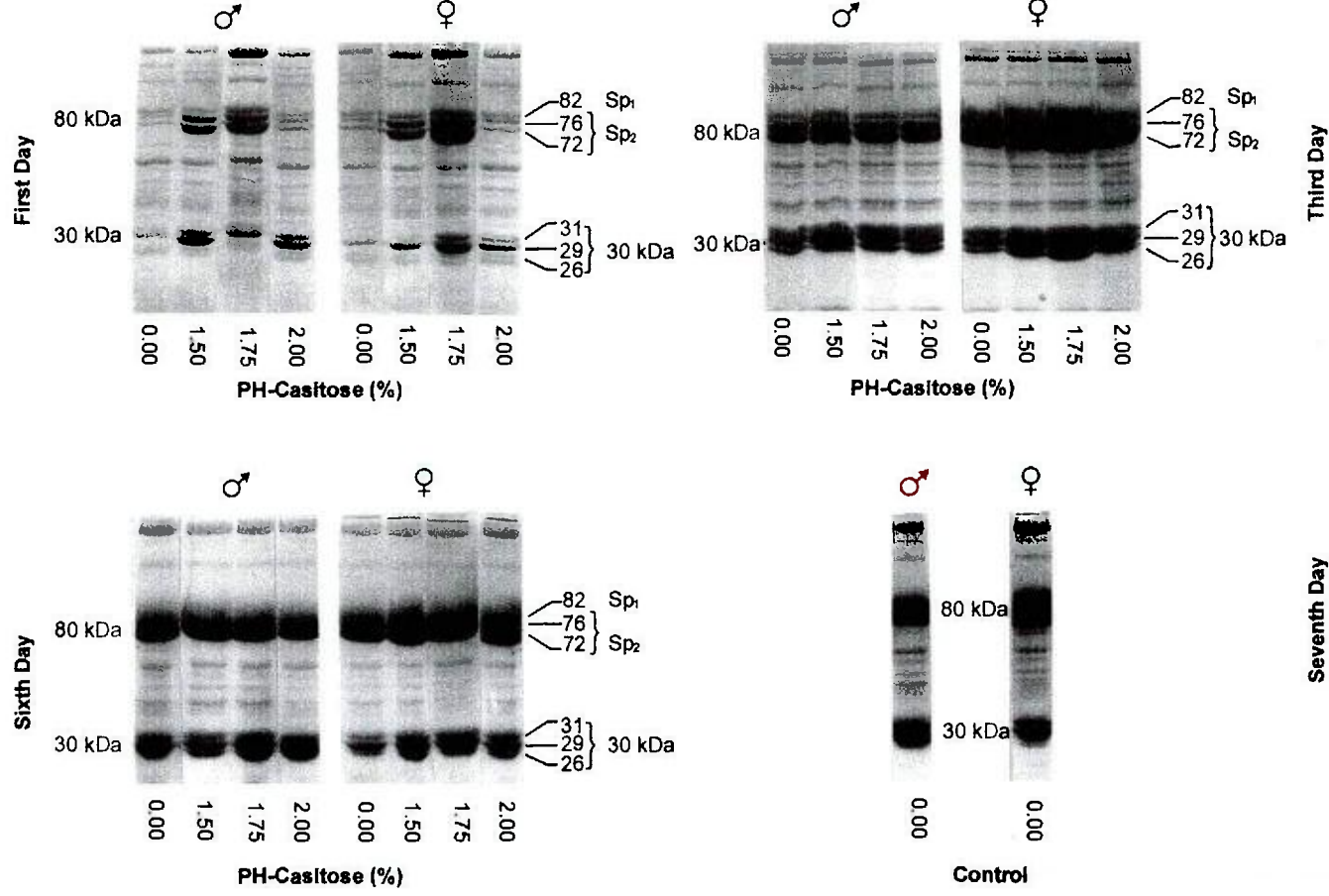


Fig. 2. Electrophoretic pattern of haemolymph protein of first, third, sixth and seventh day control and PH-casitose supplemented groups of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* on a 10% SDS-PAGE.
 Fig. 2. Profil électrophorétique des protéines de l'hémolymph (SDS-PAGE à 10 %) chez les larves du ver à soie *Bombyx mori* du 5^{ème} âge du premier, troisième, sixième et septième jour chez le témoin et chez les groupes ayant reçu un supplément de casitose-PH.

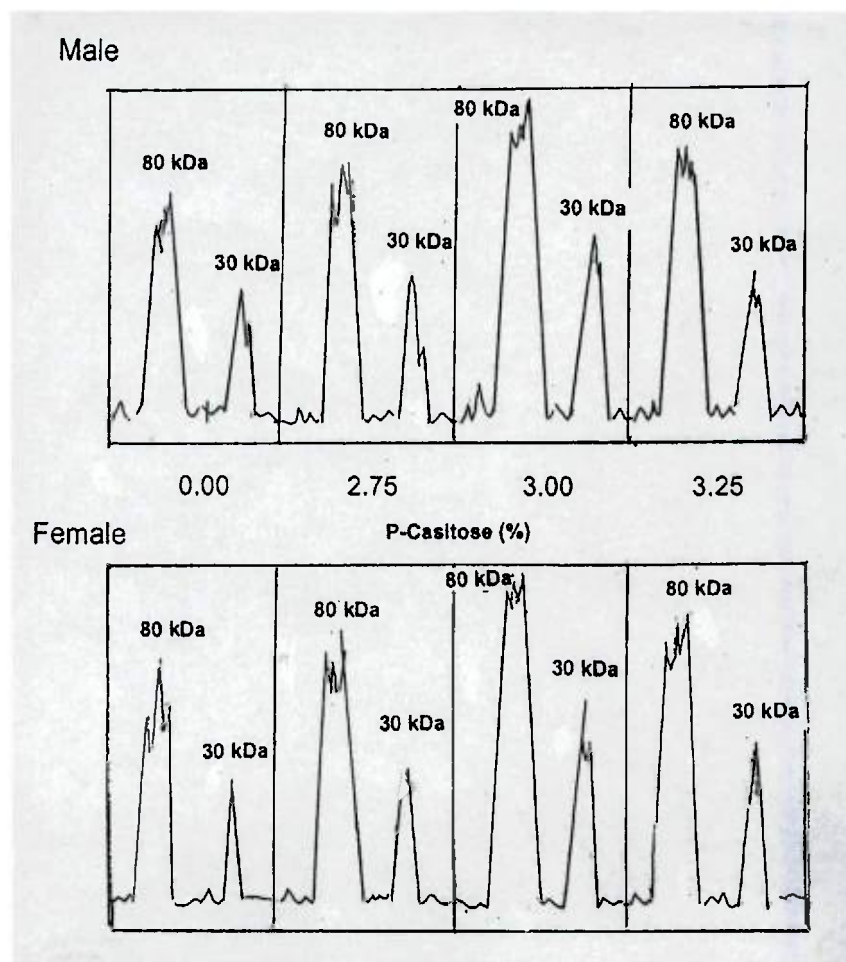


Fig. 3. Densitometric pattern of haemolymph proteins of day-6 of fifth instar larvae of *Bombyx mori* fed on mulberry leaves supplemented with P-casitose.

Fig. 3. Profil densitométrique des protéines de l'hémolymphe le 6ème jour chez des larves de *Bombyx mori* du 5ème âge nourries sur des feuilles de mûrier additionnées de casitose-P.

On relating reproductive characters such as ovariole length, fecundity and egg hatchability to the protein concentrations of P-casitose and PH-casitose a curvilinear regression was observed (Fig.5).

DISCUSSION

Larval nutrition plays a vital role in the production of eggs by female insects in which nitrogen, particularly as protein is often observed as a limiting factor in reproduction (Mc Caffery, 1975; Barton Browne *et al.*, 1979). According to Purohit *et al.* (1975), Krishnaswami *et al.* (1978) and Mukherjee *et al.* (1983) in insects like *B. mori*, which do not feed during pupal stages, the nutrients stored by the larvae during the larval period is important for the production of eggs. The results of the present study

corroborates with the study made by Zhang *et al.* (1991) who showed that soy protein in the diet increased the egg production as well as egg weight in silkworm *B. mori*. Since protein is important for yolk production, increase in the concentration of protein upto certain level in the diet of female insect can accelerate the egg production (Chapman, 1974). Supplementation of mulberry leaves with aminoacids (Kumarilalitha *et al.*, 1992) and hydrolyzed soy protein (Krishnan *et al.*, 1995; Subburathinam, 1995; Subburathinam and Krishnan, 1998) lead to development of healthier pupa, producing more number of eggs. Similarly Cangussu and Zucolota (1992) also observed that the fecundity was increased in *Ceratitis capitata* fed on protein diet casein. The increased egg production observed in the present study emphasizes the importance of larval nutrition in egg production.

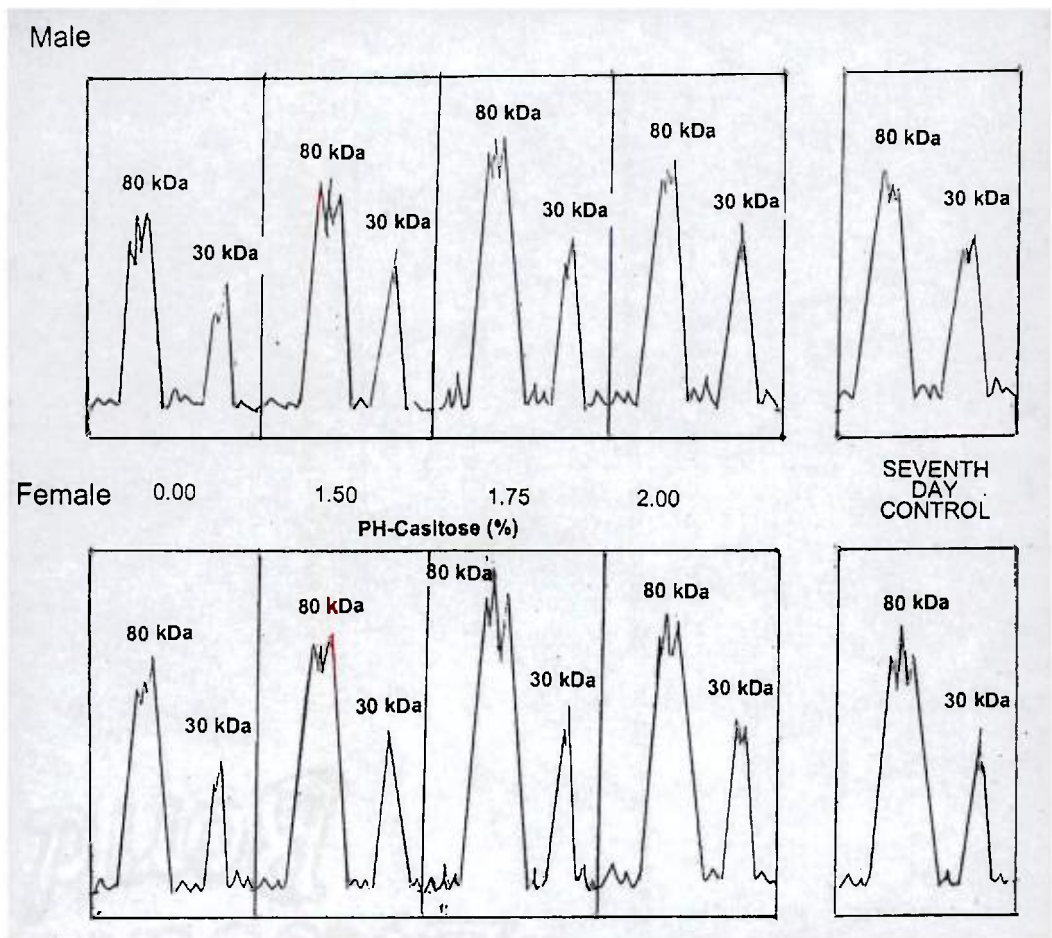


Fig. 4. Densitometric pattern of haemolymph proteins of day 6 of fifth instar larvae of *Bombyx mori* fed on mulberry leaves supplemented with PH-casitose.

Fig. 4. Profil densitométrique des protéines de l'hémolymph chez des larves de *Bombyx mori* du 5ème âge le 6ème jour nourries sur des feuilles de mûrier additionnées de casitose-PH.

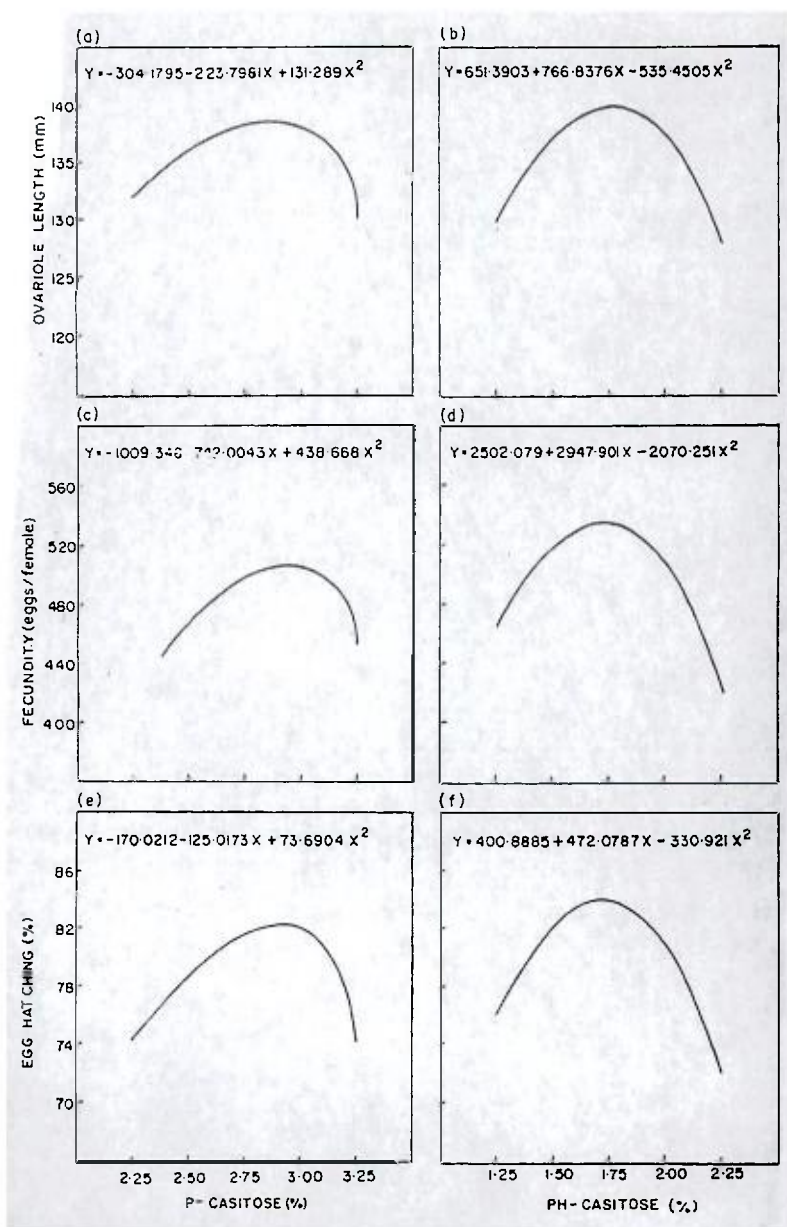


Fig. 5. Effect of supplemented P-casitose and PH-casitose on ovariole length (a and b), fecundity (c and d) and egg hatchability (e and f) of silkworm, *Bombyx mori*.

Fig. 5. Effet de l'addition de casitose-P et de casitose-PH sur la longueur de l'ovariole (a et b), la fécondité (c et d) et l'éclosion de l'œuf (e et f) du ver à soie, *Bombyx mori*.

Table I. Effect of P-Casitose supplemented with mulberry leaves on the ovariole length, fecundity and egg hatchability of silkworm, *Bombyx mori* (Each value is an average (mean $\pm$ SD) performance of ten individuals).

Tableau I. Effet de l'addition de Casitose-P sur les feuilles de mûrier par rapport à la longueur de l'ovariole et l'éclosion de l'œuf du ver à soie Bombyx mori (chaque valeur est la moyenne (moyenne $\pm$ Ecart type) de dix individus).

P-Casitose (%)	Ovariole length (mm)	Fecundity (eggs/female)	Egg hatchability (%)
	<i>Longueur de l'ovariole (mm)</i>	<i>Fécondité (œufs / femelle)</i>	<i>Éclosion de l'œuf (%)</i>
0.00	126.5 $\pm$ 2.23	410 $\pm$ 8.24	72.0 $\pm$ 2.16
2.25	132.7 $\pm$ 3.18	446 $\pm$ 7.42	74.8 $\pm$ 1.24
2.50	133.4 $\pm$ 2.17	468 $\pm$ 8.36	76.4 $\pm$ 2.56
2.75	136.9 $\pm$ 2.05	480 $\pm$ 7.26	80.2 $\pm$ 1.36
3.00	138.8 $\pm$ 1.54	508 $\pm$ 6.32	82.4 $\pm$ 2.76
3.25	130.3 $\pm$ 2.36	452 $\pm$ 8.56	74.6 $\pm$ 2.28

Table II. Effect of PH-Casitose supplemented with mulberry leaves on the ovariole length, fecundity and egg hatchability of silkworm, *Bombyx mori* (Each value is an average (mean $\pm$ SD) performance of ten individuals)

Tableau II. Effet du supplément en casitose-PH sur les feuilles de mûrier par rapport à la longueur de l'ovariole, la fécondité et l'éclosion des œufs du ver à soie, Bombyx mori (chaque valeur est la moyenne (moyenne $\pm$ écart type) de dix individus).

PH-Casitose (%)	Ovariole length (mm)	Fecundity (eggs/female)	Egg hatchability (%)
	<i>Longueur de l'ovariole (mm)</i>	<i>Fécondité (œufs / femelle)</i>	<i>Éclosion de l'œuf (%)</i>
0.00	126.5 $\pm$ 2.23	410 $\pm$ 8.24	72.0 $\pm$ 2.16
1.25	130.0 $\pm$ 2.65	464 $\pm$ 8.20	76.8 $\pm$ 3.21
1.50	134.9 $\pm$ 1.37	486 $\pm$ 7.49	80.2 $\pm$ 2.56
1.75	140.4 $\pm$ 1.28	536 $\pm$ 8.41	84.6 $\pm$ 1.89
2.00	132.7 $\pm$ 1.49	456 $\pm$ 7.26	75.4 $\pm$ 2.42
2.25	128.2 $\pm$ 3.25	420 $\pm$ 6.56	72.0 $\pm$ 2.52

In the present study the concentrations of the haemolymph storage protein (Sp1 and Sp2) were found to be increased in both P-casitose and PH-casitose supplemented groups compared to the control. This is in accordance with the observations of Horie *et al.* (1971) who reported that the

concentration of the protein in the haemolymph increases with the increase of protein in the diet. Similarly in *B. mori* the haemolymph protein level increased with the higher levels of amino acids in the diet (Horie and Watanabe, 1980). Riddiford and Hice (1985) and Nagata and Kobayashi (1990) observed the nutritional richness in the diet influenced the accumulation of storage proteins in the haemolymph. The quantum of storage protein in the larvae fed on low protein were less than the standard diet, but the larvae fed on optimal level of protein showed a higher levels of storage proteins (Nagata and Kobayashi, 1990).

A higher level of storage proteins were observed in the haemolymph of larvae that had been supplemented with P-soytose (Krishnan *et al.*, 1995; Subburathinam, 1995). Similarly, Nirmala (1998) reported that the haemolymph as well as silk protein synthesized and accumulated more in the larvae of silkworm *B. mori* fed with P-soytose. In the present study, increase in accumulation of 30 kDa was also observed. Janarthanan (1995) reports also fall on the same line stating that the high concentration of storage proteins and 30 kDas in the haemolymph of *B. mori* were due to the feedings on leaves with rich protein. The 30 kDa are believed to be actively involved in the formation of yolk granules in developing oocytes (Zhu *et al.*, 1986; Sakai *et al.*, 1988; Chen and Yamashita, 1990; Fujiwara and Yamashita, 1990). Janarthanan (1995) reported that the synthesis of 30 kDa polypeptide may be an attempt to develop the ovary for increased egg production.

In the present study, the increased fecundity observed in P-casitose and PH-casitose supplementation may be due to increased accumulation of haemolymph storage proteins. According to Tojo *et al.* (1978) the female specific storage protein (SP-1) accumulated more in the female larvae prior to pupation and got converted into vitellogenin proteins during pupal development. The results of the present study also showed that in the female larvae of supplemented groups an increase in the accumulation of SP-1 in the larval period and weight have resulted in more vitellogenin proteins. This may be the another reason for the increased fecundity in the supplemented groups compared to the control.

From the present investigation it is inferred that ovariole length, fecundity, egg hatchability and the storage protein (Sp1 and Sp2) and 30 kDa were highly influenced by the casitose protein supplementation. It is also observed that 3.00 per cent P-casitose and 1.75 per cent PH-casitose were found to be the optimal dose for silkworm *B. mori*. This protein can also recommended for the sericulture industry after conducting field trials.

ACKNOWLEDGEMENT

We are gratefully acknowledging the International Foundation for Science, Sweden for the grant awarded to one of the author (M.K.). We are also thankful to Warkem Company, Mumbai for providing us with the hydrolyzed protein P-casitose and PH-casitose for our research work.

REFERENCES

- BARTON BROWNE, L., VAN GERWEN, A.C.M. & WILLIAMS, K.L. (1979). Oocyte resorption during ovarian development in the blowfly, *Lucilia cuprina*, J. Insect. Physiol., 25: 147-153.
- BENCHAMIN, K.V., JOLLY, M.S., VERMA MEERA (1983). Studies on the quantitative and qualitative aspects of feeding in silkworm rearing. Abst., National Seminar on Silk research and Development, March 10-13, Bangalore.
- BIRENDRO NATH SAHA & Ataur Rahaman Khan (1997). The nutritive effects of Sinafort® - B on *Bombyx mori* L. Entomon., 22: 29-34.
- BONGALE, U.D. & KRISHNA, M. (1996). Fortification of chlorotic leaf of mulberry (*Morus indica* L. Variety M-5) with sucrose for improvement of its feed value to the silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35: 64-66.
- BRIEGAL, J.H. (1985). Mosquito reproduction: incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis. J. Insect Physiol., 31:15-21.

- CANGUSSU, J.A. & ZUCOLATA, F.S. (1992). Nutritional value and selection of different diets by adult *Ceratitis capitata* flies (Diptera: Tephritidae). *J. Insect. Physiol.*, 38: 485-491.
- CHAPMAN, R.F. (1974). The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. *Bull. Ent. Res.*, 64: 339-363.
- CHAUHAN, T.P.S. AND SINGH, K. (1992). Studies on the effect of ascorbic acid (Vitamin C) on the fecundity in the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.). *Sericologia*, 32: 567-574.
- DECHU, P.S., GOVINDAN, R., DEVAIAH, M.C. & NARAYANASWAMY, T.K. (1997). Effect of antibiotics on growth and cocoon parameters of silkworm *Bombyx mori*, L. *Mysore J. Agric. Sci.*, 31: 41-46.
- FARUKI, S.I. & KHAN, A.R. (1992). Cocoon characters of *Bombyx mori* L. fed on para-amino benzoic acid treated mulberry leaves. *Bull. Sericult. Res.*, 3: 71-73.
- FUJIWARA, Y. & YAMASHITA, O. (1990). Purification, characterization and developmental changes in the titer of a new larval serum protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect. Biochem.*, 21: 751-759.
- HORIE, Y., WATANABE, K. & ITO, T. (1967). Nutrition of the silkworm *Bombyx mori*. XVII. Quantitative requirements for K, P, Mg and Zn. *Bull. Sericult. Expt. Stn.*, 22: 181-193.
- HORIE, Y., WATANABE, K. & SHINOHARA, E. (1971). Effect of dietary composition on growth, silk glands and components in haemolymph of the silkworm. *Acta. Seri. Japan.*, 78: 44-50.
- HORIE, Y. & INOKUCHI, T. (1978). Protein synthesis and uric acid excretion in the absence of essential amino acids in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect. Biochem.*, 8: 251-254.
- HORIE, Y. & WATANABE, K. (1980). Recent advances in Sericulture. *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 49-71.
- HORIE, Y. & WATANABE, K. (1983). Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect. Physiol.*, 29: 187-199.
- ITO, T. & MUKAIYAMA, F. (1970). Relationship between protein content of artificial diet and cocoon quality in the silkworm. *Sansu Kenkyu (Acta Sericologia)*, 77: 76-81.
- ITO, T., TANAKA, M. (1962). Nutrition of the silkworm *Bombyx mori*, VI. Effects of concentration of sugar and protein added in artificial diets. *Sericult. Exp. Sta. Japan*, 18: 1-34.
- JANARTHANAN (1995). The nutritional quality of mulberry leaves in relation to their age and variety and its effect on silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis, Bharathidasan University, Tiruchirappalli.
- KAMIOKA, S., MUKAIYAMA, F., TAKEI, T. & ITO, T. (1971). Digestion and utilization of artificial diet by the silkworm, *Bombyx mori*, with special references to the efficiency of the diet at varying levels of dietary soybean meal. *J. Seric. Sci. Tokyo*, 40: 473-483.
- KRISHNAN, M., SUBBURATHINAM, K.M. & JANARTHANAN, S. (1995). Effect of hydrolyzed soyprotein (P-soyatox) on haemolymph protein profile, larval and pupal characters of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Sericologia*, 35: 227-235.
- KRISHNASWAMI, S., SINGH, K., RAGURAMAN, R. & GEETA DEVI (1978). Studies on the relationship between pupal weight and fecundity. Annual Report, CSR & TI, Government of India, Mysore.
- KUMARARAJ, S., VIJAYARAGHAVAN, S. & KRISHNASWAMI, S. (1972). Studies on fortification of mulberry leaves for feeding silkworms. *Indian J. Seric.*, 11: 68-72.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structure during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.
- KUMARILALITHA, TRIPATHI, A.K. & SINHA, D.P. (1992). Effect of using some food adjuncts with the larval diet on moth weight, fecundity and egg hatchability in *Antheraea mylitta* (Saturniidae : Lepidoptera). *Sericologia*, 32: 507-509.
- LEVENBOOK, L. (1985). In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds.: Kerkutt, G.A. and Gilbert, L.I.), Pergamon Press, 10: 307-346.
- MAGADUM, V., GOVINDAN, R., MAGADUM, S.B., SATENAHALLI, S.B. & NARAYASWAMY, T.K. (1993). Influence of Manta on some commercial characters of eri silkworm *Samia cynthia ricini* (Boisd). *Bull. Sericult. Res.*, 4: 67-70.

- MATHAVAN, S., BASKARAN, K., ANITHA SIRONMANI & PANDIAN, T.J. (1984). Studies on the utilization of single cell protein by the silkworm *Bombyx mori*. Entomol. Exp. Appl., 36: 61-68.
- MC CAFFERY, A.R. (1975). Food quality and quantity in relation to egg production in *Locusta migratoria migratoroides*. J. Insect. Physiol., 21: 1551-1558.
- MUKHERJEE, P.K., ROY, A.K. & CHAKRABORTY, N.C. (1983). Studies on the effect of pupal weight on fecundity and hatchability of multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Proc. Nat. Seminar on Silk Research and Development, Govt. of India, Bangalore, pp.28.
- NAGATA, M. & KOBAYASHI, J. (1990). Effect of nutrition on storage protein concentrations in the larval haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 59: 469-474.
- NAGESH, S. & DEVAIAH, M.C. (1996). Effect of "Sericare" – a feed additive on silk productivity in silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35: 67-68.
- PUROHIT, M.L., KHETRI, A.K. & AGARWAL, R.K. (1975). Effect of nutrition on fecundity, longevity and egg viability of *Laphygma exigua* Hb (Lepidoptera : Noctuidae). Indian J. Ent., 37: 7-10.
- RETNAKARAN, A. & BECK, S.D. (1968). Amino acid requirements and sulfur aminoacid metabolism in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris). Comp. Biochem. Physiol., 24: 611-619.
- RIDDIFORD, L.M. & HICE, R.H. (1985). Developmental profiles of the mRNAs for Manduca Arylphorin and two other storage proteins during the final larval instar of *Manduca sexta*. Insect Biochem., 15: 489-502.
- SAKAI, N., MORI, S., IZUMI, S., HIANO FUKUSHIMA, K., OGURA, T., MAEKAWA, H. & TOMINO, S. (1988). Structures and expression of mRNA coding for major plasma proteins of *Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Acta., 949: 224-232.
- SANTOSH KUMAR, V. (1998). Kinetin – A plant growth hormone as a growth stimulant on *Bombyx mori* L., Proceedings of Tamilnadu State Council for Science and Technology, pp.50-52.
- SENGUPTA, K., SINGH, B.C. & MUSTAFI, J.C. (1972). Nutrition of silkworm *Bombyx mori* L. I. Studies on the enrichment of mulberry leaf with various sugars, proteins, aminoacids and vitamins for vigorous growth of worms and increased cocoon crop production. Indian J. Seric., 11: 11-19.
- SUBBARAO, G., MATHUR, S.K., PRAMANIK, D.R. & ROYCHOUDHURY, N. (1989). Effect of enrichment of mulberry leaves with protein on cocoon characters and fecundity in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Nutri. Ecol. Ins. Env., 302-317.
- SUBBURATHINAM, K.M. (1995). A study on the hydrolysed soyprotein supplementation to the mulberry silkworm *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis. Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, India.
- SUBBURATHINAM, K.M., KRISHNAN, M. & SULOCHANNA CHETTY, J. (1993). Impact of minerals on the bioenergetics of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 33: 509-514.
- SUBBURATHINAM, K.M. & KRISHNAN, M. (1998). Role of Soybean Protein in silkworm nutrition. Indian Silk, 36: 9-10.
- TOJO, S., BETCHAKU, T., ZICCARDI, V.J. & WYATT, G.R. (1978). Fat body protein granules and storage protein in the silk moth, *Hyalophora cecropia*, J. Cell Biol., 78: 823-838.
- VAN EMDEN, R.F. (1973). Aphid Technology, Academic Press, London, pp.189-234.
- VANISHREE, V., NIRMALA, X. & KRISHNAN, M. (1996). Response of five different races of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae), to hydrolyzed soyprotein supplementation. Sericologia, 36: 691-698.
- ZHANG, C., XU, J.I. & WU, X.F. (1991). Effect of dietary protein level on the growth, development and reproduction of the silkworm, *Bombyx mori* L. Canye Kexue, 17: 217-222.
- ZHU, J., INDRASITH, L.S. & YAMASHITA, O. (1986). Characterization of vitellin, egg specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs and their fates during oogenesis and embryogenesis. Biochem. Biophys. Acta., 882: 427-436.

EFFET DE L'ADDITION DE CASITOSE (P & PH) SUR LE PROFIL PROTEIQUE DE L'HEMOLYMPHE ET LES CARACTERES REPRODUCTIFS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

G. RAVIKUMAR¹, U. BALASUBRAMANIAN & M. KRISHNAN²

1. Department of Zoology, A. V. V. M Sri Pushpam College, Poondi, Tamil Nadu 613 503, Inde.

2. Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli,
Tamil Nadu 620 024, Inde.

*L'étude actuelle rapporte l'effet de l'addition de casitose-P et de casitose-PH sur le profil protéique de l'hémolymphe et sur les potentiels reproductifs du ver à soie, **Bombyx mori**. D'après l'analyse de l'évaluation biologique, nous avons sélectionné trois concentrations différentes idéales de casitose-P (2,75 ; 3,00 et 3,25 %) et de casitose-PH (1,50 ; 1,75 et 2,00 %) pour l'étude du profil protéique. Les larves du 5^{ème} âge sont nourries avec des feuilles de mûrier immergées séparément dans différentes concentrations sélectionnées de casitose-P et de casitose-PH. Les caractères reproductifs tels que la longueur de l'ovariole, la fécondité, l'éclosion de l'œuf et la quantité de protéines dans l'hémolymphe s'avèrent maximum chez les groupes ayant reçu un complément de 3 pour cent de casitose-P et de 1,75 pour-cent de casitose-PH. D'après ces résultats, nous confirmons que le casitose-P et le casitose-PH hydrolysés sont des nutriments idéaux bénéfiques à l'industrie de la soie.*

INTRODUCTION

Le facteur physiologique le plus important pour la croissance du ver à soie et la production de soie est la nutrition (Nagesh et Devaiah, 1996). L'apport de feuilles de mûrier nutritionnellement riches au ver joue un rôle significatif dans le développement et la production de cocons (Horie et coll., 1967). Le développement significatif de la recherche sur la nutrition du ver à soie a commencé avec la formulation des aliments artificiels. Il y a eu un accroissement du besoin par rapport à la mise au point d'aliments artificiels parce que dans la plupart des zones tempérées du globe, les feuilles de mûrier ne sont pas disponibles pendant toute l'année et ils permettraient donc de travailler pendant toute l'année. Mais en Inde, où les feuilles de mûrier sont disponibles pendant toute l'année, on a recours à l'enrichissement des feuilles de mûrier par leur fortification. Des nutriments variés comme les protéines, les acides aminés, les minéraux, les vitamines, les hydrates de carbone, les antibiotiques, les hormones etc., ont été ajoutés au mûrier afin d'améliorer la production de soie chez *B. mori* (Horie et coll., 1971 ; Kamioka et coll., 1971 ; Mathavan et coll., 1984 ; Chauhan et Singh, 1992 ; Faruki et Khan, 1992 ; Subburathinam et coll., 1993 ; Magudam et coll., 1993 ; Krishnan et coll., 1995 ; Bongale et Krishna, 1996 ; Nagesh et Devaiah, 1996 ; Birendro Nath Saha et Aatur Rahman Khan, 1997 ; Dechu et coll., 1997 ; Santhosh Kumar, 1998). Parmi les différents compléments, les protéines du régime alimentaire ont un impact significatif sur la croissance du ver à soie, la production de soie (Ito et Tanaka, 1962 ; Ito et Mukaiyama, 1970 ; Horie et coll., 1971 ; Kamioka et coll., 1971 ; Subba Rao et coll., 1989 ; Zhang et coll., 1991) et les protéines de l'hémolymphe (Horie et Watanabe, 1983 ; Nagata et Kobayashi, 1990 ; Krishnan et coll., 1995). Un grand nombre de protéines comme le soja,

la caséine, l'albumine d'œuf, les protéines d'unicellulaire ont été utilisées comme sources de compléments (Sengupta et coll., 1972 ; Kumararaj, 1972 ; Horie et Watanabe, 1983 ; Mathavan et coll., 1984 ; Subbarao et coll., 1989). Il existe une documentation intéressante sur l'importance de la composition du régime alimentaire en acides aminés pour la reproduction des insectes chez plusieurs espèces de pucerons (Retnakaran et Beck, 1968 ; Van Emden, 1973), de moustiques adultes (Briegel, 1985) et chez les larves du papillon commercial *B. mori* (Horie et Inokuchi, 1978 ; Horie et Watanabe, 1983). De même, la production d'œufs et le poids de l'œuf chez le ver à soie, *B. mori* augmentent avec l'ajout de protéines de soja dans l'aliment artificiel (Zhang et coll., 1991). L'ajout d'acides aminés (Kumarilalitha et coll., 1992) et de protéines de soja hydrolysées (Krishnan et coll., 1995 ; Subburathinam, 1985 ; Vanishree et coll., 1996) entraîne le développement de femelles plus lourdes qui pondent plus d'œufs chez *B. mori*. L'ajout de protéines de soja hydrolysées (P-soyatosé) augmente la protéine de stockage chez le ver à soie *B. mori* (Krishnan et coll., 1995 ; Subburathinam, 1995 ; Vanishree et coll., 1996 ; Subburathinam et Krishnan, 1998). Chez les larves des insectes holométaboles, les protéines de stockage sont les principales protéines de l'hémolymphe et elles ont des fonctions importantes comme réservoir des acides aminés qui sont utilisés pour le développement larvaire et adulte (Levenbook, 1985). Nous avons donc essayé dans cette étude de déterminer l'effet de l'ajout de casitose-P et de casitose-PH sur le profil protéique de l'hémolymphe et les caractères reproductifs du ver à soie *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, des larves de *Bombyx mori* du cinquième âge venant de muer (hybride : L, un polyvoltin × NB₄D₂, un bivoltin) sont utilisées. Les protéines hydrolysées casitose-P et casitose-PH sont obtenues auprès de la *Warkerm Company*, Mumbai. Cette protéine de lait hydrolysée est soluble dans l'eau, de pH neutre et exempte de pathogènes fongiques. Pour découvrir la dose efficace, des suspensions de casitose-P et de casitose-PH sont préparées dans de l'eau distillée à des concentrations différentes de 0,5 à 5 pour-cent. Les feuilles de mûrier fraîches (MR2) avec une teneur moyenne en protéines de 17,41 ± 0,41 % sont recueillies pendant les mois de juillet à octobre. Ces feuilles sont trempées dans chacune des concentrations sélectionnées de casitose-P et de casitose-PH pendant 10 minutes (Krishnan et coll., 1995). Ces feuilles sont séchées à l'air libre, coupées et offertes en nourriture, comme la première nourriture des quatre repas de la journée (Benjamin et coll., 1983). On maintient un groupe témoin qui est nourri avec des feuilles de mûrier sans complément. On réalise l'évaluation biologique dix fois pour chaque groupe avec 50 animaux par répétition. La mortalité et le poids larvaire des larves mâles et femelles sont enregistrés chaque jour pour tous les groupes expérimentaux et témoins. A partir des analyses des évaluations biologiques, nous choisissons une fourchette étroite de cinq concentrations idéales, c'est à dire, 2,25 ; 2,50 ; 2,75 ; 3,00 et 3,25 pour cent de casitose-P et 1,25 ; 1,50 ; 1,75 ; 2,00 et 2,25 pour-cent de casitose-PH pour réaliser l'étude détaillée.

L'hémolymphe des deux sexes est recueillie quotidiennement pendant le développement des larves du cinquième âge à la fois chez les groupes expérimentaux et témoins. L'hémolymphe est recueillie dans des tubes Eppendorf, rincés avant avec une solution de phényl thiourée saturée (PTU) (en faisant une incision sur la zone distale de la patte prothoracique). Les échantillons d'hémolymphe sont dilués avec une solution salée tamponnée au phosphate (PBS) dans un rapport 1 : 5. Les échantillons d'hémolymphe diluée sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 minutes pour enlever les hémocytes et les autres débris de tissus. Les échantillons d'hémolymphe sont ensuite stockés à -20° C jusqu'à leur utilisation.

On réalise une électrophorèse pour déterminer les protéines stockées quotidiennement pendant le développement des larves du cinquième âge. On réalise une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du dodécyl sulfate de sodium (10 % de SDS-PAGE), selon la méthode de Laemmli (1970). On mesure les densités des bandes de protéines avec un micro-densitomètre (MD

1000 Carlzeiss, Allemagne). Les protéines de stockage (Sp1 et Sp2) sont identifiées de par leurs positions.

On laisse les papillons femelles qui émergent des groupes expérimentaux et témoins pondre des œufs après l'accouplement et on calcule leur fécondité séparément. Le pourcentage d'éclosion est calculé chez les groupes traités et témoins. Pour déterminer la longueur de l'ovariole, les femelles venant d'émerger des groupes à la fois expérimentaux et témoins sont anesthésiées, leur abdomen est disséqué et on mesure la longueur de chaque ovariole.

RESULTATS

Profil protéique de l'hémolymphe :

Les figures 1 et 2 montrent les résultats de l'électrophorèse SDS-PAGE pour les protéines de l'hémolymphe chez les larves du 5^{ème} âge à partir du jour 1 jusqu'au jour 7 pour le témoin et entre le 1^{er} jour et le 5^{ème} jour chez les groupes traités. On observe plusieurs polypeptides avec des poids moléculaires compris entre 200-18 kDa chez tous les groupes. Parmi eux, il y a deux régions principales 80 kDa et 30 kDa. A 80 kDa, il y a deux polypeptides SP1 (82 kDa) et Sp2 (76 et 72 kDa) et un arylphorine identifiés comme protéines de stockage. On observe la protéine de stockage 1 (SP1 : 82 kDa) en quantité abondante que dans l'hémolymphe de la femelle ; la protéine de stockage 2 (SP2 : 76 & 72 kDa) se trouve chez les deux sexes. Le groupe important de polypeptides suivant est localisé dans la zone 30 kDa avec 3 sous-unités ayant un poids moléculaire de 31,29 et 26 kDas. Il est couramment connu sous le nom de BmLSP (Protéine de Serum Larvaire *Bombyx mori*)

Chez les groupes traités, il y a une augmentation de l'intensité de la coloration des bandes de protéines au bleu de comassie. Avec le complément de casitose-P à trois pour-cent, l'intensité de coloration de la bande 82 kDa observée chez la femelle et de 76 et de 72 K chez les deux sexes, est comparativement plus importante qu'avec les niveaux de complément de 2,75 et de 3,25 %. Comme le casitose-P, le complément de casitose-PH à 1,75 pour-cent augmente l'accumulation de 82 kDa chez la femelle et de 76 et 72 kDa chez les deux sexes, plus que les niveaux de complément de PH de 1,50 et 2 pour-cent. A part SP-1 et SP-2, les peptides séparés à 30kDa augmentent dans l'hémolymphe des groupes enrichis. Cependant, l'accumulation de la protéine de stockage et de 30 kDa est plus importante chez les groupes complétés au casitose-PH qu'avec le complément de casitose-P. Le balayage au densitomètre révèle que le pic observé pour les protéines de stockage 30 kDa le 6^{ème} jour chez les larves nourries avec un supplément de 3 pour-cent de casitose-P et de casitose-PH à 1,75 pour-cent est plus ou moins égal à la zone pic de protéine stockage et aux protéines 30kDa le septième jour chez les larves témoins (Fig. 3 et 4).

Longueur de l'ovariole :

Le papillon femelle témoin venant d'émerger a une longueur d'ovariole de 126,5 mm. La longueur de l'ovariole atteint un maximum de 138,8 mm avec un niveau de 3 pour-cent mais elle baisse à 130,3 mm avec le niveau de 3,25 (Tableau I). De même, avec le complément de casitose-PH, on observe la longueur maximum de l'ovariole (140,4 mm) avec un niveau de 1,75 pour-cent. Mais elle baisse (132,7 mm) avec un niveau de 2 pour-cent (Tableau II). La longueur de l'ovariole augmente de manière significative à la fois avec le complément de casitose-P et de casitose-PH à la dose optimale.

Fécondité :

Chez le groupe témoin, le papillon femelle pond 410 œufs. La fécondité maximum est de 508 œufs / femelle avec un complément de casitose-P à 3 pour-cent, mais elle baisse (452 œufs / femelle) avec un niveau de protéines de 3,25 pour-cent (Tableau I). De même, avec un niveau de casitose-PH de 1,75 pour-cent, elle atteint le maximum de 536 œufs / femelle mais baisse (456 œufs / femelle) à un niveau de protéines de 2 pour-cent (Tableau II).

Eclosion des œufs :

L'éclosion des œufs est de 72 pour-cent chez les groupes témoins. Avec le complément de casitose-P, elle passe à 74,8 pour-cent avec un niveau de protéines de 2,25 pour-cent. On observe une éclosion maximum de 82,4 % avec un niveau de 3 pour-cent. Avec un niveau en protéines de 3,25 pour-cent, l'éclosion passe à 74,6 pour-cent (Tableau 1). Avec le complément de casitose-PH, l'éclosion de l'œuf atteint aussi un maximum de 84,6 pour-cent avec un niveau de protéines de 1,75 pour-cent et passe à 75,4 % avec un niveau de protéines de 2 %. On observe une régression curvilinéaire (Fig. 5) par rapport aux concentrations en protéines de casitose-P et de casitose-PH pour la longueur de l'ovariole, la fécondité et l'éclosion de l'œuf.

DISCUSSION

La nutrition larvaire joue un rôle vital par rapport à la production d'œufs par les insectes femelles, chez lesquels, l'azote en particulier, apparaît souvent comme un facteur limitant de la reproduction (Mc Caffery, 1975 ; Barton Browne et coll., 1979). Selon Purohit et coll., (1975), Krishnaswami et coll., (1978) et Mukherjee et coll., (1983), chez les insectes comme *B. mori*, qui ne se nourrissent pas pendant les stades nymphaux, les nutriments stockés par les larves pendant la période larvaire sont importants pour la production des œufs. Les résultats de cette étude confirment l'étude réalisée par Zhang et coll., (1991) qui montrent que la protéine de soja dans le régime alimentaire augmente la production d'œufs ainsi que le poids de l'œuf chez le ver à soie *B. mori*. Puisque la quantité de protéines est un facteur important pour la production de vitellus, l'augmentation de la concentration en protéines jusqu'à un certain niveau dans l'alimentation de l'insecte femelle peut accélérer la production d'œufs (Chapman, 1974). La supplémentation des feuilles de mûrier avec des acides aminés et de la protéine de soja hydrolysée (Kumarilalitha et coll., 1992), (Krishnan et coll., 1995 ; Subburathinam, 1995 ; Subburathinam et Krishnan, 1998) entraîne le développement de nymphes plus saines, produisant plus d'œufs. De même Cangussu et Zucolota (1992) ont aussi observé que la fécondité de *Ceratitis capitata* augmente avec un régime à base de caséine. L'augmentation de la production d'œufs observée dans cette étude souligne l'importance de la nutrition larvaire par rapport à la production d'œufs.

Dans cette étude, on constate que les concentrations de la protéine de stockage dans l'hémolymphe (Sp1 et Sp2) augmentent à la fois chez les groupes complétés au casitose-P et au casitose-PH par comparaison au témoin. Cela confirme les observations de Horie et coll., (1971) qui ont signalé que la concentration de la protéine dans l'hémolymphe augmente avec l'augmentation des protéines dans le régime alimentaire. De même, chez *B. mori* le niveau de protéine de l'hémolymphe augmente avec des niveaux en acides aminés plus élevés dans le régime alimentaire (Horie et Watanabe, 1980). Riddiford et Hice (1985) et Nagata et Kobayashi (1990) ont observé que la richesse nutritionnelle du régime alimentaire influence l'accumulation des protéines de stockage dans l'hémolymphe. La quantité de protéine de stockage chez les larves nourries avec peu de protéines est moins importante qu'avec le régime habituel, mais les larves nourries avec le niveau optimal de protéines présentent des niveaux plus élevés en protéines de stockage (Nagata et Kobayashi, 1990).

On observe un niveau plus élevé en protéines de stockage dans l'hémolymphe chez des larves à qui on a apporté du soytose-P (Krishnan et coll., 1995 ; Subburathinam, 1995). De même, Nirmala (1998) a rapporté que les protéines de l'hémolymphe comme la soie sont plus synthétisées et accumulées chez les larves du ver à soie *B. mori* nourri avec du soytose-P. Dans cette étude, nous observons aussi l'augmentation de l'accumulation de la protéine 30 kDa. Les rapports de Janarthanan (1995) s'inscrivent aussi dans cette direction en montrant que la concentration élevée en protéines de stockage et en 30 kDa dans l'hémolymphe chez *B. mori* sont dues à l'alimentation avec des feuilles riches en protéines. On pense que les 30 kDa sont activement impliquées dans la formation de granules de vitellus dans les ovocytes en développement (Zhu et coll., 1986 ; Sakai et coll., 1988 ; Chen et Yamashita, 1990 ; Fujiwara et Yamashita, 1990). Janarthanan (1995) a signalé que la synthèse du

polypeptide 30kDa pourrait être un essai de développement de l'ovaire afin d'augmenter la production d'œufs.

Dans cette étude, l'augmentation de la fécondité que l'on observe avec le complément de casitose-P et de casitose-PH pourrait être due à l'augmentation de l'accumulation des protéines de stockage dans l'hémolymph. Selon Tojo et coll., (1978) la protéine de stockage spécifique de la femelle (SP-1) s'accumule plus dans la larve femelle avant la pupaison et se convertit en protéines de la vitellogénine pendant le développement nymphal. Les résultats de cette étude montrent aussi, chez la larve femelle des groupes complétés, une augmentation de l'accumulation de SP-1 et du poids pendant la période larvaire qui donnent plus de protéines de vitellogénine. Cela pourrait être une autre raison expliquant l'augmentation de la fécondité chez les groupes ayant reçu un complément par comparaison aux témoins.

Nous déduisons, d'après cette étude, que la longueur de l'ovariole, la fécondité, l'éclosion de l'œuf et la protéine de stockage (Sp1 et Sp2) et 30kDa sont très influencées par le complément en casitose. On observe aussi que le casitose-P à 3 pour-cent et le casitose-PH à 1,75 pour-cent sont les doses optimum chez le ver à soie *B. mori*. La protéine peut aussi être recommandée pour l'industrie séricicole après avoir réalisé des essais sur le terrain.

DIFFERENTIAL *IN VITRO* FLOWERING RESPONSE OF MULBERRY SHOOT TIPS AS INFLUENCED BY MATURITY OF EXPLANTS AND MEDIA COMPOSITION

DEEPU MATHEW

Plant Tissue Culture and Molecular Biology Laboratory, Division of Horticulture,
GKVK Campus, University of Agricultural Sciences – Bangalore, South India – 560 065.

In vitro flowering on mature apical shoot explants was observed in a study to standardize the micro propagation strategies for mulberry (*Morus alba*) cv. M-5 (Mysore-5). Only mature explants has shown this phenomenon and the best results was observed on MS medium supplemented with 2 mg l⁻¹ BAP and 1 mg l⁻¹ IAA. Probable reasons of this morphogenetic response and its applications in crop improvement are discussed along with similar records.

Key words : *In vitro* flowering, *Morus*, mulberry, tissue culture.

Abbreviations: BA- 6-Benzyl Amino Purine ; IAA- Indole 3-Acetic Acid ; MS- Murashige and Skoog.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba*) is a medium sized woody perennial tree grown throughout the tropical and sub tropical regions of the world. This plant assumes the primary importance as feed for the silk worm (*Bombyx mori*). The sweet fruits are also much relished. In mulberry, the multiplication procedure so far followed is only semi-hardwood cuttings. In any crop, the aim of mass multiplication will be fulfilled only when a high frequency regeneration protocol is standardized. Few attempts for direct regeneration from leaf (Oka and Ohyama, 1981 ; Vijayan *et al.*, 2000 ; Machii, 1990 ; Saito and Katagiri, 1989 ; Hossain *et al.*, 1992 ; Ivanica, 1987 ; Jain and Datta, 1992), cotyledon (Wang *et al.*, 1996) and anther (Shoukang *et al.*, 1987) explants were carried out and indirect regeneration (Srinivasa *et al.*, 2001 ; Narayanan *et al.*, 1989) was also reported. Even though few experiments were laid out using shoot explants (Kim *et al.*, 1985 ; Chung, 1985 ; Ghugale *et al.*, 1971), the frequency of regeneration was low and the maturity level of explants to be cultured were not specified. A study was carried out to standardize the micro propagation strategies in mulberry. In the study, a unique phenomenon of *in vitro* flowering from shoot tips was observed

MATERIALS AND METHODS

Explants of freshly germinated shoots tip from axillary bud and mature shoot tips of apical origin were used in the study. Apical shoots shown a higher maturity compared to fresh axillary shoots used. *In situ* grown shoot tips were collected and sterilized using 0.1 per cent mercuric chloride followed by 70 per cent ethanol dip for 15 seconds. The explants were washed thoroughly for 5-6 times with sterile double distilled water and were cultured aseptically on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 3 per cent sucrose and different concentrations and combinations of growth regulators. The following growth regulator combinations were tried in the study:

1. 0.5 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA
2. 0.5 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ IAA
3. 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA
4. 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA
5. 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA
6. 2.0 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ IAA
7. 1.0 mg l⁻¹ Kinetin + 0.5 mg l⁻¹ IAA
8. 2.0 mg l⁻¹ Kinetin + 1.0 mg l⁻¹ IAA
9. 3.0 mg l⁻¹ Kinetin + 1.0 mg l⁻¹ IAA
10. 4.0 mg l⁻¹ Kinetin + 1.0 mg l⁻¹ IAA
11. 0.25 mg l⁻¹ zeatin + 0.25 mg l⁻¹ IAA
12. 0.5 mg l⁻¹ zeatin + 0.25 mg l⁻¹ IAA
13. 1.0 mg l⁻¹ zeatin + 0.5 mg l⁻¹ IAA
14. 2.0 mg l⁻¹ zeatin + 0.5 mg l⁻¹ IAA
15. 0.5 mg l⁻¹ BAP + 0.25 mg l⁻¹ GA₃
16. 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ GA₃
17. 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ GA₃
18. 4.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ GA₃

Cultures were incubated at 25° C and 16 hours of photoperiod. Every 5 days, explants were transferred to fresh media and observations on flowering i.e., number of shoots showing flowering, average number of flowers per shoot, type of shoots showing flowering in each treatment were recorded from 21st day of initial culture. Other tissue cultural operations were followed as per the procedure outlined by Vijayan *et al.* (2000). In this discussion emphasis is given only for *in vitro* flowering and treatments showing such a response are detailed.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Root Morphogenesis on Specified Media:

The morphogenic responses on shoot tip explants of mulberry as influenced by BAP and IAA combinations are presented in Table I. In this study only a combination of BAP and IAA growth regulators has given *in vitro* flowering. Root induction was observed from the cut ends of shoot tips at various levels. Immature axillary shoots shown a better rooting response. Few long roots were induced at the basal end of immature shoots when 0.5 mg l⁻¹ IAA was used, but no rooting was observed on mature shoots. A higher concentration of 1 mg l⁻¹ IAA has induced profuse hairy root like structures on immature shoots and few long roots on mature shoots.

Table I. *In vitro* flowering and root induction responses on shoot tip explants of mulberry (treatments showing *in vitro* flowering response are presented).

Tableau I. Floraison *in vitro* et réponses d'induction de racines avec des explants d'extrémités de pousses de mûrier (les traitements montrant une réponse de floraison *in vitro* sont présentés).

Treatments	MS medium with growth regulators (mg.l ⁻¹)	Number of explants cultured	Number of explants showing flowering	Average number of flowers induced	Number of shoots in vegetative stage	Rooting response
Traitements	Milieu MS avec des régulateurs de croissance (mg.l ⁻¹)	Nombre d'explants cultivés	Nombre d'explants présentant une floraison	Nombre moyen de fleurs induites	Nombre de pousses au stade végétatif	Réponse de racinement
I. Mature shoots of axillary origin / I. Pousses matures d'origine axillaire						
T1	0.5 BAP + 0.5 IAA	25	-	-	25	3-6 long roots 3-6 racines longues
T2	0.5 BAP + 1.0 IAA	25	-	-	25	Sparse short roots Racines courtes éparses
T3	1.0 BAP + 0.5 IAA	25	-	-	25	5-10 long roots 5-10 racines longues
T4	1.0 BAP + 1.0 IAA	25	-	-	25	Profuse hairy root growth Croissance de racines abondantes et touffues
T5	2.0 BAP + 0.5 IAA	25	-	-	25	5-8 long roots 5-8 racines longues
T6	2.0 BAP + 1.0 IAA	25	-	-	25	Profuse rooting Racinement abondant
II. Mature shoots of apical origin / II. Pousses matures d'origine apicale						
T7	0.5 BAP + 0.5 IAA	25	-	-	25	No rooting Pas de racinement
T8	0.5 BAP + 1.0 IAA	25	-	-	25	2-3 long roots 2-3 racines longues
T9	1.0 BAP + 0.5 IAA	25	8	1.875	17	No rooting Pas de racinement
T10	1.0 BAP + 1.0 IAA	25	6	2.333	19	4-7 long roots 4-7 pousses longues
T11	2.0 BAP + 0.5 IAA	25	18	2.666	7	3-4 long roots 3-4 pousses longues
T12	2.0 BAP + 1.0 IAA	25	22	3.500	3	8-12 long roots 8-12 racines longues



Fig. 1. *In vitro* flowering on mature mulberry shoot tip explant on MS medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} BAP and 0.5 mg l^{-1} IAA, after 21 days of inoculation.

Fig. 1. Floraison *in vitro* avec un explant d'extrémité de pousse de mûrier mature sur du milieu MS additionné avec $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ d'IAA 21 jours après l'inoculation.

2. Effect of explant maturity on *in vitro* flowering:

In vitro flowering was observed on mature apical current season shoot tips of eight months from six years and four months old plants inoculated on medium with BAP and IAA. The immature shoots from axillary buds failed to produce any flowering. In previous studies (Mhatre *et al.*, 1985 ; Tewary and Subba Rao, 1990) also, axillary immature shoots cultured failed to produce *in vitro* flowering. The flowers might have developed from performed flower buds already present in the tissue. On immature shoots, the apical dominance maintains a high level vegetative status. When shoot attains

maturity, a shift from vegetative to reproductive stage happens leading to induction of flower buds. This may be the reason for the presence of rudimentary flower buds on mature shoot tips. Similar result of *in vitro* flower induction on internodal explants of jasmine collected from mature orthotropic shoots is reported (Dhanraj, 1999). Jammal *et al.* (1991) also made similar observations in spinach cultures and opined that the stimulus for flowering might be produced in the shoot region without the involvement of roots. In this study also, flowering was observed on mature explants inoculated on MS medium with different levels of BAP and 0.5 mg l^{-1} IAA with no root induction; substantiating the statement that root activity is not the reason for flower induction (Plate 1). Both male and female flowers were observed and its ratio was not influenced by growth regulators and no sex reversal was observed.

In the field, the flower buds are produced on mature stems in mulberry and flowering is influenced by the availability of nutrients. Under *in vitro* conditions, availability of nutrients will not be a problem, which leads to ready out-burst of flower buds. After a certain level of growth, the nutrients absorbed along the cut end of shoot bud will not be sufficient to maintain the vegetative and reproductive growth simultaneously. These conditions might have led to the drying up of the induced flower on shoots with no roots (Plate 1). In such cultures early yellowing of leaves was observed perhaps due to lesser availability of nutrients or by the enhanced ethylene production by withering flowers.

3. Effect of growth regulators on *in vitro* flowering:

Medium with a higher level of cytokinin has induced higher number of flowers per explants (plate 2). This is in accordance with the results of previous *in vitro* flowering reports (Scorza and Janick, 1978 and 1980 and Scorza, 1979) which argued that cytokinin is a must for *in vitro* flowering. A high-level cytokinin can induce flower from a bud, which remains dormant at lower concentration (Scorza, 1979). The use of IAA in combination with BAP in inducing shoot proliferation is already discussed. The efficiency of IAA and Kinetin interaction on bringing out *in vitro* flowering is reported (Tepfer *et al.*, 1966). IAA shifts the protein synthesis and favour morphological developments in the plant system (Wardell and Skoog, 1969). This may be the reason for development of other wise dormant flower bud. *In vitro* flowering is also reported to be the result of a combination of hormones (Van, 1980).

4. Similar reports and applications in crop improvement:

The unique phenomenon of *in vitro* flowering is already reported in other tree species such as citrus (Tisserat *et al.*, 1990) and Japanese pear (Higashiuchi *et al.*, 1990; Tsujikawa *et al.*, 1990). In potato, flowering from the callus cultures is reported (Hassan *et al.*, 1989; Al-Warch *et al.*, 1989). In seed producing species such as Nicotiana (Dien and Van, 1974), passion fruit (Scorza and Janick, 1978 and 1980, Scorza, 1979), streptocarpus (Handro, 1983; Siromonds, 1987) and syringa (Skrzypczak, 1992), this phenomenon can be efficiently used in crop husbandry by ensuring the purity of pollen by *in vitro* pollination strategies; opening a wide avenue of crop breeding. Breeding process in amaranthus (Brent and Paul, 1998) in which *in vitro* self pollination and seed germination is reported, spinach (Jammal *et al.*, 1991), cucumber (Msikita *et al.*, 1990), cichory (Bais *et al.*, 2000), *Brassica napus* (Koh and Loh, 2000) and garden pea (Franklin *et al.*, 2000) could be accelerated due to the assured purity in crosses. In essential oil producing plants such as rose (Susmita and Debata, 1996) and jasmine (Dhanraj, 1999), oils with high level purity can be obtained within a short span. In flowering ornamentals such as kalanchoe (Dickens *et al.*, 1990) and dimorpotheca (Al-Atabee and Power, 1990), non flowering ornamentals such as panax (Tang, 2000) and chenopodium (Mitrovic *et al.*, 2000) and field crops such as pearl millet (Devi *et al.*, 1990), this assumes lot of applications in breeding. Bamboo is unique for its monocarpic flowering. *In vitro* flowering reduces the time-required for flowering from many years to 2 months (Gielis and Raichaudhuri, 1999). Right

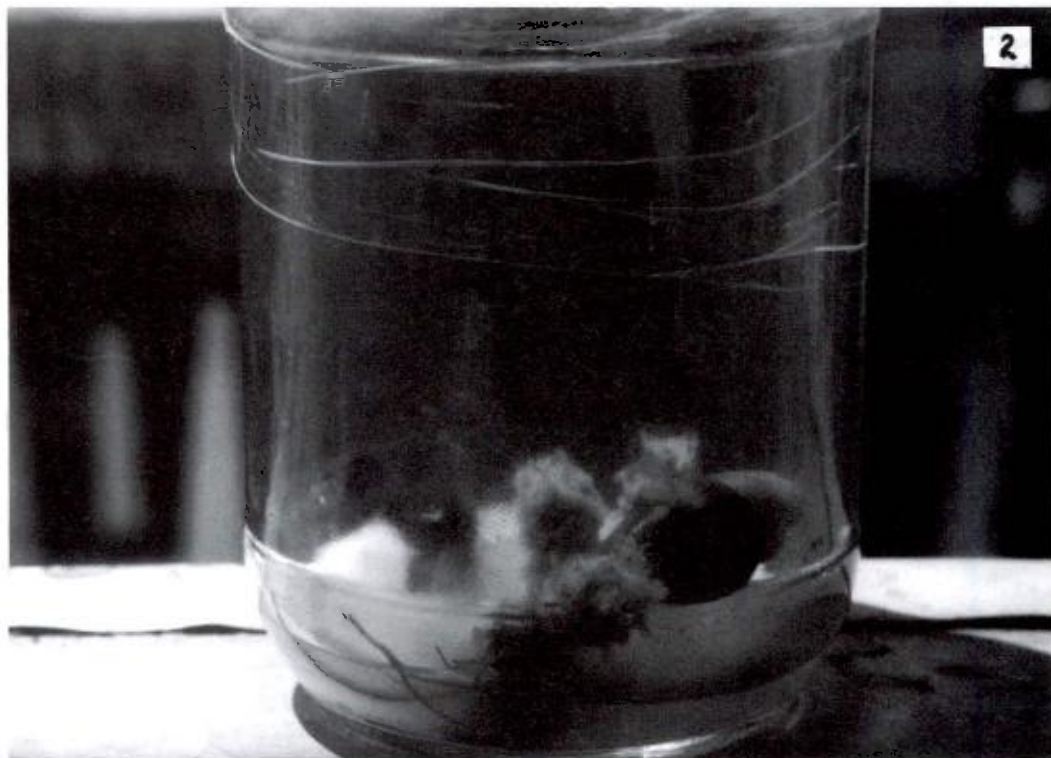


Fig 2. *In vitro* flowering on mature mulberry shoot tip on MS medium supplemented with 2.0 mg l⁻¹ IAA, 21 days after inoculation.

Fig 2. Floraison in vitro de l'extrémité de pousse de mûrier mature sur du milieu MS additionné avec 2 mg l⁻¹ de BAP et 1,0 mg d'IAA, 21 jours après l'inoculation.

from the first reported tissue culture experiment in mulberry (Ohyama, 1970), no *in vitro* flowering is reported so far.

In mulberry the flowers will not set seeds but produce fruits parthenocarpically. *In vitro* flowering can be used to harvest high quality fruits, to study the mechanism of flowering and the response of phytochrome to flowering (Handro, 1983, Simmonds, 1987).

REFERENCES

- AL-ATABEE, J.S., & POWER, J.B. (1990) control of nitrification and *in vitro* flowering of plantlets regenerated from callus of *Dimorphotheeca aurantiaca*. J. Plant Physiol., 136 : 705-709.
- AL-WAREH, H., TOLINDER, N.L. AND GOODIN, J.R. (1989) *In vitro* flowering in potato. Hort. Sci., 24 : 827-829.
- BAIS, H.P., SUDHA, G.S. & GOKARÉ, A.R. (2000) Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. J. Plant Growth Reg., 19 : 238-248.

- BRENT, T. & PAUL, D. (1998) *In vitro* flowering in *Amaranthus*. Hort. Sci., 23 : 210-212.
- CHUNG, J.S. (1985) Tissue culture of winter shoots of baigelu mulberry (*Morus ihou* Koidz). Trees. Sanxi Agri. Sci., 3: 17-18.
- DEVI, P., ZONG, H. & STICKLEN, M.B. (1990) *In vitro* morphogenesis of pearl millet, Efficient production of multiple shoots and inflorescence from shoot apices. Plant Cell Rep., 19 : 546-550.
- DHAN RAJ, A.L. (1999) *In vitro* flowering in *Jasminum sambac* var. *aryaneanum* (Udupi Mallige). Indian Perfumer, 43 : 88-92.
- DICKENS, C.W.S., STADEN, J. VAN. & VAN, STADEN, J., (1990) *In vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana*. The effect of growth regulators and gallic acid. Plant Cell Physiol., 31 : 757-762.
- DIEN, N.T. & VAN, T.T. (1974) Differentiation in vitro et de novo d'organes floraux directement a partir des couches minces de cellules de type epidermique de *Nicotiana tobacum*. Etude au microscopie cellulaire. Canadian J. Bot., 52 : 2319-2322.
- FRANKLIN, G., PLUS, P.K. & IGNACIMUTHU, S. (2000). Factors affecting in vitro flowering and fruiting of garden pea. Euphytica, 115 : 65-73.
- GJELIS, J. & RAAICHAUDHURI, S.P. (1999) Micro propagation and in vitro flowering of temperature and tropical woody bamboos. In : Biotechnology and plant protection in forestry sciences (Ed.) Maromorosch, K. 13-18.
- GHUGALE, O.D., KULKARNI, O. & NARASIMHAN, R. (1971). Clonal propagation of *Morus alba*. Indian J. Exp. Biol., 9 : 381-384.
- HOSSAIN, M., RAHMAN, S.M., ZAMAN, A., JOARDEL, I. & ISLAM, R. (1992). Micropropagation of *Morus laevigata* Wall. from mature trees. Plant Cell Rep., 11 : 522-524.
- HANDRO, W. (1993) Effect of some growth regulators on the *in vitro* flowering of *Streptocarpus nobilis*. Plant Cell Rep., 2 : 133-136.
- HASSAN, A.L., NORMAN, L. & GOODIN, J.R. (1989) *In vitro* flowering in potato. Hort. Sci., 24 : 827-829.
- HIGASHIUCHI, Y., KIDO, K., ICHLL, NAKANISHI, T., KAWAI, Y. & OZAKI, T. (1990) .The effect of GA and growth retardants on in vitro flowering of the vegetative apex of japanese pear. Sci. Hort., 41 : 223-232.
- IVANICKA, J. (1987). In vitro micro propagation of mulberry (*Morus nigra* L.). Sci. Hort., 32 : 33-39.
- JAIN, A.K. & DATTA, R.K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 29 : 43.
- JAMMEL, M., AL-KHAYRI, FENG DANG, H. & TEDDY, M.E. (1991) *In vitro* flowering in the regenerated shoots of spinach. Hort Sci., 26 : 323-326.
- KIM, H.R., PATEL, K.R. & THORPE, T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146 : 335.
- KOH, W.L. & LOH, C.S. (2000) Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and in vitro flowering in rapid-cycling *Brassic napus*. Plant Cell Rep., 19 : 1177-1183.
- MACHII, H. (1990) Leaf disc transformation of mulberry plant (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium* T1 plasmid. J. Ser. Sci. Japan, 59 : 105.
- MHATRE, M., BAPET, V.A. & RAO, P.S (1985) Regeneration of plants from culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Rep., 4 : 78-80.
- MITROVIĆ, A., ZIVANOVIC, B. & CULAFIC, L. (2000) The effect of photo period, glucose and GA on growth in vitro and flowering of *Chenopodium murale*. Biologia Plantarum, 43 : 173-177.
- MSIKITA, W., SKIVUIN, R.M., JUVIK, J.A., SPLITTATOESSER, W.E. & ALI, N. (1990). Regeneration and flowering in vitro of Burpless hybrid cucumber cultured from excised seed. Hort. Sci., 25 : 474-477.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid bio assays with the tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15 : 473-497.
- NARAYAN, P., CHAKRABORTI, S. & RAO, G.S. (1989) Regeneration of plantlets from callus of stem segments of mature plant of *Morus alba* L. Proc. Indian Natl. Acad., B-55, 5 & 6 : 469 – 472.
- OHYAMA, K. (1970) Tissue culture in mulberry tree. JARQ, 5 : 30-34.

- OKA, S. & OHYAMA, K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of BA in leaf tissues of mulberry (*Morus alba* L.) Canadian J. Bot., 59 : 68.
- SCITO, H & KATAGIRI, K. (1989) Adventitious bud induction in leaves isolated from winter buds of mulberry. J. Ser. Sci. Japan, 58 : 197.
- SCORZA, R. (1979) *In vitro* flowering of *Passiflora suberoa* L. ;Ph.D. Thesis, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
- SCORZA, R. & JANCK, J. (1978) *In vitro* flowering in *Passiflora*. Hort. Sci., 13 : 385.
- SCORZA, R. & JANCK, J. (1980) *In vitro* flowering in *passiflora suberoa*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105 : 892-897.
- SHOUKANG, L., DON FENG, J. & JUN, Q. (1987) *In vitro* production of haploid plants from mulberry (*Morus*)anther culture.Sci. Sinica, 30 : 853.
- SIMMONDS, J. (1987) IAA inhibition of *in vitro* flowering of the short day plant *Streptocarpus nobilis*. An effect on the maintance of induction. J. Plant Physiol., 131 : 191-199.
- SKRZYPEZAK, E. (1992) Micro propagation of *Syringa vulgaris* cultivars. *Arboratum Kornickie*, 37 : 21-41.
- SRINIVASA, M.N., REVANASIDDAIAH, H.M., GAYATRI, M.C. & KAVYASHREE, R. (2001) Indirect organogenesis through stem callus in mulberry variety Bekhampur Local. *Sericologia*, 41 : 101-104.
- SUSMITA, & DEBATA, B.K. (1996) Micropropagation and in vitro flowering in the miniature rose "The Fairy", National symposium of Horticultural Bio technology, India, Page. 13.
- TANG, W. (2000) High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and in vitro flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. Plant Cell Rep., 19 : 727-732.
- TEPFER, S.S., KARPOFF, A.J. & JONES, D. (1990) *In vitro* flowering from citrus limon lateral buds. J. Plant Physiol., 136 : 56-60.
- TEWARI, P.K. & SUBBA RAO, G. (1990) multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Indian J. For., 13 : 109-111.
- TSUJIKAWA, T., ICHII, T., NAKANISHI, T., OZAKI, T. & KAWAI, Y. (1990) *In vitro* flowering of japanese pear and the effect of GA 4+ 7. Sci. Hort., 41 : 233-245.
- VAN, T.T.K. (1980) Control of morphogenesis on what shapes a group of cells ? Plant Cell Cultures, Fiechter (ed.) Pg. 151-171.
- VIJAYAN, K., CHAKRABORTI, S.P. & ROY, B.N. (2000). Plant regeneration from leaf explants of mulberry. Influence of sugar, genotype and BA. Indian J. Exp. Biol., 38 : 504-508.
- WANG,Y.,CHEN, A.Y. & NI, G.E. (1996).Factors influencing the formation of adventitious buds on mulberry cotyledons .*Sericologia*, 36 : 321.
- WARDELL, W.C. & SKOOG, F. (1969) Flower formation in excised tobacco stem segments. I. Methodology and effects of plant hormones. Plant Physiol., 52 : 215-220.

REPONSE DIFFERENTIELLE DE FLORAISON D'EXTREMITES DE POUSSES DE MURIER *IN VITRO* EN FONCTION DE LA MATURITE DES EXPLANTS ET DE LA COMPOSITION DES MILIEUX

DEEPU MATHEW

Plant Tissue Culture and Molecular Biology Laboratory, Division of Horticulture,
GKVK Campus, University of Agricultural Sciences – Bangalore, Inde du Sud.

Dans cette étude de standardisation des stratégies de micro multiplication chez le cv. M-5 (Mysore-5) du mûrier (Morus alba), nous avons observé la floraison in vitro des explants de pousses apicales matures. Seuls les explants matures présentent ce phénomène et les meilleurs résultats sont observés sur le milieu MS additionné de 2 mg l⁻¹ de BAP et 1 mg l⁻¹ d'IAA. Nous exposons les raisons probables expliquant cette réponse morphogénétique et présentons les résultats proches et les applications pour l'amélioration de la culture ainsi que.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba*) est un arbre vivace ligneux, de taille moyenne, cultivé dans toutes les régions tropicales et sub-tropicales du globe. Cette plante a une importance primordiale car elle constitue la nourriture du ver à soie (*Bombyx mori*). Les fruits sucrés sont aussi très appréciés. Chez le mûrier, jusqu'à présent on n'utilise qu'une procédure de multiplication avec des boutures de bois semi dur. Chez n'importe quelle culture, on atteint le but de la multiplication en masse que lorsqu'on a mis au point un protocole de régénération à fréquence élevée. Peu d'essais de régénération directe ont été réalisés à partir d'explants de la feuille (Oka et Ohyama, 1981 ; Vijayan et coll., 2000 ; Machii, 1990 ; Saito et Katagiri, 1989 ; Hossain et coll., 1992 ; Ivanica, 1987 ; Jain et Datta, 1992), de cotylédon (Wang et coll., 1996) et de l'anthère (Shoukang et coll., 1987). On a aussi rapporté des essais de régénération indirecte (Srinivasa et coll., 2001 ; Narayanan et coll., 1989). Bien que peu d'expériences aient été conçues en utilisant des explants de pousses (Kim et coll., 1985 ; Chung, 1985 ; Ghugale et coll., 1971), la fréquence de régénération que l'on observe est faible et le niveau de maturité des explants à cultiver n'est pas précisé. Nous avons donc réalisé une étude pour normaliser les stratégies de micro propagation chez le mûrier. Dans l'étude, on observe un phénomène unique de floraison *in vitro* à partir d'extrémités de pousses.

MATERIELS ET METHODES

Les explants d'extrémités de pousses fraîchement germées à partir d'un bourgeon axillaire et d'extrémités de pousses matures d'origine apicale sont utilisés dans l'étude. Les pousses apicales présentent une maturité plus élevée par comparaison aux pousses axillaires fraîches utilisées. Les extrémités de pousses cultivées *in situ* sont recueillies et stérilisées en utilisant du chlorure mercurique à 0,1 % puis sont trempées dans de l'éthanol à soixante dix pour cent pendant 15 secondes. Les explants sont lavés avec soins 5 à 6 fois dans de l'eau bi-distillée stérilisée et sont cultivés de manière aseptique

sur du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) complété avec 3 pour cent de saccharose et des combinaisons de régulateurs de croissance à différentes concentrations. Les combinaisons de régulateurs de croissance suivantes sont essayées dans l'étude :

1. 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
2. 0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l⁻¹ IAA
3. 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
4. 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
5. 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
6. 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l⁻¹ IAA
7. 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
8. 2.0 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l⁻¹ IAA
9. 3.0 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l⁻¹ IAA
10. 4.0 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l⁻¹ IAA
11. 0.25 mg/l zeatin + 0.25 mg/l⁻¹ IAA
12. 0.5 mg/l zeatin + 0.25 mg/l⁻¹ IAA
13. 1.0 mg/l zeatin + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
14. 2.0 mg/l zeatin + 0.5 mg/l⁻¹ IAA
15. 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l⁻¹ GA3
16. 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ GA3
17. 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ GA3
18. 4.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l⁻¹ GA3

Les cultures sont incubées à 25° C et sous une photopériode de 16 heures. Tous les 5 jours, on transfère les explants sur du milieu frais et on enregistre les observations 21 jours après la culture initiale, sur la floraison, c'est à dire le nombre de pousses présentant une floraison, le nombre moyen de fleurs par pousse et le type de pousses présentant une floraison pour chaque traitement. Les autres opérations de culture des tissus sont suivies d'après la méthode mise au point par Vijayan et coll., (2000). Dans cette étude, nous nous sommes seulement penchés sur la floraison *in vitro* et nous présentons les traitements avec ce type de réponse.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Morphogénèse de la racine sur des milieux spécifiés :

Les réponses morphogéniques sur des explants à partir d'extrémités de pousses de mûrier en fonction des combinaisons de BAP et d'IAA sont présentées dans le Tableau I. Dans cette étude, seule une combinaison de régulateurs de croissance avec du BAP et de l'IAA donne une floraison *in vitro*. On observe une induction de racines à des niveaux variés à partir de bouts d'extrémités de pousses coupés. Les pousses axillaires immatures présentent une meilleure réponse de racinement. L'utilisation de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ d'IAA induit peu de racines longues à l'extrémité basale des pousses immatures, mais on n'observe pas de racinement sur les pousses matures. Une concentration plus élevée de 1 mg l^{-1} d'IAA induit des structures ressemblant à des racines touffues abondantes sur les pousses immatures et quelques racines longues sur les pousses matures.

2. Effet de la maturité des explants sur la floraison *in vitro* :

On observe une floraison *in vitro* sur les extrémités de pousses matures apicales de la saison en cours âgées de huit mois obtenues sur des plants âgés de six ans et quatre mois inoculées dans du milieu avec du BAP et de l'IAA. Les pousses immatures provenant de bourgeons axillaires ne donnent pas de floraison. Dans les études précédentes (Mhatre et coll., 1985 ; Tewary et Subba Rao, 1990) aussi, les pousses axillaires immatures n'arrivent pas à produire de floraison *in vitro*. Les fleurs pourraient s'être développées à partir de bourgeons de fleurs formés, déjà présents dans le tissu. Sur les pousses immatures, le sommet apical maintient un état végétatif à un niveau élevé. Quand les pousses atteignent la maturité, un changement du stade végétatif au stade reproductif se produit entraînant l'induction de bourgeons de fleurs. Cela pourrait être la raison expliquant la présence de bourgeons de fleurs rudimentaires sur les extrémités des pousses matures. Des résultats similaires d'induction de fleurs *in vitro* avec des explants internodaux de jasmin recueillis sur des pousses orthotropiques matures ont été signalés (Dhanraj, 1999). Jammal et coll., (1991) ont aussi fait des observations similaires sur les cultures d'épinard et suggéré que la stimulation de la floraison pourrait être produite dans la zone de la pousse sans implication de racines. Dans cette étude aussi, on observe une floraison sur des explants matures inoculés dans du milieu MS avec différents niveaux de BAP et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ d'IAA sans induction de racines ; ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'activité de la racine n'est pas la cause d'induction de fleurs (Planche 1). On observe à la fois des fleurs mâles et femelles et leur rapport n'est pas influencé par les régulateurs de croissance et on n'observe pas de réversion du sexe.

Sur le terrain, les bourgeons de fleurs sont produits sur des tiges matures de mûrier et la floraison est influencée par la disponibilité en nutriments. Dans les conditions *in vitro*, la disponibilité en nutriments n'est pas un problème, ce qui entraîne une explosion rapide du nombre de bourgeons de fleurs. Après un certain niveau de croissance, les nutriments absorbés le long de l'extrémité coupée de la pousse de bourgeon ne seront pas suffisants pour maintenir simultanément les croissances végétative et reproductive. Ces conditions pourraient avoir conduit au dessèchement des fleurs induites sur les pousses sans racines (Planche 1). Chez de telles cultures, on observe un jaunissement prématuré des feuilles, qui est peut-être dû à la moindre disponibilité en nutriments ou à l'augmentation de la production d'éthylène par les fleurs flétries.

3. Effet des régulateurs de croissance sur la floraison *in vitro* :

Le milieu avec le niveau le plus élevé en cytokinine induit un nombre plus élevé de fleurs par explant (planche 2). Cela confirme les résultats de rapports précédents sur la floraison *in vitro* (Scorza et Janick, 1978 et 1980 et Scorza, 1979) qui montrent que la cytokinine est nécessaire pour la floraison *in vitro*. Un niveau élevé de cytokinines peut induire une fleur à partir d'un bourgeon, qui demeure dormant à une concentration plus faible (Scorza, 1979). On a déjà évalué l'utilisation d'IAA en

combinaison avec du BAP pour induire la prolifération de pousses. On a rapporté l'efficacité de l'interaction entre l'IAA et la kinétine pour engendrer une floraison *in vitro* (Tepfer et coll., 1966). L'IAA déplace la synthèse de protéines et favorise les développements morphologiques dans le système de la plante (Wardell et Skoog, 1969). Cela pourrait être la raison expliquant le développement de bourgeons de fleurs normalement dormants. On a aussi signalé que la floraison *in vitro* résulte d'une combinaison d'hormones (Van, 1980).

4. Rapports similaires et applications pour l'amélioration des cultures :

On a déjà rapporté un phénomène unique de floraison *in vitro* chez d'autres espèces d'arbres tels que le citronnier (Tisserat et coll., 1990) et le poirier japonais (Higashiuchi et coll., 1990, Tsujikawa et coll., 1990). Chez la pomme de terre, la floraison a été obtenue à partir de cultures de cals (Hassan et coll., 1989 ; Al-Warch et coll., 1989). Chez les espèces produisant des graines telles que *nicotiana* (Dien et Van, 1974), le fruit de la passion (Schorza et Janick, 1978 et 1980, Scorza, 1979), *streptocarpus* (Handro, 1983 ; Siromonds, 1987) et *syringa* (Skrzypezak, 1992), ce phénomène peut être utilisé efficacement dans la gestion des cultures grâce à des stratégies de pollinisation *in vitro* en raison de la pureté du pollen ; ce qui laisse de grandes possibilités de lignage des cultures. Les processus de lignage de l'amarante (Brent et Paul, 1998) chez laquelle on a rapporté une auto-pollinisation et une germination des graines *in vitro*, de l'épinard (Jammel et coll., 1991), du concombre (Msikita et coll., 1990), de la chicorée (Bais et coll., 2000), de *Brassica napus* (Koh et Loh, 2000) et du pois du jardin (Franklin et coll., 2000) pourraient être accélérés grâce à l'assurance de la pureté des croisements. Chez les plantes produisant de l'huile essentielle telles que la rose (Susmita et Debata, 1996) et le jasmin (Dhanraj, 1999), on peut obtenir des huiles avec un niveau de pureté élevé en un court laps de temps. Chez les fleurs ornementales telles que le kalanchoe (Dickens et coll., 1990) et le dimorpotheca (Al-Atabee et Power, 1990), les plantes ornementales sans fleurs telles que le panax (Tang, 2000) et le chénopode (Mitrovic et coll., 2000) et les cultures de champ telles que le millet (Devi et coll., 1990), il existe de nombreuses applications pour le lignage. Le bambou est unique en raison de sa floraison monocarpique. La floraison *in vitro* réduit le temps nécessaire à la floraison à 2 mois au lieu de nombreuses années (Gielis et Raichaudhuri, 1999). Depuis la première expérience de culture des tissus rapportée chez le mûrier (Ohyama, 1970) on n'a pas obtenu de floraison *in vitro* jusqu'à présent.

Chez le mûrier, les fleurs ne produisent pas de graines mais produisent des fruits de manière parthénocarpique. La floraison *in vitro* peut être utilisée pour récolter des fruits de qualité élevée, pour étudier le mécanisme de floraison et la réponse du phytochrome à la floraison (Handro, 1983, Simmonds, 1987).

EFFECT OF SERIBOOST ON YIELD ATTRIBUTES, LEAF YIELD OF MULBERRY AND SOME COMMERCIAL CHARACTERS OF SILKWORM

N.R. SINGHVI, A. SARKAR & R.K. DATTA

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

Foliar application of Seriboost, a triacontanol-based formulation containing multi-micromutrients was found effective to favour physiological processes which contribute to yield efficiency of mulberry plants. The application of Seriboost* at a concentration of 2.5ml/l in two sprays/crop (sprayed on 25th and 32nd day) was found to be optimum in improving general growth pattern, leaf yield and leaf quality. Biochemical analysis with respect to leaf nutrient (N, P, K, Mn, Fe, Zn and Cu) and pigment content revealed that highest increase was recorded in treatment of 2.5 ml/l except iron content that was higher, though insignificant, in treatment 3.0 ml/l. However, potassium content remained unchanged in treated as well as control plants. Feeding of Seriboost* treated leaves to bivoltine hybrid CSR2 × CSR4 resulted in improved commercial characteristics of silkworm. Estimated cost benefit ratio was found to be 1:2.744.*

Keywords: Mulberry, Seriboost, leaf yield, nutrient uptake, pigment, leaf quality, bioassay, silkworm growth, cost : benefit ratio.

INTRODUCTION

Mulberry is a foliage crop, grown as exclusive food of silkworm, *Bombyx mori* L. The production of quality mulberry leaves thus plays an important role in silk production and economics (Singhvi *et al.*, 2000). Improvement in production involves, first and foremost the exploitation of genetic potential of mulberry. Production of a crop, to a large extent, depends upon the interaction between genetic potential of the plants and the environment in which they grow (Menon and Srivastava, 1984; Leopold and Kriedman, 1988). The environment normally influences the physiological processes by controlling the yield attributes of the plant (Misra, 1995). The concept of increasing crop production by use of macronutrients appears to have reached a plateau (Ramdas and Reddy, 1988) but there exists possibilities of increasing the productivity further through the application of plant hormones (Nanja Reddy and Prasad, 1999). Use of growth regulators has been suggested as one of the biotechnologies for enhanced crop productivity (Malik, 1998). Growth regulators like triacontanol, gibberellic acid, salicylic acid and auxin were found to enhance yield in mulberry (Mishra *et al.*, 1993; Misra *et al.*, 1995; Tikku and Bindroo, 1996; Nanja Reddy and Prasad, 1999; Singhvi *et al.*, 2001, 2002). Foliar application of micronutrients has also been reported to improve leaf productivity and quality in mulberry (Lokanath and Shivashankar, 1986 a; Singhvi *et al.*, 1996) and, silkworm growth and productivity (Lokanath and Shivashankar, 1986 b; Bose *et al.*, 1995; Singhvi *et al.*, 1996).

Growth promoters not only influence various growth processes of plant but also the silkworm growth and development (Nanja Reddy and Prasad, 1999). Quality mulberry leaf production through foliar application of growth regulators played an important role in silkworm development and cocoon

productivity (Boraiah, 1986). Few reports are available on effect of triacontanol-based formulations on mulberry leaf yield and economic characters of silkworm (Mishra *et al.*, 1993; Setua *et al.*, 1998; Nanja Reddy and Prasad, 1999). However, reports are scanty about effect of combined application of triacontanol and micronutrients on mulberry. The present study is therefore, aimed at finding out the efficacy of *Seriboost**, a triacontanol containing multi-micronutrient formulation on yield attributes, leaf yield and quality of mulberry leaves and influence of feeding *Seriboost** sprayed leaves on important commercial characters of silkworm.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, during the year 2000 with mulberry variety V-1 raised in paired row system with spacing of (90 + 150) x 60 cm. Experiment was laid out in randomized block design with four replications. Fertilizers were applied at a doses 350: 140: 140 kg NPK/ha/yr along with a basal dose of farmyard manure (20 t/ha/yr). A series of experiments were conducted. The first experiment was conducted to find out the optimum dose of *Seriboost** and the second one for deciding the number of sprays. The doses tried were 2.0, 2.5 and 3.0 ml/l. Spray volume was fixed at 500 litres of aqueous solution of *Seriboost** per hectare. Initially the treatment schedule consisted of three foliar sprays of each dose of *Seriboost** on 18th, 25th and 32nd days after pruning. Spraying was done in the morning hours. Control plants were sprayed with water. Data on yield attributes, leaf yield and chemical analyses were recorded.

The second experiment was conducted with only the most effective dose of *Seriboost** with varied number of sprays i. e., one (on 25th day after pruning), two (on 25th and 32nd day after pruning) and three sprays (on 18th, 25th and 32nd day after pruning) along with water spray as control. Leaf yield data were recorded and evaluated. The duration of each crop, for both the experiments, was considered to be 70 days/crop and harvesting done by shoot pruning. Data on leaf yield were recorded by separating leaves from the shoots under both the experiments. Chlorophyll 'a', 'b', total chlorophyll and carotenoids content were estimated by dimethyl sulfoxide (DMSO) method (Ronen and Galun, 1984). The leaf samples collected from treated as well as control plants were dried at 60° C, powdered, sieved and used for analysis of nitrogen following microkjeldahl method (Piper, 1942) using Tecator make Kjeltac system. Phosphorus and potassium content were estimated following the methodology of Jackson (1973). Iron, manganese, zinc and copper were estimated using atomic absorption spectrophotometer (AS GBC 902) as per Tandon (1993).

After ascertaining the most effective dose and number of sprays bioassay study was conducted in the third experiment where the leaves were sprayed with *Seriboost** and fed to bivoltine mulberry silkworm hybrid CSR2 x CSR4. Four cellular batches were maintained for each treatment. Observations on cocoon yield and commercial characters were also recorded. Data were analyzed statistically as per Panse and Sukhatme (1961). The cost : benefit ratio was also calculated based on the prevailing market rate.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of *Seriboost** on yield attributes:

Data presented in Table I revealed positive effect of *Seriboost** on the general growth pattern of mulberry. Plant height, length of shoots, number of leaves/plant and stem yield were significantly improved over control by foliar application of *Seriboost**. However, improvement in number of shoots/plant was insignificant. Maximum increase was recorded in treatment 2.5 ml/l for all the parameters. These findings are in strong agreement with the earlier observations of Mishra *et al.* (1993)

* Registered trade name of product from M/s Sricare, Bangalore, India.

and Tikku and Bindroo (1996) in mulberry where increase in yield attributes were recorded due to application of triacontanol formulations. Lokanath and Shivashankar (1986 a) and Singhvi *et al.* (1996) reported increased growth of mulberry due to foliar application of micronutrients. Increase in growth of mulberry recorded in the present study may be attributed to combined effect of triacontanol and micronutrients present in Seriboost*.

Effect of Seriboost* on leaf yield:

Mulberry responded well to the Seriboost* application. All the treatments significantly increased the leaf yield of mulberry over the control (Fig. 1). Of the three doses, Seriboost* treatment at a concentration of 2.5 ml/l increased the leaf yield to the maximum extent and there was an increase of 12.9% over the control followed by 8.2% and 6.24% for 3.0 ml/l and 2.0 ml/l respectively. These results find support from earlier work on triacontanol (Bindroo and Trag, 1996). The productivity of crop primarily depends upon the yield attributing characters such as number of leaves/plant, length of leaf bearing shoot etc. (Nanja Reddy and Prasad, 1999). Improvement in leaf yield recorded in present study can be attributed to the promotory effect exhibited by Seriboost* treatment on various yield-attributing parameters.

Table I. Effect of foliar spray of Seriboost* (sprayed on 18th, 25th and 32nd day after pruning) on growth parameters in mulberry- variety V-1.

Tableau I. Effet de la vaporisation foliaire de Seriboost (vaporisé le 18ème, le 25ème et le 32ème jour après la taille) sur les paramètres de croissance de la variété de mûrier V-1.

Treatment ml/l	Plant height (cm)	Shoots/ plant	Average shoot length (cm)	Cumulative Shoot length (cm)	Leaves/ plant	Stem yield/plant (g)
<i>Traitement ml/l</i>	<i>Hauteur de la plante (cm)</i>	<i>Pousses / plant</i>	<i>Longueur moyenne de la pousse (cm)</i>	<i>Longueur cumulée de la pousse (cm)</i>	<i>Feuilles / plant</i>	<i>Rendement en tige / plant (g)</i>
Control / Témoin	171.20	7.1	125.08	888.1	122.50	321.25
2.0	191.80	7.5	148.39	1112.93	165.10	438.50
2.5	196.75	7.65	154.26	1180.89	178.30	495.50
3.0	193.00	7.55	153.86	1161.6	162.25	491.25
F	**	NS	**	**	**	**
CD at 5%	8.44	-	8.77	186.49	26.933	84.56
CV %	7.086	27.686	186.49	28.15	27.08	30.59

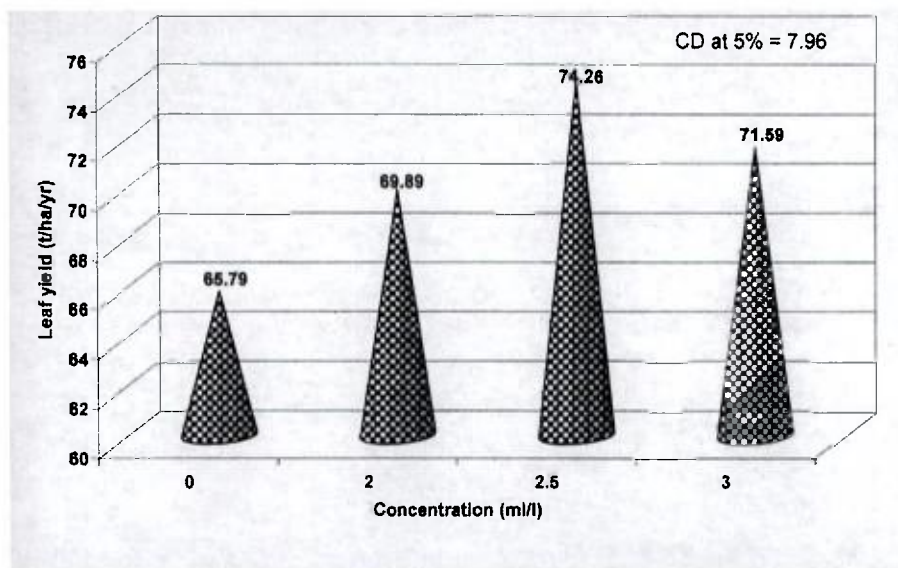


Fig. 1. Effect of *Seriboost* on leaf yield in mulberry - variety V-1.

Fig. 1. Effet du *Seriboost* sur le rendement foliaire chez le mûrier - variété V-1.

Effect of *Seriboost** treatment on nutrient uptake:

Data presented in Table II showed that nitrogen and phosphorus content increased in mulberry leaves when sprayed with *Seriboost**. Maximum values of leaf nitrogen content (4.69%) was recorded in plants sprayed with 2.5/3.0 ml/l *Seriboost** as compared to 3.93% in control, 4.32% in plants sprayed with *Seriboost** at a concentration of 2.0 ml/l. The phosphorus content was maximum in leaves sprayed with doses of 2.0 and 2.5 ml/l (0.2%) as compared to control (0.15%) and 3.0 ml/l (0.155%). However, potassium content remained unchanged at 1.75% in treated as well as control plants. Zinc and manganese content were maximum in 2.5 ml/l treatment. Copper content was 12 ppm in treatments 2.0 and 2.5 ml/l and was relatively less in treatment 3.0 ml/l. Iron content was higher, though insignificantly, in the leaves treated with 3.0 ml/l compared to others. Mishra *et al.* (1993) reported increased leaf nitrogen content in mulberry leaves due to application of triacontanol-based products. The improvement in the nutrient content and thereby quality of mulberry leaves by the application of *Seriboost** may be attributed to its micronutrient content in addition to triacontanol and to the fact that each micronutrient plays a significant role in specific physiological and biochemical processes of mulberry.

Ascertaining number of sprays for optimum dose:

Results of study conducted to ascertain number of sprays for optimum dose i.e. 2.5 ml/l revealed that two foliar sprays (on 25th and 32nd day after pruning) resulted in significant leaf yield increase over control (Fig. 2). The leaf yield obtained were in order of 2 sprays > 3 sprays > 1 spray control. However, no significant difference was observed in leaf yield between two sprays (72.8 t/ha/yr) and three sprays (71.92 t/ha/yr). Further, leaf analysis revealed significantly higher nitrogen, phosphorus, manganese and copper contents in *Seriboost** treated plants, whereas potassium and zinc content

Table II. Effect of *Seriboost** foliar spray (sprayed thrice on 18th, 25th and 32nd after pruning) on leaf nutrient content in mulberry- variety V-1.

Tableau II. Effet de la vaporisation foliaire de Seriboost (vaporisation trois fois le 18ème, le 25ème et le 32ème jour après la taille) sur la teneur en nutriments de la variété de mûrier V-1.

Treatment (ml/l)	Nitrogen (%)	Phosphorus (%)	Potassium (%)	Manganese (ppm)	Copper (ppm)	Iron (ppm)	Zinc (ppm)
<i>Traitement</i> (ml / l)	<i>Azote</i> (%)	<i>Phosphore</i> (%)			<i>Cuivre</i> (ppm)	<i>Fer</i> (ppm)	
Control / <i>Témoin</i>	3.93	0.150	1.75	95.38	8.68	205.33	74.88
2.0	4.32	0.200	1.75	96.03	12.00	206.67	81.33
2.5	4.69	0.200	1.75	106.63	12.00	207.12	98.13
3.0	4.69	0.155	1.75	107.00	9.63	211.00	87.10
F	**	**	NS	**	**	NS	**
CD at 5%	0.41	0.016		1.889	0.967		7.292

Table III. Effect of *Seriboost** foliar spray at a concentration of 2.5 ml/l on leaf nutrient content in mulberry- variety V-1.

Tableau III. Effet de la vaporisation foliaire de Seriboost à une concentration de 2,5 ml / l sur la teneur en nutriments de la feuille chez la variété V-1.*

No. of sprays	Nitrogen (%)	Phosphorus (%)	Potassium (%)	Manganese (ppm)	Copper (ppm)	Iron (ppm)	Zinc (ppm)
<i>Nbre de</i> <i>vaporisations</i>	<i>Azote</i> (%)	<i>Phosphore</i> (%)			<i>Cuivre</i> (ppm)	<i>Fer</i> (ppm)	
Control / <i>Témoin</i>	3.86	0.152	1.73	93.88	8.65	207.96	78.33
One / <i>Une</i>	4.10	0.168	1.73	95.17	10.00	208.14	85.95
Two / <i>Deux</i>	4.62	0.197	1.73	103.91	11.12	209.76	97.10
Three / <i>Trois</i>	4.71	0.200	1.74	105.82	11.46	210.00	99.58
F	**	**	NS	**	**	NS	**
CD at 5%	0.43	0.017		2.39	0.908		8.00

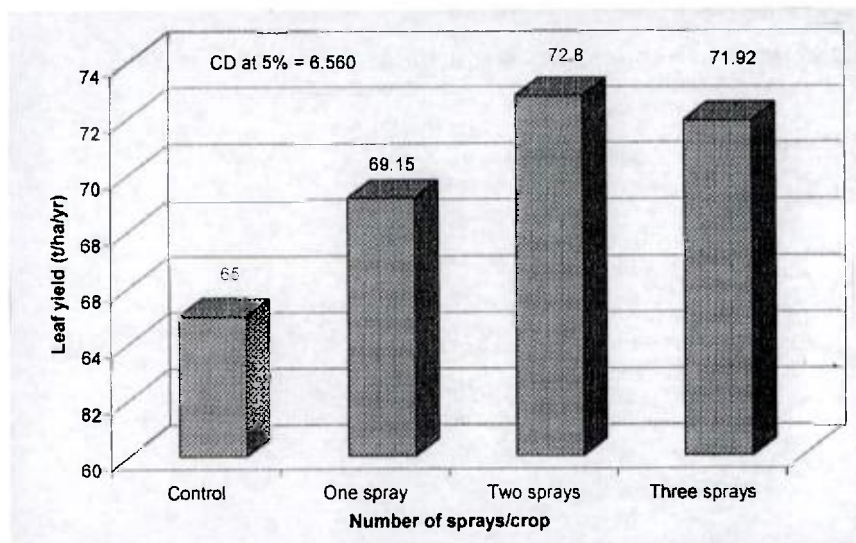


Fig. 2. Effect of *Seriboost* application at a concentration of 2.5 ml / l on mulberry leaf yield - variety V-1.

Fig. 2. Effet de l'application de *Seriboost* à une concentration de 2,5 ml / l sur le rendement en feuilles de mûrier - variété V-1.

remained more or less unaffected (Table III). Though leaf nutrient status for nitrogen, zinc and manganese was slightly higher in case of three sprays as compared to two sprays difference was not remarkable, hence two sprays per treatment were considered economical and used for further bioassay studies.

Effect of *Seriboost** on leaf pigment content:

Chlorophyll 'a', chlorophyll 'b', total chlorophyll and carotenoids content showed higher value per unit fresh weight of leaves in treated plants over control (Fig. 3); maximum promotory effect was in plants sprayed with 2.5 ml/l *Seriboost**. However, the extent of increase in chlorophyll 'a', chlorophyll 'b' and carotenoids was not similar. Higher level of leaf chlorophyll is indicative of higher photosynthetic efficiency of plants (Patil, 1998). The greater the chlorophyll content, the higher is the rate of photosynthesis which enhances the leaf yield by increasing the leaf area index (Watson, 1952). It has been suggested that by the increase in photosynthetic efficiency, productivity could be increased (Rosenow *et al.*, 1983). Higher level of nutrient and chlorophyll content, in treated plants, could be the factors responsible for enhanced leaf yield. The effect of triacontanol and micronutrients, the main components of *Seriboost** might have contributed to more synthesis and translocation of photosynthates resulting in greater uptake of nutrients and maintaining better harmony between photosynthates and translocation, which might have resulted in higher crop yield.

Effect of Seriboost* on commercial characteristics of the silkworm:

Feeding with *Seriboost** sprayed leaves, sprayed twice on 25th and 32nd day after pruning, significantly improved the commercial characteristics of silkworm as compared to control (Table IV). Effective rearing rate (ERR) by number was significantly enhanced due to *Seriboost** treatment. Single cocoon weight was also significantly influenced by *Seriboost** treatment resulting in higher cocoon yield. The important cocoon characters of silkworm i. e., single shell weight and shell ratio percentage (SR%) were significantly influenced and enhanced by all the treatments when sprayed on mulberry leaves and such leaves fed to the silkworm right from hatching to spinning. In general, the maximum increase was noticed in 2.5 ml/l. However, the results of both 2.5 and 3.0 ml/l treatments were at par with respect to single shell weight and SR%. These results are in support with the work of Das *et al.* (1993), Mishra *et al.* (1993) and Setua *et al.* (1998).

Improved economic characters obtained in these treatments are indicative of the fact that better nutritive status and enhanced concentration of nutrients in mulberry leaves presumably stimulated the metabolic activities in silkworms resulting in improvement of cocoon characters in silkworm. The potentiality of nitrogen, phosphorus, iron, zinc, boron and manganese to enhance the larval development and cocoon yield has already been recognized (Horie *et al.*, 1967; Lokanath and Shivashankar, 1986; Bose *et al.*, 1995; Singhvi *et al.*, 1996; Shankar *et al.*, 1999). In silkworms minerals accelerate the growth through orientation of physiological activities and silk content in cocoon (Thangavelu and Bania, 1990). Thus it may be inferred that *Seriboost** improved the quality of leaves, which was reflected in improved larval growth and cocoon characters.

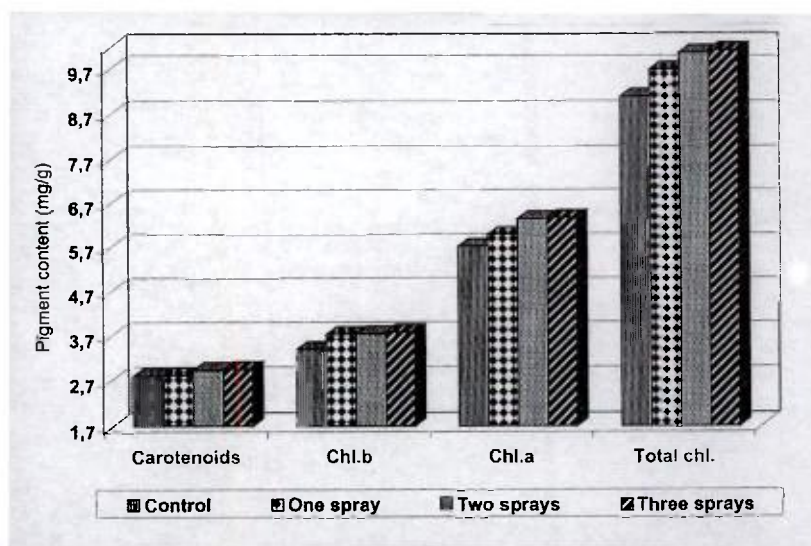


Fig. 3. Effect of *Seriboost* foliar spray at a concentration of 2.5 ml/l on pigment content in mulberry leaf - variety V-1.

Fig. 3. Effet de la vaporisation foliaire de *Seriboost* à une concentration de 2,5 ml/l sur la teneur en pigment de la feuille de mûrier de la variété V-1.

Cost-benefit ratio:

It can be seen from table V that *Seriboost** application at a concentration of 2.5 ml/l gave the highest leaf yield as compared to the control and other treatments. The cost of *Seriboost**, labour charges and sprayer hiring charges comes to US \$ 83.07 per ha/yr. With *Seriboost** treatment an additional leaf yield of 7.8 t/ha/yr was obtained. Cost of rearing utilizing additional leaves so produced comes to US \$ 189.82. Estimated income earned by sale of additional quantity of cocoons produced stands at US \$ 1021.80. Thus net returns come to US \$ 748.91 and the cost-benefit ratio due to *Seriboost** application stands at 1:2.744.

Table IV. Effect of feeding *Seriboost sprayed mulberry leaves (sprayed on 25th and 32nd day after pruning) on quantitative characters of silkworm.**

Tableau IV. Effet de l'alimentation avec des feuilles de mûrier vaporisées avec du Seriboost (vaporisation le 25ème et le 32ème jour après la taille) sur les caractères quantitatifs du ver à soie.*

Treatment (ml / l)	Effective Rate of Rearing % (by No.)	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Shell ratio (%)
<i>Traitement (ml / l)</i>	<i>Taux effectif d'élevage (en nbre)</i>	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
Control / Témoin	88.160	1.713	0.393	22.85
2.0	92.119	1.823	0.435	23.24
2.5	94.090	1.921	0.439	25.53
3.0	93.160	1.863	0.439	23.56
F	**	**	**	**
CD at 5%	2.786	0.061	0.019	0.562

Table V. Assessment of cost:benefit of *Seriboost** application in optimum concentration (2.5 ml/l) – for one ha/yr (Mulberry variety :V-1; silkworm hybrid: CSR2 x CSR4; 5 crops/yr).

Tableau V. Evaluation du coût : bénéfice de l'application de Seriboost à une concentration optimum (2,5 ml/l) pour un ha / an (variété de mûrier : V-1 ; hybride de ver à soie : CSR2 x CSR4 ; 5 récoltes / année).*

A. Cost of Seriboost per year/ha	= US \$* 51.92
A. Coût du Seriboost par année / ha	
⇒2 sprays/crop at a concentration of 2.5 ml/l	
2 vaporisations / récolte à une concentration de 2,5 ml / l	
⇒500 l solution/spray / 500 l de solution / vaporisation	
⇒ Cost of Seriboost US \$ 4.15/l (as per Sericare)	
Coût du Seriboost 4.15 US \$ / l	
B. Hiring charges for sprayer/yr	= US \$ 10.38
B. Frais de location d'un vaporisateur / année	
US \$ 0.52 × 4 days / crop / 0.52 US \$ × 4 jours / récolte	
C. Spraying charge/yr / Frais de vaporisation / année	
US \$ 1.04 ×4 mandays/crop	= US \$ 20.77
1.04 US \$ × 4 jours de travail / récolte	
D. Expenditure/ha/yr for the treatment	US \$ 83.07
D. Dépenses / ha / année pour le traitement	=====
E. Quantity of additional leaves produced/ha/yr	= 7800 kg
E. Quantité de feuilles supplémentaires produites / ha / année	
F. Quantity of cocoons produced utilizing the additional leaves @ avg. yield of 60 kg/100 dfls	= 300 kg/ha/yr
F. Quantité de cocons produits en utilisant les feuilles supplémentaires à raison d'une moyenne de rendement de 60 kg / 100 pontes saines	= 300 kg / ha / année
G. Cost of rearing for the additional leaves produced	
G. Coût d'élevage pour les feuilles supplémentaires produites	US \$ 189.82
H. Total expenditure D + G / Dépenses totales D + G	= US \$ 272.89
I. Income earned by sale of F i.e. 300 kg cocoons @ US \$ 3.41 per kg	
I. Revenu gagné par vente de F.i.e de 300 kg de cocons à raison de 3,41 US \$ par kg	= <u>US \$ 1021.80</u>
Net Income I– H / Revenu net I – H	= <u>US \$ 748.91</u>
Cost : benefit ratio / Rapport Coût / bénéfice	= 1:2.744

* Prevailing exchange rate 1 US \$ = Rs. 48.15 / * Taux de change en vigueur 1 US \$ = 48,15 Rs.

Thus it may be concluded that foliar application of *Seriboost** at a concentration of 2.5 ml/l increased production of quality mulberry leaves which subsequently resulted in higher cocoon yield and fetched a higher monetary return than that of untreated control.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks are due to M/s Sericare, Bangalore for providing samples of *Seriboost*. Thanks are also due to Dr. J. Kodandaramaiah, Dr. G.B. Singh and M.T. Himantharaj for help in various ways.

REFERENCES

- BINDROO B.B., TRAG A.R. (1996) Triac- for increasing mulberry leaf productivity. Farmer & Parliament, 31, 13-14 and 28.
- BORAIAH J. (1986) Mulberry cultivation. In: Lectures on Sericulture. Boraiah, G. (Ed.). Surmaya Publishers, Bangalore, India.
- BOSE P.C., SEN R., DUTTA R.K. (1995) Effect of foliar application of micronutrients to mulberry on the rearing performance of silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric., 3 (1), 1-5.
- DAS C., CHATTERJEE S., GHOSH J.K., SINHA S.S. (1973) Influence of GA₃ and TRIA on some economic characters of silkworm (*B. mori*). Uttar Pradesh J. Zool., 13 (2), 131-134.
- HORIE Y., WATANABE, K., ITO T. (1967) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*. XVIII. Quantitative requirements for potassium, phosphorus, magnesium and zinc. Bull. Sericul. Expt. Sta., 22 (2), 181-183.
- JACKSON H. L. (1973) Soil chemical analysis. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi.
- LEOPOLD A.C., KRIEDMAN P.E. (1988) Plant Growth and Development. TMH edition, New Delhi.
- LOKANATH R., SHIVASHANKAR K. (1986 a) Effect of foliar application of micronutrients and magnesium on the growth, yield and quality of mulberry (*Morus alba* Linn.). Indian J. Seric., 25 (1), 1-5.
- LOKANATH R., SHIVASHANKAR K. (1986 b) Effect of foliar application of magnesium and micronutrients to mulberry on the quality and production of cocoons. Indian J. Seric., 25 (1), 40-41.
- MALIK C.P. (1998) Advances in Plant Hormones Research: Indian Scenario. Agro Botanica, Bikaner, India. p. 303.
- MENON K.K.G., SRIVASTAVA H.C (1984) Increasing plant productivity through photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. (Plant Sciences), 93, 359-378.
- 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 (4), 691-697.
- 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 Triaccontanol on quality and yield of mulberry in cv. Kanva-2. Indian J. Seric., 32, 156-161.
- NANJA REDDY Y. A., PRASAD T. G. (1999) Potential application of growth regulators in mulberry. In: Advances in mulberry Sericulture, Devaiah M.C.; Narayanaswamy K.C. and Maribashetty V.G. (Eds). CVG publications, Bangalore, India. pp. 123-144.
- PANSE V. G., SUKHATME P. V. (1961) Statistical methods for Agricultural workers. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- PATIL S.V. (1998) A correlative analysis of the components of leaf yield and quality in improved genotype of mulberry. Ph.D. (Seri.) Thesis, Bangalore University, Bangalore, p. 180.
- PIPER C. S. (1942) Soil and Plant analysis. Hans Publishers, Bombay.
- RAMDAS V. S. S., REDDY A. R. (1988) Photosynthetic productivity in field crops, a review. Plant Physiol. Biochem., 15, 1-17.

- 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.
- ROSENOW D.T., QUISNBERRY J.E., WENDT C.W., CLARK L.E. (1983) Drought tolerant sorghum and cotton germplasm. In: *Plant production and management under drought conditions*, Stone J.F. and Willis W.O. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherland. pp. 207-222.
- SETUA M., DAS C., MANDAL B.K., GHOSH D. C., SEN S. K. (1998) Influence of growth regulators on leaf protein and some economic characters of silkworm, *Bombyx mori*. *Uttar Pradesh J. Zool.*, 18 (1), 13-18.
- SHANKAR M.A., PETER A., RANGASWAMY B.T. (1999) Mulberry nutrition: Focus on new concepts. In: *Advances in mulberry Sericulture*, Devaiah M.C., Narayanaswamy K.C. and Maribashetty V.G. (Eds). CVG publications, Bangalore, India. pp. 92-121.
- SINGHVI N. R., BOSE P. C., REDDY M. M., SINHA A. K., SUBBASWAMY M. R., HIMANTHARAJ M. T. DATTA R. K. (1996) Effect of micronutrients on growth and quality of mulberry leaf. *Bull. Sericult. Res.* 7, 11-14.
- SINGHVI N. R., KODANDARAMAIAH J., RAJAN MALA V., SINGH G.B., HIMANTHARAJ M.T. (2000) Foliar application of gibberellic acid to improve mulberry leaf yield, quality and commercial characteristics of silkworms. *National Conference on Strategies for Sericultural Research and Development*. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India. MPP/P-36, p. 54.
- SINGHVI N. R., KODANDARAMAIAH J., REKHA M., SARKAR, A., DATTA R.K. (2002) Influence of salicylic acid on mulberry growth and leaf yield. *Adv. Plant Sci.*, 15(2), 465-468.
- SINGHVI N. R., KODANDARAMAIAH J., RAJAN MALA V., SINGH G.B., HIMANTHARAJ M.T., REKHA M., SARKAR, A., DATTA R.K. (2001) Production potential of mulberry (*Morus* spp.) and commercial characteristics of silkworms (*Bombyx mori* L.) as influenced by exogenous supply of gibberellic acid (GA₃). *Indian J. Seric.*, 40 (1), 50-54.
- TANDON H.L.S. (1993) *Methods of analysis of soils, plants, waters and fertilizers*. Fertiliser Development and Consultation Organisation. New Delhi, India.
- THANGAVELU K., BANIA K. (1990) Preliminary investigation on the effects of minerals in rain water on the growth and reproduction of silkworm, *B. mori* L. *Indian J. Seric.*, 29 (1), 339-342.
- TIKKU A. K., BINDROO B. B. (1996) Influence of mixtalol on the leaf yield and growth of mulberry. *Sericologia*, 36 (2), 339-342.
- WATSON J. D. (1952) The physiological basis of variation in yield. *Adv. Agron.*, 4, 101-145.

EFFET DU *SERIBOOST* SUR LES ATTRIBUTS DE RENDEMENT, LE RENDEMENT EN FEUILLES DE MURIER ET CERTAINS CARACTERES COMMERCIAUX DU VER A SOIE

N. R. SINGHVI, A. SARKAR & R. K. DATTA

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

L'application foliaire de Seriboost, une formulation à base de triacontanol contenant des micro-nutriments multiples s'avère efficace pour favoriser les processus physiologiques qui contribuent à l'efficacité de rendement des plants de mûrier. L'application de Seriboost* à une concentration de 2,5 ml / l à raison de deux vaporisations / récolte (vaporisation le 25^{ème} et le 32^{ème} jour) s'avère optimum pour améliorer le mode de croissance général, le rendement foliaire et la qualité de la feuille. L'analyse biochimique en nutriments foliaires (N, P, K, Mn, Fe, Zn et Cu) et la teneur en pigment montrent que l'on enregistre l'augmentation la plus élevée avec le traitement à 2,5 ml / l, sauf pour la teneur en fer qui est plus élevée, bien qu'insignifiante avec le traitement de 3 ml/l. Cependant, la teneur en potassium est la même chez les plants traités et les témoins. L'alimentation de l'hybride bivoltin CSR2 × CSR4 avec des feuilles traitées au Seriboost* améliore les caractéristiques commerciales du ver à soie. Le ratio coût / bénéfice estimé s'avère être de 1 : 2,744.*

INTRODUCTION

Le mûrier est cultivé pour ses feuilles comme nourriture exclusive du ver à soie *Bombyx mori* L. La production de feuilles de mûrier de qualité joue ainsi un rôle important par rapport à la production et au profit dérivé de la soie (Singhvi et coll., 2000). L'amélioration de la production implique avant tout l'exploitation du potentiel génétique du mûrier. La production d'une culture, dépend pour une grande part, de l'interaction entre le potentiel génétique des plantes et l'environnement dans lequel elles poussent (Menon et Srivastava, 1984 ; Leopold et Kriedman, 1988). L'environnement influence les processus physiologiques en contrôlant les attributs de rendement de la plante (Misra, 1995). Le concept d'augmentation de la production d'une culture en utilisant des macronutriments semble avoir atteint un plateau (Ramdas et Reddy, 1988) mais il existe des possibilités d'augmentation supplémentaire de la productivité grâce à l'application d'hormones végétales (Nanja Reddy et Prasad, 1999). L'utilisation de régulateurs de croissance est conseillée comme une des biotechnologies d'amélioration de la productivité des cultures (Malik, 1998). Des chercheurs ont montré que les régulateurs de croissance comme le triacontanol, l'acide gibbérélique, l'acide salicylique et l'auxine améliorent le rendement du mûrier (Mishra et coll. ; 1993 ; Misra et coll., 1995 ; Tikku et Bindro, 1996 ; Nanja Reddy et Prasad, 1999 ; Singhvi et coll. ; 2001, 2002). On a rapporté que l'application foliaire de micronutriments améliore la productivité et la qualité foliaire du mûrier (Lokanath et

* Nom déposé de la marque d'un produit de M/s Sericare, Bangalore, Inde.

Shivashankar, 1986a ; Singhvi et coll., 1996), la croissance du ver à soie et la productivité (Lokanath et Shivashankar, 1986 b ; Bose et coll., 1995 ; Singhvi et coll., 1996).

Les promoteurs de croissance influencent non seulement divers processus de la croissance de la plante mais aussi la croissance et le développement du ver à soie (Nanja Reddy et Prasad, 1999). La production de feuilles de mûrier de qualité grâce à l'application foliaire de régulateurs de croissance joue un rôle important dans le développement du ver à soie et la productivité du cocon (Boraiah, 1986). Quelques rapports sont disponibles sur l'effet des formulations à base de triacontanol sur le rendement foliaire de mûriers et les caractères économiques du ver à soie (Mishra et coll., 1993 ; Setua et coll., 1998 ; Nanja Reddy et Prasad, 1999). Cependant, il existe peu de rapports sur l'effet de l'application combinée de triacontanol et de micro-nutriments chez le mûrier. L'étude présente est donc destinée à mesurer l'efficacité du *Seriboost**, un triacontanol, contenant une formulation de micro-nutriments multiples, par rapport aux attributs de rendement, au rendement foliaire et à la qualité des feuilles de mûrier et l'influence de l'alimentation avec des feuilles vaporisées avec du *Seriboost** sur les caractères commerciaux importants du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

L'étude est réalisée au *Central Sericultural Research and Training Institute*, de Mysore, en l'an 2000 avec la variété de mûrier V-1 cultivée en rangées avec un espacement de $(90 + 150) \times 60$ cm. L'expérience est conçue de manière aléatoire avec quatre répétitions. Les engrais sont appliqués à des doses de $350 : 140 : 140$ kg NPK / ha / année avec une dose de base de fumure (20t / ha / année). La première expérience est réalisée pour trouver la dose optimum de *Seriboost** et la deuxième pour décider du nombre de vaporisations nécessaires. Les doses essayées sont de 2,0 ; 2,5 et 3,0 ml/l. Le volume de vaporisation est fixé à 500 litres de solution aqueuse de *Seriboost** par hectare. Au début, le calendrier de traitement consiste en trois vaporisations foliaires de chaque dose de *Seriboost** le 18^{ème}, le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après la taille. La vaporisation se fait le matin. Les plants témoins sont vaporisés avec de l'eau. Les données sur les attributs de rendement, le rendement foliaire et les analyses chimiques sont analysées.

La deuxième expérience n'est réalisée qu'avec la dose la plus efficace de *Seriboost**, avec un nombre varié de vaporisations, c'est à dire une vaporisation (le 25^{ème} jour après la taille), deux (le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après la taille) et trois vaporisations (le 18^{ème}, le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après la taille) avec une vaporisation d'eau chez les témoins. Les données sur le rendement foliaire sont enregistrées et évaluées. Pour les deux expériences, on considère que la durée de chaque récolte, est de 70 jours / récolte, et la cueillette est faite en rameaux. Les données sur le rendement foliaire sont enregistrées en séparant les feuilles des pousses dans les deux expériences. Les chlorophylles "a", "b", la chlorophylle totale et la teneur en caroténoïdes sont estimées avec la méthode au diméthylsulfoxyde (DMSO) (Ronene et Galun, 1984). Les échantillons foliaires recueillis sur les plants traités et témoins sont séchés à 60° C, réduits en poudre, tamisés et utilisés pour l'analyse de l'azote selon la méthode microkjeldahl (Piper, 1942) en utilisant un système Kjeltac de marque Tecator. Les teneurs en phosphore et en potassium sont estimées en suivant la méthodologie de Jackson (1973). On estime le fer, le manganèse, le zinc et le cuivre en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique (AS GBC 902) d'après Tandon (1993).

Après s'être assuré de la dose et du nombre de vaporisations les plus efficaces, on réalise une évaluation biologique dans la troisième expérience, c'est dire que des feuilles sont vaporisées avec du *Seriboost** et données en nourriture à l'hybride de ver à soie bivoltin CSR2 $\times$ CSR4. Quatre lots cellulaires sont maintenus pour chaque traitement. On enregistre les données sur le rendement en cocons et sur les caractères commerciaux. Les données sont analysées de manière statistique d'après Panse et Sukhatme (1961). Le ratio coût / bénéfice est aussi calculé d'après le cours du marché.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet du *Seriboost** sur les attributs de rendement :

Les données présentées dans le Tableau I révèlent l'effet positif du *Seriboost** sur la croissance générale du mûrier. La hauteur de la plante, la longueur des pousses, le nombre de feuilles / plant et le rendement en tiges s'améliorent de manière significative avec l'application foliaire de *Seriboost** par rapport au témoin. Cependant, l'amélioration du nombre de pousses / plant n'est pas significative. On enregistre l'augmentation maximum avec le traitement de 2,5 ml / l pour tous les paramètres. Ces observations correspondent fortement aux précédentes observations de Mishra et coll., (1993) et de Tikku et Bindroo (1996) chez le mûrier qui avaient enregistré l'augmentation des attributs de rendement grâce à l'application de formulations de triacontanol. Lokanath et Shivashankar (1986 a) et Singhvi et coll. (1996), ont observé une augmentation de la croissance du mûrier grâce à l'application foliaire de micronutriments. L'augmentation de la croissance du mûrier enregistrée dans cette étude pourrait être attribuée à l'effet combiné du triacontanol et des micronutriments présents dans le *Seriboost**.

Effet du *Seriboost** sur le rendement foliaire :

Le mûrier répond bien à l'application de *Seriboost**. Tous les traitements augmentent de manière significative le rendement foliaire du mûrier par rapport au témoin (Fig. 1). Sur les trois doses, le traitement au *Seriboost** avec une concentration de 2,5 ml/l donne le maximum d'augmentation du rendement foliaire avec une augmentation de 12,9 %, par rapport au témoin suivi respectivement par 8,2 % et 6,24 % pour 3 ml / l et 2 ml/l. Ces résultats sont confirmés par des travaux précédents sur le triacontanol (Bindroo et Trag, 1996). La productivité d'une culture dépend en premier lieu des caractères attribués au rendement, tels que le nombre de feuilles / plant, la longueur de la pousse portant les feuilles etc... (Nanja Reddy et Prasad, 1999). L'amélioration du rendement foliaire enregistrée dans cette étude peut être attribuée à l'effet promoteur du traitement au *Seriboost** sur divers paramètres contribuant au rendement.

Effet du traitement au *Seriboost** sur l'absorption des nutriments :

Les données présentées dans le Tableau II montrent que les teneurs en azote et en phosphore augmentent dans les feuilles de mûrier vaporisées avec du *Seriboost**. La valeur maximum pour la teneur en azote de la feuille (4,69 %) est enregistrée chez les plants vaporisés avec 2,5 ou 3 ml / l de *Seriboost** par comparaison à 3,93 % chez le témoin et 4,32 % chez les plants vaporisés avec du *Seriboost** à une concentration de 2 ml/l. La teneur en phosphore est maximum dans les feuilles vaporisées avec les doses de 2 et 2,5 ml / l (0,2 %) par comparaison au témoin (0,15 %) et 3 ml / l (0,155 %). Cependant, la teneur en potassium ne change pas, 1,75 % chez les plants traités et témoins. Les teneurs en zinc et en manganèse sont maximum avec le traitement de 2,5 ml / l. La teneur en cuivre est de 12 ppm avec les traitements de 2 et 2,5 ml / l et est relativement moindre avec le traitement de 3 ml/l. La teneur en fer est plus élevée, bien qu'insignifiante, chez les feuilles traitées avec 3 ml / l par comparaison aux autres. Mishra et coll., (1993) ont observé une augmentation de la teneur en azote de la feuille chez les feuilles de mûrier grâce à l'application de produits à base de triacontanol. L'amélioration de la teneur en nutriments et donc de la qualité des feuilles de mûrier avec l'application de *Seriboost** pourrait être due à la teneur en micronutriments et en triacontanol et au fait que chaque micronutriment joue un rôle significatif dans des processus physiologiques et biochimiques spécifiques du mûrier.

Vérification du nombre de vaporisations nécessaires avec la dose optimum :

Les résultats de l'étude réalisée pour s'assurer du nombre de vaporisations nécessaires avec la dose optimum, c'est à dire 2,5 ml/l, révèlent que deux vaporisations foliaires (le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après la taille) donnent une augmentation significative du rendement foliaire par rapport au

témoin (Fig. 2). Le rendement foliaire obtenu se classe dans l'ordre 2 vaporisations > 3 vaporisations > 1 vaporisation > témoin. Cependant, on n'observe pas de différence significative du rendement foliaire entre deux vaporisations (72,8 t/ha/ année) et trois vaporisations (71,92 t/ha/ année). De plus, l'analyse foliaire révèle des teneurs significativement plus élevées en azote, phosphore, manganèse et cuivre chez les plants traités avec du *Seriboost**, tandis que les teneurs en potassium et en zinc ne sont pas affectées en général (Tableau III). Bien que l'état en nutriments foliaires tels que l'azote, le zinc et le manganèse soit légèrement plus élevé avec trois vaporisations plutôt qu'avec deux vaporisations, la différence n'est pas remarquable, on considère donc que deux vaporisations par traitement sont économiques et on les utilise pour les évaluations biologiques ultérieures.

Effet du *Seriboost sur la teneur en pigment de la feuille :**

La teneur en "chlorophylle "a", en chlorophylle "b", en chlorophylle totale et en caroténoïdes par unité de poids frais des feuilles présente une valeur plus élevée chez les plants traités que chez le témoin (Fig. 3) ; on obtient l'effet promoteur maximum chez les plants vaporisés avec 2,5 ml/l de *Seriboost**. Cependant, le degré d'augmentation pour la chlorophylle "a", la chlorophylle "b" et pour les caroténoïdes n'est pas similaire. Le taux plus élevé de chlorophylle de la feuille indique une efficacité photosynthétique plus élevée chez les plantes (Patil, 1998). Plus la teneur en chlorophylle est élevée, plus le taux de photosynthèse est élevé, ce qui augmente le rendement foliaire en augmentant l'indice de surface foliaire (Watson, 1952). On a rapporté qu'on peut augmenter la productivité en augmentant l'efficacité photosynthétique (Rosenow et coll., 1983). Le taux plus élevé de teneur en nutriments et en chlorophylle observé chez les plants traités pourrait être le facteur responsable de l'amélioration du rendement foliaire. L'effet du triacontanol et des micronutriments, les principaux composants du *Seriboost**, pourrait avoir contribué à une synthèse et une translocation plus importantes des photosynthates entraînant une plus grande absorption des nutriments et le maintien d'une meilleure harmonie entre les photosynthates et la translocation, ce qui pourrait donner un rendement foliaire plus élevé.

Effet du *Seriboost sur les caractéristiques commerciales du ver à soie :**

L'alimentation avec des feuilles vaporisées deux fois avec du *Seriboost**, le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après la taille, augmente les caractéristiques commerciales du ver à soie de manière significative par comparaison au témoin (Tableau IV). Le taux effectif d'élevage (ERR) en nombre est amélioré de manière significative avec le traitement au *Seriboost**. Le poids d'un cocon est aussi influencé de manière significative avec le traitement au *Seriboost**, ce qui entraîne un rendement en cocons plus élevé. Les caractères importants du cocon de ver à soie, c'est à dire le poids de la coque et la richesse soyeuse (% RS) sont significativement influencés et améliorés avec tous les traitements des feuilles de mûrier et lorsque les feuilles sont données en nourriture au ver à soie de l'éclosion au filage. En général, on remarque l'augmentation maximum avec 2,5 ml/l. Cependant, les résultats avec les traitements de 2,5 et 3 ml/l sont les mêmes pour le poids d'une coque et le % de RS. Ces résultats confirment les travaux de Das et coll., (1993), Mishra et coll., (1993) et Setua et coll., (1998).

L'amélioration des caractères économiques que l'on obtient avec ces traitements indique qu'un meilleur état nutritionnel et une concentration améliorée en nutriments dans les feuilles de mûrier stimulent les activités métaboliques des vers à soie et entraîne l'amélioration des caractères des cocons du ver à soie. On a déjà reconnu la potentialité d'amélioration du développement larvaire et du rendement en cocons de l'azote, du phosphore, du fer, du zinc, du bore et du manganèse (Horie et coll., 1967 ; Lokanath et Shivashankar, 1986 ; Bose et coll., 1995 ; Singhvi et coll., 1996 ; Shankar et coll., 1999). Chez les vers à soie, les minéraux accélèrent la croissance par l'orientation des activités physiologiques et augmentent la teneur en soie dans le cocon (Thangavelu et Bania, 1990). Ainsi on peut en déduire que le *Seriboost** améliore la qualité des feuilles, ce qui se reflète sur l'amélioration de la croissance larvaire et des caractères du cocon du ver à soie

Rapport coût – bénéfice :

On peut voir d'après le Tableau V que l'application de *Seriboost** à une concentration de 2,5 ml /l donne le rendement foliaire le plus élevé par comparaison au témoin et aux autres traitements. Le coût du *Seriboost**, les frais de la main d'œuvre et de la location d'un vaporisateur reviennent à 83,07 US \$ par ha / année. Avec le traitement au *Seriboost** on obtient un rendement foliaire supplémentaire de 7,8 t / ha /année. Le coût de l'élevage en utilisant des feuilles supplémentaires produites de cette manière revient à 189,82 US \$. Le revenu de la vente des cocons supplémentaires produits est estimé à 1021,80 US \$. Ainsi les profits nets sont de 748,91 US \$ et le rapport coût / bénéfice dû à l'application de *Seriboost** revient à 1 : 2,744.

On peut donc conclure que l'application foliaire de *Seriboost** à une concentration de 2,5 ml / l, augmente la production de feuilles de mûrier de qualité, ce qui donne par la suite un rendement plus élevé en cocons et permet d'obtenir un profit économique plus important qu'avec le témoin non traité.

A BRIEF REPORT ON THE BREEDING OF SPECIAL SILKWORM VARIETIES "XINMIAO" AND "MINGRI"

XU M.-K., CHEN Y.-Y. & JIANG Y.-H.

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

A new hybrids "Xinmiao × Mingri" for producing special silk material was bred by the method of hybridization and selection. Its filament size reached 5.217dtex, non-broken filament length 870m in laboratory test rearing. Raw silk and fabric made from this hybrid cocoons showed a significant increase in broken elongation, tensile elasticity, and bending rigidity elasticity, meanwhile a significant decrease in degumming rate if compared with popularized varieties. It indicated that its raw silk should be suitable for designing special silk fabric with thicker style and better anti-wrinkle characters.

KeyWords: Silkworm breeding Filament size, Xinmiao and Mingri.

INTRODUCTION

In modern days, people pay more attention to wearing characteristic, stylish, comfortable, high quality, and environmental friendly clothes; the silk fiber could just satisfy all these demands. Therefore, it is widely believed that silk products will keep their glamour and be human's favor choice. China produced over 70% raw silk in the world at present, but the majority is middle or low class products or low additional value, which resulted in slow selling and overstocking of silk products(Li *et al.*, 2000). It might provide strong technical support to keep China playing the leading role in silk industry of the world to breed some commercial varieties with specific cocoon filament characteristics, produce unusual raw silk for exploitation of new style of silk products so as to meet the different requirements of consumers.

Silkworm breeding group in Department of Sericulture and Apiculture, Zhejiang University in China had bred a pair of new varieties "Xinmiao" and "Mingri" with especially thick filament size. This is a brief report on the breeding procedure of this combination.

MATERIAL AND METHOD

Xinmiao is a Chinese race, bivoltine variety, its parent materials are all Chinese race. D93 with relatively thicker filament size and the sex-limited strain LS with big cocoon size and good economic characters were selected from the germplasm resource. Mingri is a Japanese race, bivoltine variety, the sex-limited Xin B with hypersilk gene in the germplasm resource and the newly introduced strain N92 were selected as parent materials.

Based on the reports of breeding experiences on super thick filament size, we had paid great attention to the selection of parent materials, especially to select one with strong constitute. Hybrid breeding method was used in this breeding experiment, live cocoon reeling techniques were adopted

Table I. Breeding procedure of Xinmiao.**Tableau I. Procédure de lignage de Xinmiao.**

Generation	LS × D93	F ₂	F ₃	F ₄ A ¹	F ₄ B ¹	F ₅ A	F ₅ B	F ₆ A	F ₆ B	F ₇ A	F ₇ B
Rearing year and season <i>Année d'élevage et saison</i>	95-3	96-1	97-1	98-1	98-1	98-3	98-3	99-1	99-1	00-1	00-1
Fifth instar duration (d:h) <i>Durée du cinquième âge (j : h)</i>	8:00	8:17	9:00	9:17	10:00	9:05	9:02	9:06	8:16	9:00	9:00
Larval duration (d:h) <i>Période larvaire (j : h)</i>	22:22	23:05	24:23	25:06	25:13	25:03	24:15	24:20	23:14	27:05	27:05
Cocooning rate to mature larvae (%) <i>Taux de coconage des larves mures (%)</i>	95.69	98.47	98.94	98.41	92.68	97.57	96.16	98.15	96.18		
Rate of dead worm cocoon (%) <i>Taux de cocons avec des vers morts (%)</i>	7.03	3.46	3.00	1.60	0.40	8.35	9.22	3.34	12.95	13.10	7.36
Cocoon weight(g) / <i>Poids du cocon (g)</i>	1.598	2.271	2.373	2.397	2.154	2.098	2.110	2.315	2.305	2.420	2.240
Cocoon shell weight(g) <i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>	0.389	0.540	0.588	0.541	0.505	0.525	0.519	0.566	0.584	0.590	0.570
Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>	24.34	23.78	24.78	22.57	23.44	25.02	24.60	24.45	25.34	24.38	25.45
Filament length (m) / <i>Longueur du filament (m)</i>						975	1019			950	1012
Filament size (dtex) / <i>Titre du filament (dtex)</i>						4.174	4.262			4.562	3.929
Note		LCR2	LCR ×JB92 ³			SCR2	SCR			SCR	SCR

Note: **1. A and B:** To breed different strains of the same variety / **A et B :** Pour élever différentes souches de la même variété.

2. LCR: Live cocoon reeling / *Dévidage du cocon frais.* **SCR:** Single cocoon reeling / *Dévidage d'un cocon.*

3. Testing cross for combinability to the Japanese variety in F₃ / *Croisement test pour combinaison avec la variété japonaise en F₃.*

Table II. Breeding records of Mingri.**Tableau II. Résultats de lignage de Mingri.**

Generation	Rixin B × N92F ₂		F ₃	F ₄	F ₅	F ₆ A	F ₆ B	F ₇ A	F ₇ B	F ₈ A	F ₈ B	F ₉ A	F ₉ B	F ₁₀ A	F ₁₀ B
Rearing year and season <i>Année d'élevage et saison</i>	93-1	93-3	94-1	95-1	96-1	97-1	97-1	98-1	98-1	98-3	98-3	99-1	99-1	00-1	00-1
Fifth instar duration(d:h) <i>Durée du 5ème âge (j : h)</i>	9:00	8:11	8:18	8:07	8:07	9:00	9:00	9:17	9:17	8:16	9:03	8:04	8:12	8:21	9:00
Larval duration(d:h) <i>Durée larvaire (j : h)</i>	26:02	23:07	24:01	23:05	25:13	23:05	24:23	25:06	25:06	25:15	26:01	24:04	24:14	27:02	27:05
Cocooning rate to mature larvae (%) <i>Taux de cocons des larves mûres (%)</i>	97.16	89.29	98.08	91.47	96.15	99.20	98.02	93.39	96.62			86.49	93.31		
Rate of dead worm cocoon(%) <i>Taux de cocons avec des vers morts (%)</i>	11.88	14.28	5.17	17.16	11.18	2.82	9.22	10.40	16.10	7.17	8.56	12.91	15.18	11.02	11.59
Cocoon weight / Poids du cocon (g)	2.164	1.678	2.243	2.063	2.298	2.387	2.296	2.080	2.087	1.757	1.762	2.277	2.118	2.181	2.053
Cocoon shell weight (g) <i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>	0.531	0.404	0.602	0.510	0.569	0.634	0.537	0.504	0.502	0.430	0.455	0.561	0.548	0.537	0.523
Shell ratio / Richesse soyeuse (%)	24.54	24.08	26.84	24.72	24.76	26.56	24.96	24.23	24.05	24.47	25.82	24.64	25.87	24.63	25.47
Filament length (m) / Longueur du filament (m)										832	820			928	793
Filament size (dtex) / Titre du filament (dtex)										3.941	4.274			4.129	4.484
Note	SCR ²	LCR ²	LCR ₁		LCR ₁	LCR ₃ ×D93 ³	LCR			SCR	SCR			SCR	SCR

Note :

1. **A and B:** to breed different strains of the same variety / **A et B :** Différentes souches de la même variété.2. **LCR:** live cocoon reeling / *Dévidage du cocon frais.* **SCR:** Single cocoon reeling / *Dévidage d'un cocon.*3. Testing cross for combinability to the Chinese variety D93 in F₆. / *Croisement test de combinaison avec la variété chinoise D93 en F₆.*

Table III. Rearing performance and raw silk test of Xinmiao × Mingri in Laboratory.**Tableau III. Performance d'élevage et test de soie grège de Xinmiao × Mingri en laboratoire.**

Items	Xinmiao × Mingri	Average of Popularized Hybrids for Spring rearing season
<i>Caractères</i>		<i>Moyenne des hybrides vulgarisés pour la saison d'élevage du printemps</i>
Duration of fifth instar (d:h) / <i>Durée du 5ème âge (j : h)</i>	8:10	8:04
Duration of larval stage (d:h) / <i>Durée du stade larvaire (j : h)</i>	23:18	24:05
Cocooning rate of mature larvae (%) / <i>Taux de coconage des larves matures (%)</i>	98.48	99.42
Rate of dead worm cocoon (%) / <i>Taux de cocons avec des vers morts (%)</i>	4.50	2.00
Cocoon yield per 10,000 larvae (kg) / <i>Rendement en cocons pour 10 000 larves (kg)</i>	26.89	21.04
Cocoon weight (g) / <i>Poids du cocon (g)</i>	2.672	2.028
Cocoon shell weight (g) / <i>Poids de la coque (g)</i>	0.680	0.484
Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>	25.45	23.84
Percentage of reelable cocoons (%) / <i>% de cocons dévidables (%)</i>	96.96	97.10
Filament weight (g) / <i>Poids du filament (g)</i>	0.5746	0.4134
Filament length (m) / <i>Longueur du filament (g)</i>	1094.7	1340.6
Unbroken filament length (m) / <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	871.5	1042.2
Reelability (%) / <i>Dévidabilité (%)</i>	79.61	79.53
Filament size / <i>Titre du filament</i>	5.245	3.155
Raw silk % of dried cocoon / <i>Taux de soie grège des cocons secs (%)</i>	37.52	38.68
Reeling discount of deflossed cocoons (kg) / <i>Taux de dévidage des cocons débarrassés (kg)</i>	258	254
Broken strength of raw silk (gf) / <i>Résistance à la rupture de la soie grège (%)</i>	94.8	60-80
Broken elongation percentage (%) / <i>% d'allongement à la rupture (%)</i>	23.694	18~21
Tensile elasticity (%) / <i>Elasticité à la rupture (%)</i>	47.72	41
Degumming rate (%) / <i>Taux de décreusage (%)</i>	21.06	22.47

in the early selection generation, individuals with thicker filament size and good reelability were used for mating and producing next generation. In the intermediate generations, batch rearing were adopted.

Improved method (Jiang *et al.*, 1994) for live cocoon reeling was adopted, that is to investigate the silk weight of the third hundred meters of each cocoon for thickness selection. It is not so accurate as the investigation of whole cocoon filament size, however, it is much more simple, saving time and labor, therefore, it is possible to investigate a lot of individuals in a limited short time in order to significantly expand the population for selection and increase selection efficiency.

RESULT

Breeding procedure of Xinmiao (symbol LD93 were used during breeding): start with LS × D93 from spring season of 1995, economic character were basically stabilized, and filament size reached 4.44dtex after 7 generations of selection, details for each generation refer to Table I.

Breeding procedure of Mingri (symbol JB92 was used during breeding): start with Rixin B × N92 since spring of 1993, filament size reached 4.44dtex after 10 generations of selection, details refer to Table II.

Performance of the hybrid: rearing performance of Xinmiao × Mingri in laboratory in spring of 1999 was shown in table III, silk testing result in Third Silk Conditioning House of Zhejiang Province was also listed. Jingshong × Haoyue is a popularized hybrid for spring rearing season in China, here it was used as the comparison

DISCUSSION

Scientists in sericulture research had pulled great effort to find out ways to keep the prosperous silk industry. It was reported that silkworm breeders in Japan had been engaged in breeding of silkworm varieties for special utilization since 1980s in order to rescue the decline of Japanese sericulture. Some varieties with super thick filament size had been bred, such as, Sakigake and Asagiri. Based on the breeding report (Nakamura *et al.*, 1993), their hybrids were larger in larval size, higher in cocoon yield, and thicker in filament size (about 4.44dtex), but weak in body constitute, not suitable for commercial production. The hybrid of Xinmiao × Mingri is not only thicker in filament size, but also much stronger in body constitute, which showed in higher pupation rate, shorter larval duration, therefore, it had higher performance in cocoon yield per 10,000 larvae. Test rearing in farmer's condition has also proved that this hybrid is similar to dominant varieties in economic characters for spring season in China, except it shows much thicker filament size, a little shorter filament length and higher cocoon weight and shell ratio.

New silkworm variety breeding must meet the market's demand, that is consumer's requirements, and changes of rearing conditions. The purpose of breeding special variety "Xinmiao × Mingri" is trying to open up silk consuming market, to support the sustainable development of sericulture in China. Based on the primary investigation of raw silk, it was believed to be better for some special designs of fashion wearing with especially thicker and better anti-wrinkle characters.

REFERENCE

- JIANG, Y.-H., XU M.-K. (1994) A simpler method for individual selection of cocoon filament size in silkworm breeding. *Sericulture Bulletin (China)*, 25(2):15-17.
- NAKAMURA H. (1993) Comparison experiment on silkworm varieties. *Research Report of Tochigi Ken Sericultural Center*, 35:17-29.
- ZHU, Z.-C. LI, Y.-R. (2000) Sericulture developing trend and strategy in China for the New Century(I). *China Sericulture*, 1:4-6
- ZHU, Z.-C. LI, Y.-R. (2000) Sericulture developing trend and strategy in China for the New Century(II). *China Sericulture*, 2:4-5

BREF RAPPORT SUR LE LIGNAGE DE VARIETES SPECIALES DE VERS A SOIE "XINMIAO" ET "MINGRI"

XU M.-K., CHEN Y.-Y., JIANG Y.-H.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 311029, Chine.

Un nouvel hybride "Xinmiao × Mingri" a été obtenu avec la méthode d'hybridation et de sélection afin de produire un matériel soyeux spécial. D'après les tests d'élevage en laboratoire, le titre de son filament atteint 5,217 dtex et la longueur du filament sans rupture est de 870m. La soie grège et le tissu obtenus à partir de ces cocons hybrides présentent une augmentation significative de l'allongement à la rupture, de l'élasticité à la rupture et de l'élasticité rigide de flexion et parallèlement une baisse significative du taux de décreusage par comparaison aux variétés vulgarisées. Cela indique que cette soie grège devrait convenir à la conception d'un tissu soyeux spécial au style plus épais se froissant moins facilement.

INTRODUCTION

Aujourd'hui, les consommateurs souhaitent porter des vêtements caractéristiques, stylés, confortables, de bonne qualité, sans dommage pour l'environnement et la fibre de soie répond justement à toutes ces attentes.

On pense donc en général que les produits soyeux conserveront leur *glamour* et resteront le choix favori de l'Homme. La Chine produit plus de 70 % de la soie grège mondiale mais la majorité des produits sont de qualité moyenne et / ou inférieure et ont une faible valeur ajoutée, ce qui entraîne des ventes lentes et un surstockage des produits soyeux (Li et coll., 2000). Le lignage de variétés commerciales avec un filament de cocon aux caractéristiques spécifiques et la production de soie grège inhabituelle dans le but d'exploiter un nouveau style de produits soyeux pour répondre aux différentes attentes des consommateurs, pourraient apporter un soutien technique important à la Chine pour qu'elle continue à assurer son rôle de leader mondial de l'industrie soyeuse.

La section "breeding du ver à soie" du Département de Sériciculture et d'Apiculture de l'Université du Zhejiang en Chine a obtenu deux nouvelles variétés "Xinmiao" et "Mingri" au filament de titre spécialement épais. Nous présentons ici brièvement la procédure de lignage de cette combinaison.

MATERIELS ET METHODES

Xinmiao est une race chinoise bivoltine. Ses matériaux parents sont tous deux des races chinoises qui sont sélectionnés dans les ressources de la banque génétique : D93 au filament de titre relativement plus épais et la souche LS limitée au sexe avec un cocon de grande taille et de bons caractères économiques. Mingri est une race japonaise et une variété bivoltine. Nous avons sélectionné comme matériaux parents Xin B limitée au sexe, à la soie abondante et la souche N92 nouvellement introduite dans les ressources de la banque génétique.

En nous appuyant sur les rapports qui existent sur les expériences de lignage pour obtenir un filament au titre extra fin nous avons accordé beaucoup d'attention à la sélection des matériaux

parents, surtout à la sélection de la robustesse. La méthode de lignage hybride est utilisée dans cette expérience et des techniques de dévidage des cocons frais sont adoptées dans la sélection de la génération précoce et les individus au filament de titre plus épais et avec une bonne dévidabilité sont utilisés pour l'accouplement et pour produire la génération suivante. Pour les générations intermédiaires, on adopte l'élevage en lots.

Nous avons suivi la méthode améliorée (Jiang et coll., 1994) de dévidage des cocons frais (Jiang et coll., 1994) pour étudier le poids de trois cent mètres de soie de chaque cocon pour la sélection de l'épaisseur. Cela n'est pas aussi juste que l'étude du titre du filament de tout le cocon, cependant, c'est une méthode beaucoup plus simple et qui fait gagner du temps et de la main d'oeuvre. Il est donc possible d'étudier de nombreux individus pendant une période de temps limitée afin d'agrandir la population sélectionnée de manière significative et augmenter l'efficacité de la sélection.

RESULTATS

La procédure de lignage de Xinnmiao (le symbole LD93 est utilisé pendant le lignage) est la suivante :

Nous avons commencé avec LX × D93 à partir de la saison du printemps en 1995, les caractères économiques sont fondamentalement stabilisés et le titre du filament atteint 4,44 dtex après 7 générations de sélection. Pour les détails sur chaque génération, se reporter au Tableau I.

La procédure de lignage de Mingri (le symbole JB92 est utilisé pendant le lignage) est la suivante : nous avons commencé avec Rixin B × N92 à partir du printemps 1993, le titre du filament atteint 4,44 dtex après 10 générations de sélection, pour les détails se reporter au Tableau II.

Performance de l'hybride : la performance d'élevage de Xinnmiao × Mingri en laboratoire au printemps 1999 est présentée dans le tableau III ; les résultats des tests de soie réalisés à la Third Silk Conditioning House de la Province de Zhejiang sont également présentés. Jingsong × Hoyue, un hybride vulgarisé populaire pendant la saison d'élevage du printemps en Chine, est utilisé à des fins comparatives.

DISCUSSION

Les scientifiques engagés dans la recherche séricicole ont fait de grands efforts pour découvrir des moyens permettant de sauvegarder la prospérité de l'industrie de la soie. Depuis les années 1980, les sélectionneurs de vers à soie au Japon ont obtenu des variétés de vers à soie destinées à des usages spéciaux de manière à éviter le déclin de la sériciculture japonaise. Certaines variétés au filament de titre très épais ont été lignées, telles que Sakigake et Asagiri. D'après le rapport sur leur lignage (Nakamura et coll., 1993), les larves de ces hybrides sont plus grandes, ont un rendement en cocons plus élevé et un filament plus épais (environ 4,44 dtex) mais une constitution faible, et ne sont pas adaptées à la production commerciale. L'hybride Xinnmiao × Mingri a non seulement un filament plus épais mais également une constitution beaucoup plus robuste, qui se manifeste par un taux de pupaison plus élevé, une durée larvaire plus courte, et donc une meilleure performance de rendement en cocons pour 10 000 larves. Les essais d'élevage dans les fermes pendant la saison du printemps en Chine ont aussi prouvé que cet hybride est similaire aux variétés dominantes de par ses caractères économiques, ses seules différences étant qu'il présente un titre de filament bien plus épais, une longueur de filament un peu plus courte et un poids de cocon et une richesse soyeuse plus élevés.

Le lignage de nouvelles variétés de vers à soie doit répondre à la demande du marché, c'est à dire aux demandes du consommateur et aux changements des conditions d'élevage. Le but du lignage de la variété spéciale " Xinnmiao × Mingri " est d'essayer d'ouvrir le marché de consommation de la soie, afin de soutenir le développement durable de la sériciculture en Chine. D'après l'étude de sa soie grege, on pense qu'il convient mieux à certains modèles spéciaux de vêtements à la mode, épais et qui ne se froissent pas.

REVERSAL OF WATER LOGGING EFFECT THROUGH FOLIAR SPRAY OF COMMERCIAL PLANT GROWTH REGULATOR IN MULBERRY

C. DAS, T. SENGUPTA, S. CHATTERJEE, A. K. MISRA, S. K. SEN & B. SARATCHANDRA

Mulberry Physiology Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742101, West Bengal, India.

Foliar spray of kinetin based plant growth regulator (Biozyme crop+) at 0.05% concentration was given to mulberry plant before the onset of water logging. After the release of stress photosynthetic rate, total chlorophyll, protein and sugar content were estimated. Application of Biozyme crop + partially compensated the water logging effect and increased the leaf yield by 30% and improved the chlorophyll, sugar content and photosynthetic rate significantly.

Keywords: Mulberry, Protein, Chlorophyll, Photosynthesis.

INTRODUCTION

Water logging decreases the growth of root, shoot, dry matter accumulation and crop yield (Scott *et al.*, 1989, Davies and Hillman, 1988). These deleterious effects of excess water stress are due to the decrease of the rate of metabolic activity, the loss of membrane permeability, stomatal conductance, photosynthesis (Crawford, 1982; Bradford, 1982; Regehr *et al.*, 1975). The application of kinetin and GA₃ alleviated the symptoms caused by flooding (Jackson & Campbell, 1979). Removal of deleterious effects of flooding by GA₃ application in chickpea was observed by Bishnoi & Krishnamoorthy (1992).

In Eastern India some regions in the gangetic plains of West Bengal and low land areas of Assam mulberry fields remain water logged due to excess rainfall. The farmers have no option but to use flood affected leaves. However, information on the ameliorating effect of water logging in mulberry is lacking. So an attempt was made to overcome the water logging effect through foliar spray of kinetin based commercial plant growth regulator Biozyme crop+ on quality leaf production during rainy season.

MATERIALS AND METHODS

Two years old mulberry plants (C.V S1) were pruned and usual agronomical packages were followed. The plants after 70 days of pruning were exposed to the following three different water logging treatments – (1) Control (no water logging – T0), the excess water in the plots was drained freely, (2) flooded (T1), the water level was maintained for 10 days at 2 feet above the soil surface by pump irrigation during rainy season, (3) T2 – Biozyme crop+ (kinetin based PGR) at 0.05% concentration was applied through foliar spray twice at 7 days interval before the onset of water logging treatment. Randomised Block Design with 5 replications per treatment were maintained for both control and treated plots. After 10 days of water logging leaf yield was recorded. Total

chlorophyll, sugar and protein were estimated spectrophotometrically following the method of Arnon (1949), Morris (1948) and Lowry *et al.*, (1951) respectively. Photosynthetic rate was measured *in situ* of 5th leaf using LICOR-6200 portable photosynthetic system.

RESULTS AND DISCUSSION

Water logging reduced the leaf production by 38% (Fig. 1) which may be due to reduction of dry matter accumulation and disturbance of water and mineral uptake and hormonal metabolism (Hiran and Wright, 1973; Orchard *et al.*, 1985). The loss of leaf yield due to 10 days water logging in mulberry was ameliorated to 30% by foliar application of Biozyme crop+ supporting the findings of Jackson and Campbell (1979). The photosynthetic rate was decreased by 52.58% after 10 days of water logging (Fig. 1).

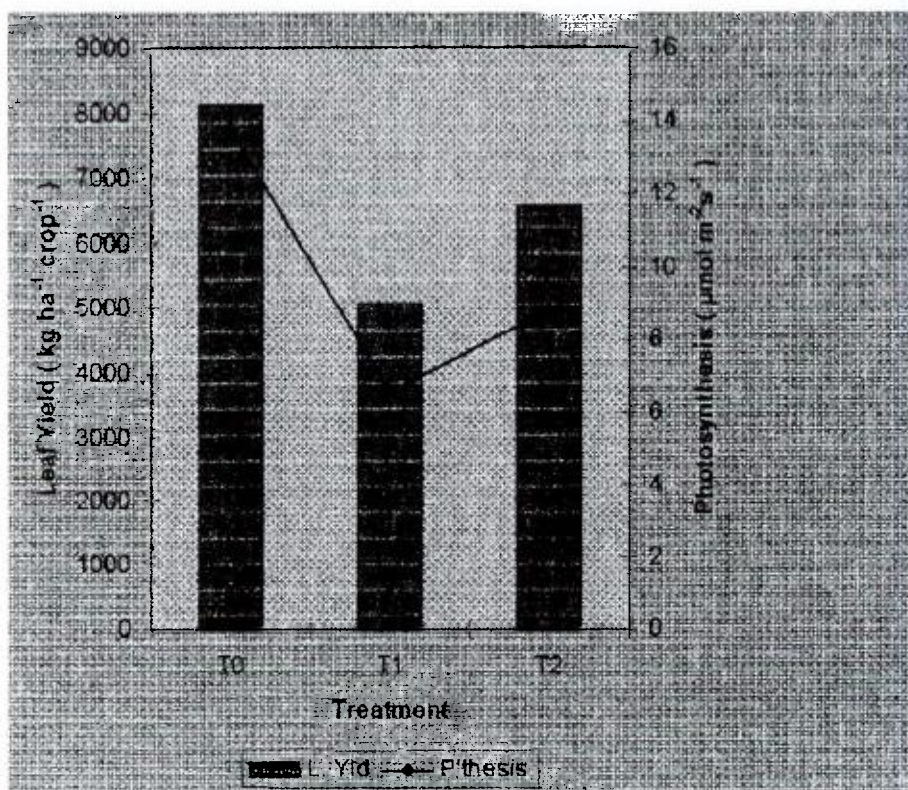


Fig. 1. Effect of Biozyme Crop+ on leaf yield and photosynthesis under water logged condition.

Fig 1. Effet du Biozyme⁺ sur le rendement foliaire et la photosynthèse dans des conditions de détrempage.

T0= No water logging / *Pas de détrempage*. **T1** = Water logging for 10 days / *Détrempage pendant 10 jours*. **T2** = Water logging + foliar spray of hormone / *Détrempage + vaporisation foliaire d'hormone*.

Table I. Effect of Biozyme crop⁺ on leaf yield and photosynthetic rate of mulberry leaves under water logging condition.

Tableau I. Effet du Biozyme⁺ sur le rendement en feuilles et le taux de photosynthèse des feuilles de mûrier imprégnées d'eau.

Treatment	Leaf yield (kg ha ⁻¹ crop ⁻¹)	Photosynthetic rate (μmol m ⁻² s ⁻¹)
Traitement	Rendement en Feuilles (kg ha ⁻¹ récolte ⁻¹)	Taux de photosynthèse (μmol m ⁻² s ⁻¹)
No water logging (T0) / Pas de détrempage (T0)	8112.00	13.75
Water logging for 10 days (T1) Détrempage pendant 10 jours (T1)	5034.75 (- 37.93)	6.52 (- 52.58)
Water logging for 10 days spray of Biozyme crop ⁺ (T2) Détrempage pendant 10 jours et vaporisation de Biozyme ⁺ (T2)	6559.97 (+ 30.29)	8.79 (+ 34.81)
CD at 5 %		1.065

Table II. Effect of Biozyme crop⁺ on total chlorophyll, protein and sugar content of mulberry leaves under water logging condition.

Tableau II. Effet du Biozyme⁺ sur la teneur en chlorophylle, en protéines et en sucres totaux dans les feuilles de mûrier détrempées.

Treatment	Total Chlorophyll (mg g ⁻¹ fw)	Total soluble sugar (mg g ⁻¹ fw)	Total soluble Protein (mg g ⁻¹ fw)
Traitement	Chlorophylle totale (mg g ⁻¹ pf)	Sucres solubles totaux (mg g ⁻¹ pf)	Protéines totales solubles (mg g ⁻¹ pf)
No water logging (T0) Pas de détrempage (T0)	1.71	28.52	27.03
Water logging for 10 days (T1) Détrempage pendant 10 jours	0.94 (- 45.02)	16.60 (- 41.79)	20.32 (- 24.82)
Water logging for 10 days spray of Biozyme crop ⁺ (T2) Détrempage pendant 10 jours et Biozyme ⁺ (T2)	1.03 (+ 9.57)	21.20 (+ 27.71)	19.27 (- 5.16)
CD at 5%	0.056	1.186	1.264

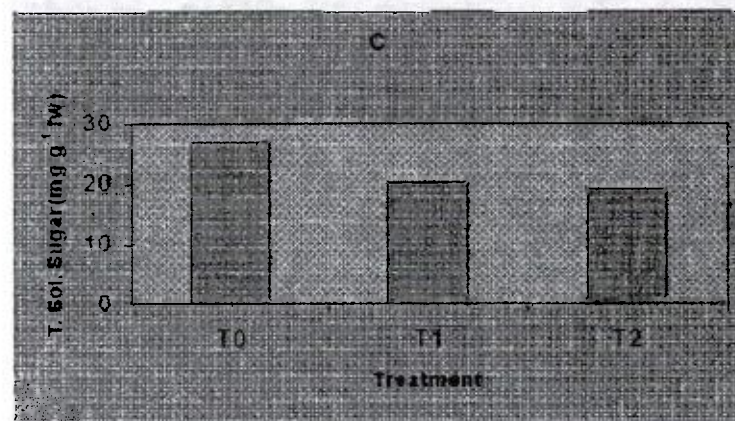
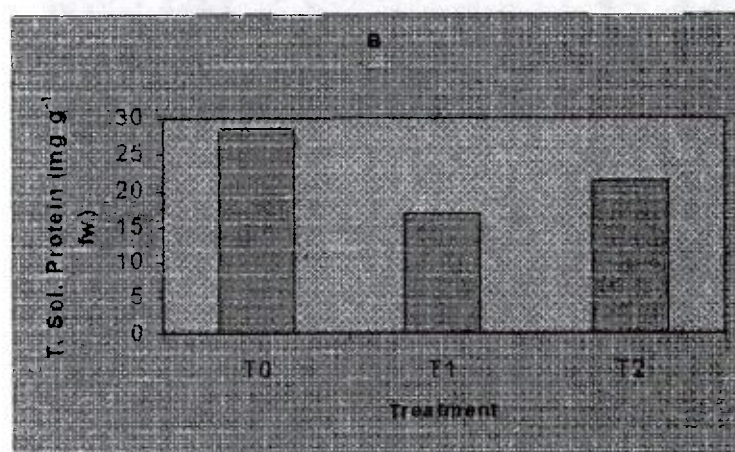
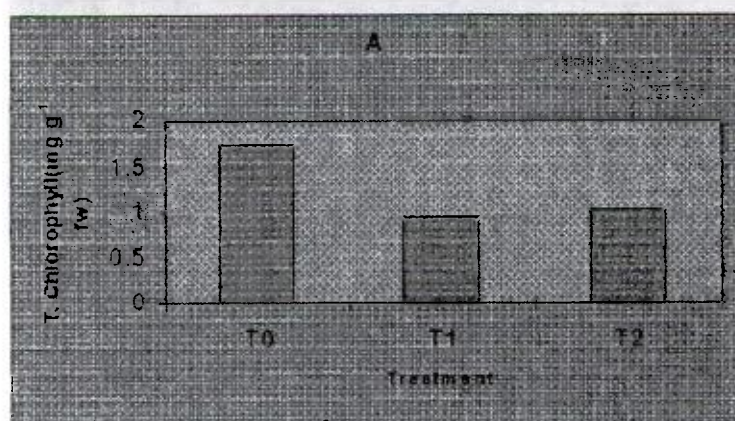


Fig. 2. Effect of Biozyme Crop⁺ on chlorophyll (A), Protein (B) and Sugar (C) under water logged condition.

Fig. 2. Effet du Biozyme⁺ sur la chlorophylle (A), les protéines (B) et les sucres (C) dans des conditions de détrempeage.

T0= No water logging / Pas de détrempeage. T1 = Water logging for 10 days / Détrempeage pendant 10 jours. T2 = Water logging + foliar spray of hormone / Détrempeage + vaporisation foliaire d'hormone.

The decrease of the rate of photosynthesis caused by water logging may be due to decreased leaf water potential and stomatal resistance (Bishnoi and Krishnamoorthy, 1992). An increase of 34.8% in photosynthetic efficiency due to foliar spray of Biozyme crop⁺ during water logging may be due to lesser sensitivity of photosynthesis to CO₂ concentration apparently through a decreased rate of photorespiration (Erickson *et al.*, 1980). The chlorophyll content of water logged mulberry leaves were 45% lower in comparison with control (no water logging). A similar reduction in chlorophyll content due to water logging were reported in other crops by Crawford (1982) and Muthuchelian *et al.*, (1995). Foliar application of Biozyme crop⁺ compensated the loss of chlorophyll content by 9.6%. This may be due to the increase in the synthesis of chlorophyll a and b or reduction of senescence rate (Fig. 2a) supporting the findings of Muthuchelian *et al.*, (1990). The total soluble sugar content was drastically reduced by 25% in 10 days water logged leaves. Foliar spray of hormone could not overcome the water logging effect in case of soluble protein content (Fig. 2b). Interestingly, sugar content was improved in water logged plants by application of Biozyme Crop⁺ (Fig. 2c). Thus, Biozyme crop⁺ a commercial plant growth regulator plays a pivotal role in reversing the water logging effect in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENT

Technical help rendered by Shri Mangal Saha is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ARNON D. I. (1949) Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- BISHNOI N. R. & KRISHNAMOORTHY H. N. (1992) Effect of water logging and gibberellic acid on leaf gas exchange in peanut (*Arachis hypogaea* L.) Ind. J. Plant Physiol. 139: 503-505.
- BRADFORD K. J. & HSIAO T. C. (1982) Stomatal behaviour and water relations of waterlogged tomato plants. Plant Physiol. 70: 1508-1513.
- CRAWFORD R. M. M. (1982) Physiological responses to flooding. In Pirson, A., Zimmermann M. H. (ed), Encyclopedia of plant Physiology Springer verlag. Berlin—Heidelberg, New York Vol. 12B PP 453-477.
- DAVIES M. S. & HILLMAN G. C. (1988) Effect of soil flooding on growth and grain yield of populations of tetraploid and hexaploid species of wheat. Ann. Bot. 62: 597-604.
- ERICKSON A. B., SELLDON G., SKOGEN D. & NILSEN S. (1981) Comparative analyses of the effect of triacontanol on photosynthesis, photorespiration and growth of tomato (C3 plant) and maize (C4 plant) Planta. 152: 44-49.
- HIRON R. W., P. & WRIGHT S. T. C. (1973) The role of endogenous abscisic acid in the response of plants to stress. J. Exp. Bot. 24: 769-781.
- JACKSON M. B. & CAMPBELL D. J. (1979) Effect of benzyladenine and gibberellic acid on the responses of tomato plants to anaerobic root environments and to ethylene. New Phytol. 82: 331-340.
- LOWRY O. H., ROSENBROUGH N. J. & FARR A. L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MORRIS I. (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Drey wood's anthrone reagent. Science. 107: 254-255.
- MUTHUCHELIAN K., MURUGAN C., HARIGOVIDAN R., NEDUNCHEZHIAN N. & KULANDAIVELU G. (1985) Effect of triacontanol in flooded *Erythrina variegata* Seedlings., I. Changes in growth. Photosynthetica. 31: 269-275.
- MUTHUCHELIAN K., PALIWAL K., GNANAM A & MITCHEL R. K. (1990) The effect of tree long chain aliphatic alcohols on photosynthesis and growth of *Pennisetum polystachyon* Schutt. Photosynthetica. 31: 257-260.

- ORCHARD P. W., SOH B. & JESSOP J. S. (1985) The response of Sorghum and sunflower to short term water logging, *Plant and Soil*. 88: 521-430.
- REGEHR D. L., BAZZAZ F. A. & BOGGESE W. R. (1975) Photosynthesis, transpiration and leaf conductance of *Populus deltoids* in relation to flooding and drought. *Photosynthetica*. 9: 52-61.
- SCOTT R. D. ANGULE J. DE., DANIELS M. B. & WOOD L. S. (1989) Flood duration effect on soyabean growth and yield. *Agron. J.* 81: 631-636.

LUTTE CONTRE L'EXCES D'EAU GRACE A LA VAPORISATION FOLIAIRE D'UN REGULATEUR DE CROISSANCE VEGETAL CHEZ LE MURIER

**C. DAS, T. SENGUPTA, S. CHATTERJEE, A. K. MISRA, S. K. SEN &
B. SARATCHANDRA**

Mulberry Physiology Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore
742101, West Bengal, Inde.

Nous avons vaporisé les feuilles de mûrier avant le début de l'inondation avec un régulateur de croissance à base de kinétine (Biozyme⁺) à une concentration de 0,05 %. Après la libération du taux photosynthétique de stress, on estime la chlorophylle, les protéines totales et la teneur en sucre. L'application de Biozyme⁺ compense partiellement l'effet de détrempe, augmente le rendement foliaire de 30 % et améliore la teneur en chlorophylle, en sucre et le taux de photosynthèse de manière significative.

INTRODUCTION

Le détrempe diminue la croissance de la racine, de la pousse, l'accumulation de matière sèche et le rendement de la culture (Scott et coll. 1989, Davies et Hillman, 1988). Ces effets négatifs du stress provenant de l'excès d'eau sont dus à la baisse du taux d'activité métabolique, à la perte de perméabilité des membranes, à la conductance stomatale et à la photosynthèse (Crawford, 1982 ; Bradford, 1982 ; Regehr et coll., 1975). L'application de kinétine et de GA3 atténue les symptômes provoqués par l'inondation (Jackson & Campbell, 1979). Bishnoi et Krishnamoorthy (1992) ont observé la disparition des effets négatifs dus à l'inondation grâce à l'application de GA3 chez le pois chiche.

Dans l'est de l'Inde, les mûraies situées dans les plaines du Gange du Bengale de l'Ouest et dans les basses terres de l'Assam demeurent détrempees en raison des précipitations excessives. Les fermiers n'ont pas d'autre option que d'utiliser des feuilles affectées par l'inondation. On ne dispose pas assez d'information sur l'amélioration de l'effet dû au détrempe chez le mûrier. Nous avons donc essayé de contrer l'effet du détrempe par rapport à la production de feuilles de qualité pendant la saison des pluies grâce à la vaporisation foliaire d'un régulateur de croissance végétal à base de kinétine, le Biozyme⁺.

MATERIELS ET METHODES

Des plants de mûrier de deux ans (C. v. S1) sont taillés et cultivés selon les pratiques agronomiques habituelles. Soixante dix jours après la taille, les plants sont exposés aux trois traitements suivants — (1) témoin (pas de détrempe — T0), l'excès d'eau des parcelles est évacué naturellement, (2) inondé (T1), le niveau d'eau est maintenu pendant 10 jours à 60 cm au-dessus de la surface du sol grâce à une pompe d'irrigation pendant la saison des pluies, (3) (T2) — du Biozyme⁺ (Régulateur de croissance végétal à base de kinétine) à une concentration de 0,05 % vaporisé sur les feuilles deux

fois, à 7 jours d'intervalle, avant le début du traitement de détrempage. On maintient des parcelles témoins et traitées disposées de manière aléatoire en 5 répétitions. Après 10 jours de détrempage, on enregistre le rendement foliaire. On estime la chlorophylle, les sucres et les protéines totales avec un spectrophotomètre en suivant respectivement la méthode d'Arnon (1949), Morris (1948) et Lowry et coll., (1951). Le taux de photosynthèse est mesuré *in situ* sur la 5^{ème} feuille en utilisant un système photosynthétique portable LICOR-6200.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le détrempage réduit la production foliaire de 38 % (Fig. 1), ce qui pourrait être dû à la diminution de l'accumulation de matière sèche et à la perturbation de l'absorption de l'eau, des minéraux et du métabolisme hormonal (Hiran et Wright, 1973 ; Orchard et coll., 1985). On peut remédier à la perte de rendement foliaire chez le mûrier due à un détrempage pendant 10 jours grâce à l'application foliaire de Biozyme⁺, ce qui confirme les observations de Jackson et Campbell (1979). Le taux de photosynthèse diminue de 52,58 % après 10 jours de détrempage (Fig. 1).

La baisse du taux de photosynthèse provoquée par le détrempage pourrait être due à la baisse du potentiel d'eau dans la feuille et à la résistance stomatale (Bishnoi et Krishnamoorthy, 1992). L'augmentation de l'efficacité photosynthétique de 34,8 % grâce à la vaporisation foliaire de Biozyme⁺ pourrait être due à la baisse de la sensibilité de la photosynthèse à la concentration en CO₂ à cause de la baisse du taux de photorespiration (Erickson et coll., 1980). La teneur en chlorophylle des feuilles de mûrier détrempees diminue de 45 % par comparaison au témoin (pas de détrempage). Crawford (1982) et Muthuchelian et coll., (1995) ont signalé une baisse similaire de la teneur en chlorophylle chez d'autres cultures à cause du détrempage. L'application foliaire de Biozyme⁺ compense la perte de la teneur en chlorophylle de 9,6 %. Cela pourrait être dû à l'augmentation de la synthèse des chlorophylles a et b ou à la diminution du taux de sénescence (Fig. 2a), ce qui confirme les observations de Muthuchelian et coll., (1990). La teneur en sucres solubles totaux diminue radicalement de 25 % chez les feuilles détrempees pendant 10 jours. La vaporisation foliaire d'hormone ne peut pas compenser l'effet du détrempage pour la teneur en protéines solubles (Fig. 2b). De manière intéressante, la teneur en sucre s'améliore chez les plants détrempees avec l'application de Biozyme⁺ (Fig. 2c). Ainsi, le Biozyme⁺ un régulateur commercial de croissance végétal joue un rôle central pour lutter contre l'effet du détrempage chez le mûrier.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	443
General sericulture	
Mûrier	445
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	447
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	449
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	451
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	455
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	459
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	461
Silkworms: silk glands	
Soie	463
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.

Sericulture générale

General sericulture

Factors for success of indian bivoltine sericulture.

DANDIN S.B., BASAVARAJA H.K., SURESH KUMAR N.

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

2003 Indian Silk, Vol. 41(9), 5-8. (E)

Women empowerment through sericulture in Himachal Pradesh.

GAUTAM S., SHARMA A.

Department of Clothing and Textiles, College of Home Science, krishi Vishva Vidyalaya, Palampur (HP), India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(9), 18-20. (E)

Occurrence of grey leaf spot disease caused by *Pseudocercospora mori* (Hara) deighton, affecting mulberry in South India.

GOVINDAIAH, NISHITHA NAIK V., SHARMA D.D., GUPTA V.P.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 64-65. (E)

Low cost mountage for quality cocoons.

KATYAR R.L., CHALPELWAR P.N., LANDE U.L., DANDIN S.B.

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

2003 Indian Silk, Vol. 41(9), 16-17. (E)

Dyes and dyeing in the millennium.

KATTI M.R.

Society for Advancement of Management, Economy, Environment & Technologies (SAMEET), Bangalore 560 068, India.

2002 Indian Silk, Vol. 41(8), 35-37. (E)

Cost-return structure of multi-end basin silk reeling technology in Karnataka.

KERUTAGI M.G., SASTRY K.N.R., PATIL R.R.

Department of Agricultural Economics, Kittur Rani Channamma College of Horticulture, Arabhavi 591 310, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 49-53. (E)

The wonders of Vanya silks.

KIRSUR M.V.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.
2002 India Silk, Vol. 41(8), 25-29. (E)

CSB and BAIF leverage Tasar culture in Maharashtra.

MATHUR S.K., SINGH K.K., SINHA B.R.R.P.

RTRS Bhandara, BAIF Development Research Foundation, Uralikanchan, Pune, India.
2002 Indian Silk, Vol. 41(8), 33-34. (E)

Gender inequality and entrepreneurship: the indian silk industry.

MAYOUX L.

1993 Dev. Policy Rev., Vol. 11(4), 413-426. (E)

NGOs and gender policy : some issues from the south Indian silk-reeling industry.

MAYOUX L.

1993 Focus Gend., Vol. 1(3), 43-47. (E)

Association of socio-economic characters with knowledge and adoption of improved sericulture practices by sericulturists in Mysore district.

MUNIKRISHNAPPA H.M., JAGADISHA K., SRINIVASA G.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 89-91. (E)

Seritorch : an effective device for sericulturists.

QADRI S.M.H., SAKTHIVEL N., THIRUNAVUKKARASU T., DANDIN S.B.

Regional Sericultural Research Station, Bijapur 586101, India.
2002 Indian Silk, Vol. 41(8), 14-16. (E)

Utilization of fermented silkworm pupae silage in feed for carps.

RANGACHARYULU P.V. et al.

Central Institute of Freshwater Aquaculture, Fish and Shellfish Nutrition Division, Bhubaneswar, Orissa, India.

2003 Bioresour. Technol., Vol. 86(1), 29-32. (E)

A study on adoption of sericultural practices by sericulturists.

SUNILDUTT J., CHOLE R.R.

Department of Extension Education, Maharashtra Agricultural University, Prabhani, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 1-5. (E)

Development of database system for silk terms.

TAKAHASHI S., MIURA M., MORIKAWA H., IZUHARA M., ITO J., TAKIZAWA S.

2002 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 71(2), 107-113. (J)

The first international workshop of lepidoptera genomics and silkworm genome project in China.

ZHONGHUAI X.

Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 271-272. (C)

Mûrier

Mulberry

Rapid, in vitro TDS-mediated micropropagation of *Morus indica* C176 and C776 through axillary buds.

BHATNAGAR S., DAS M., KHURANA P.

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi, 110 021, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 80-83. (E)

Breeding of a mulberry triploid hybridized combination "Yuesang N 2".

GENGSHENG X., *et al.*

Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 320-323. (C)

S146 - A suitable mulberry genotype for North-Western India.

JUYAL A.C., SINGH B.D., MOHAN R., RAMAKANT, MAURYA G.

Regional Sericultural Research Station, Sahaspur, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(9), 9-10 (E)

Identification of mulberry genotypes for cultivation as tree.

KUMAR J.S., SARKAR A., SUSHEELAMMA B.N., VENKATESWARLU M.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 78-79. (E)

Recommendation of package for mulberry cultivation under open and shade condition in Kerala.

MEERABAI M., NAIR V.M., SARASWATHY P.

College of Agriculture, Vellayani, Thiruvananthapuram, Kerala, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 6-9. (E)

Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers.

MITSUHASHI W., SAIKI T., WEI W., KAWAKITA H., SATO M.

Dpt. of Insect Genetics and Evolution, National Inst. of Agrobiol. Sciences, Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2002 Insect Mol. Biol., Vol.11(6), 577-584. (E)

Symptomatological study of nutrient deficiency in mulberry variety VI under fiels conditions.
SINGHVI N.R., KODANDARAMAIAH J., MUNIRATHNAM REDDY M., KATYAR R.S.,
SARKAR A.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 66-69. (E)

Quanrantine in mulberry germplasm.

THANGAVELU K., SARASWAT R.P., MOHAN B;

CSGRC, CSB, Hosur, India.

2002 Indian Silk, Vol. 41(8), 17-19. (E)

Impact of chlordecone on the lipid metabolic profiles of mulberry (*Morus alba*) leaf.

VIJAYA P., RAJU A.H.H., REDDY R.L.P., MAMATHA D.M., DASS P.J., RAO M.R.

Department of Botany and Sericulture, S.V. University, Tirupati 517 502, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 57-58. (E)

Salinity induced cell membrane damage in mulberry (*Morus spp.*)

VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P., GHOSH P.D.

Central Sericultural Research and Training Institue, Berhampore 742 101, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 70-73. (E)

Insect pests of mulberry and their management in Jammu and Kashmir - Future strategies.

ZEYA S.B., KHAN M.A., DHAR A., MIR M.R.

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(9), 11-15. (E)

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

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

Peroral infection of nucleopolyhedrovirus non-occluded viral particle of *Bombyx mori* L. aided by a fluorescent brightener.

ARAKAWA T., FURUTA Y., KUBOMURA Y., KATO M., HAYASAKA S.

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

2002 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 71(2), 101-105. (J)

Strategies for improvement of silkworm seed quality.

BENCHAMIN K.V.

N.S.S.P., Central Sericulture Research, Bangalore 560 068, India.

2002 Indian Silk, Vol. 41(8), 5-8. (E)

Heterosis in relation to genetic divergence in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

FARROQ M., PUTTARAJU H.P., DAR H.U., SOFI A.M.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 10-18. (E)

Comparative economics of bivoltine hybrids with multi X bi hybrid cocoon production.

HIRIYANNA, SWAMY T.P., KUMARESAN P., VIJAYA PRAKASH N.B.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 38-41. (E)

Infectivity of the recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus containing heterogeneous polyhedrin.

JI P., HE J.L.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhejiang 212018, China.

2001 Scientia Agricultura Sinica, Vol. 34(1), 111-114. (C,e)

Growth and development of silkworm, *Bombyx mori* L. on some varieties of mulberry.

KUMAR S., SRIVASTAVA R.P.

Dept. of Entomology, Col. of Agriculture, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar 263 145, India.

2002 India J. Seric., Vol. 41(1), 59-61. (E)

Effects on silkworm larvae attractiveness of mulberry leaves grown at different fertilizer application rates.

KUWADA M., HORIE T.

Dpt of Crop Science, Grad. School of Agric., Kyoto Univ., Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan.

2002 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 71(2), 75-81. (J)

Photoinactivation of vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll derivatives from silkworm excreta.

LIM D.S., KO S.H., KIM S.J., PARK Y.J., PARK J.H., LEE W.Y.

Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University, CPO Box 8044, Seoul 120/752, South Korea.

J. Photochem. Photobiol. B, Vol. 67(3), 149-156. (E)

A data management system for Silkworm breeding.

MING T., SHENYUAN P., AILING L., TAMIO M.

Jiangsu Silkworm Eggs Corporation, Wuxi 214009, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 337-340. (C)

Interaction of different levels of nitrogen applied to rainfed mulberry garden and methods of feeding of NB4D2 silkworm breed on cocoon characters.

SANNAPPA B., DEVAIAH M.C., GOVINDAN R., CHANDRAPPA D.

Department of Sericulture, College of Agriculture, UAS, GKVK, Bangalore 560065, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 74-77. (E)

Efficacy of xiaotelin as a disinfectant against the pathogens of silkworm, *Bombyx mori* Linn.

SINGH G.P., NAGARAJU B.L.X., DATTA R.K.

Animal Division, Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 290 031, P.R. China.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 84-88. (E)

Evaluation of the effects of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) commercial products against mulberry silkworm, *Bombyx mori* (L).

SREENIVAS A.G., ASHOKA J., PATIL B.V.

Department of Agriculture Entomology, College of Agriculture, Raichur 584 101, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 54-56. (E)

Cocoon filament size deviation in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

SURESH KUMAR N., *et al.*

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

2002 Indian J. Seric., Vol.41(1), 42-48. (E)

Effect of calcium salts on the feeding behavior of newly hatched larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

TSUNEYAMA I., IIDA N., TANAKA Y.

Institute of Sericulture, Iikura 1053, Ami-machi, Ibaraki, 300-0324, Japan.

2002 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 71(2), 69-74. (J)

Transovarial transmission of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in the silkworm.

XIAO Q.L., ZHANG Z.F., YI Y. Z., HE J.L.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang, Jiangsu, 212018, China.

2002 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 2(2), 119-122. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Effect of some exogenous factors on silk gland protein in the tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Drury).

BARSAGADE D.D., TEMBHARE D.B.

Department of Zoology, Nagpur University Campus, Nagpur 440 010, Maharashtra, India.

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(1), 34-37. (E)

Determination of digestion and weight increase of *Antheraea yamamai*.

CHAOLIANG L., SHENMING L., JIEMEI W., SHENGZHANG D.

The Department of Sericulture of Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 344-346. (C)

Effect of diesel exhaust on cholesterol uptake by muga silkworms.

HANDIQUE R., BORA D.S., DEY U., KOTOKY D., SAIKIA S.

Department of Life Sciences, Dibrugarh University, Dibrugarh 786 004, Assam, India.

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(1), 29-33. (E)

Evaluation of certain castor genotypes for improving sericulture.

SARMAH M.C., DATTA R.N., DAS P.K., BENCHAMIN K.V.

Regional Eri Research Station, Mendipathar 794 112, India.

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(1), 62-63. (E)

Strategic issues for development of tropical tasar.

SEKHAR REDDY D.S., MOHAN B.N., PRABHAKAR B.S., SHETTY K.K.

Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.

2002 *Indian Silk*, Vol. 41(8), 20-23. (E)

A new polyhouse for oak tasar rearing.

VISHWAKARMA S.R., SINHA B.R.R.P.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi, Jharkhand.

2003 *Indian Silk*, Vol. 41(9), 21-22. (E)

Diapause and voltinism of the distant crossing progeny between *Antheraea yamamai* and *Antheraea polyphemus*.

YOU MIN Z., QINGFENG L.

Sericultural Research institute of Liaoning Province, Fengcheng 118100, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 341-343. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Transcriptional analysis and preliminary characterization of ORF Bm-42 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

ACHARYA A., GOPINATHAN K.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Inst. of Science, Bangalore 560012, India.

2002 *Virology*, Vol. 299(2), 213-224. (E)

Inheritance of one cocoon shape mutant named "flossy cocoon" of the silkworm, *Bombyx mori*.

BANNO Y., FUJII H., DOIRA H.

Inst. of Genet. R., Kyushu Univ. Grad. School of Bioresource and Bioenv. S., Hakozaki 6-10-1, Fukuoka, 812-8581, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70, 189-192. (E)

RAPD studies on the phylogenetic relationship of several species of silk-spinning insects.

DAOJUN C., CHENG L., ZEYANG Z., ZHONGHUI X.

C. of Seric. and Silk Engin., Southwest Agric. Univ., The Key Seric. Lab. of Agric. Ministry, Chongqing 400716, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 277-282. (C)

Molecular cloning and expression pattern of a *Cubitus interruptus* homologue from the mulberry silkworm *Bombyx mori*.

DHAWAN S., GOPINATHAN K.

Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, 560012, Bangalore, India.

2002 *Mech. Dev.*, Vol. 118(1-2), 203. (E)

Improvement of linkage analysis in the silkworm, *Bombyx mori*, by using cDNA clones RFLP.

HARA W., KOSEGAWA E., MASE K., KADONO-OKUDA K.

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

2002 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 71(2), 95-100. (J)

The DNA sequence and structural characteristic of the 5'-nontranscribed spacer of silkworm *Attacus ricini* rDNA.

HE M.L., ZHAO M.J., JIN J.R., LI Z.P.

Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China.

1996 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, Vol. 28(6), 616-623. (E)

The autonomous replication function (ARS) of the scaffold-associated region (SAR) of silkworm *Attacus ricini* rDNA in yeast.

HE M.L., ZHAO M.J., LI Z.P.

Shanghai Inst. of Biochem., Shanghai Joint Lab. of Life S., The C. Academy of Sciences, Shanghai 200031, China.

1998 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, Vol. 30(12), 147-153. (E)

Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus*.

ISHIDA Y., LEAL W.S.

Honorary Maeda-Duffey Lab., Department of Entomology, University of California Davis, 95616, Davis CA, USA.

2002 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32(12), 1775-1780. (E)

The structural and functional analysis of egt gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

JI P., HE J.L., LU H.S., WU X.F.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., CAAS, Jiangsu, Zhenjiang 212018, China.

2002 *Chinese Journal of Virology*, Vol. 16(1), 54-58. (C)

Expression of the arrowhead proteinase inhibitor B (API) gene in the silkworm larvae and pupae.

JI P., ZHANG Z.F., HE J.L., WU X.F., PETER H.Y.

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

1997 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, Vol. 29(1), 17-23. (E)

Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty-eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*.

KADONO-OKUDA K., KOSEGAWA E., MASE K., HARA W.

Genome Research Dept., National Institute of Agrob. Sciences, 1-2, Owashi, Tsukuba, 305-8634 Japan.

2002 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 11(5), 443-451. (E)

Expression of human bone morphogenetic protein 2 in *Bombyx mori* larvae and its purification.

LIN W., MI Y.D., DAI N.H., WU X.F., LI B.L.

Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China.

1996 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, Vol. 28(4), 374-379. (E)

Production of recombinant ovine interferon tau using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis baculovirus expression system.

MANN S.J., LAMING G.E., FISHER P.A., MAEDA S., STEWART H.J., FLINT A.P., MANN G.

Univ. of Nottingham, School of Bios., Division of Animal Physiology, Sutton Bonington, Loughborough, UK.

2002 *Anim. Biotechnol.*, Vol. 13(1), 149-158. (E)

Characterization and molecular phylogenetic analysis of mariner elements from wild and domesticated species of silkworms.

PRASAD M.D., NURMINSKY D.L., NAGARAJU J.

Lab. of Molecular Genetics, Center for DNA Fingerprinting and Diagnostics, ECIL Road, Nacharam, Hyderabad 500076, India.

2002 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 25, 210-217. (E)

Cloning and sequence analysis of *Galleria mellonella* juvenile hormone binding protein-a search for ancestors and relatives.

RODRIGUEZ PARKITNA J.M., OZYHAR A., WISNIEWSKI J.R., KOCHMAN M.
Div. of Biochem., Inst. of Organic Chemistry, Biochem. and Biotech., Wroclaw University of technology, Poland.
2002 Biol. Chem., Vol. 383(9), 1343-1355. (E)

Temporal expression profile of late gene expression factor 4 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

SEHRAWAT S., GOPINATHAN K.
Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, 560012, Bangalore, India.
2002 Gene, Vol. 294(1-2), 67. (E)

Characterization of the cytochrome oxydase subunit III gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.

WEI Z.J., ZHAO Q.L., ZHANG Z.F., XIAO Q.L., WANG Z.F., HE J.L.
Key Labo. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, China.
2002 Acta Entomologica Sinica, Vol. 45(2), 193-197. (C,e)

Identification of functional region of helicase gene promoter in *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

XIAO Q.L., ZHANG Z.F., YI Y.Z., HE J.L., WU X.F.
Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, China.
2002 Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Vol. 34(5), 560-564. (C,e)

Functional analysis of helicase gene promoter and homologous region 3 enhancer in *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

XIAO Q.L., ZHANG Z.F., YI Y.Z., HE J.L., WU X.F.
Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, China.
2001 Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Vol. 33(5), 525-530. (C,e)

In vitro and in vivo transient expression in insect cells mediated by the cationic liposome DDAB/DOPE.

XIAO Q.L., ZHOU Y.J., ZHANG Z.F., HE J.L.
Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang, Jiangsu, 212018, China.
2002 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 4(1), 57-62. (E)

Cloning and analysis of structure of nd1 and its connected tRNA genes of mitochondrial genome from eri silkworm *Samia cynthia ricini*.

XINGJIA S., QIAOLING Z., ZHIFANG Z., YIREN L., JIALU H., BO W.
Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., Chinese Acad. of Agric. Sciences, Zhenjiang 212018, China.
2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 289-293. (C)

Sequence analysis and expression of cysteine proteinase gene from *Bombyx mori* baculovirus.

XUAI L., ZHIFANG Z., WEIGUO L., JIALU H., JINYAN S.
Sericultural Department of Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.
2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 308-312; (C)

The recombination and expression of a chimeric antibody light chain gene in cells of silkworm *Bombyx mori*.

YANG G.Z., WU X.F., ZHANG W.X., LI S.D.

Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China.

1996 *Shang Xu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, Vol. 28(6), 653-658. (E)

RAPD analysis of DNA polymorphism of *Antheraea pernyi*.

YANQUN L., CHENG L., ZHONGHUI X.

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

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 283-288. (C)

Expression of human endostatin in larvae of silkworm (*Bombyx mori*) and in vitro activity assays.

YONGFENG J., YINGFEI W., ZHENHONG Z., YAOZHOU Z.

Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou, People's Republic of China.

2002 *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, Vol. 6(4), 293-299. (E)

Construction of the host range expanded recombinant-rescue insect Baculovirus expression vector and the expression of foreign gene.

YONGZHU Y., YIN C., ZHIFANG Z., JIALU H., JIAN Q.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., Chinese Acad. of Agric. Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 304-307. (C)

Studies on the nucleotide sequence, transcription and deletion analysis of the BmNPV protein kinase gene.

ZHANG C.X., HU C., WU X.F.

Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China.

1998 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, Vol. 30(2), 184-190. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Ca(2+) as second messenger in PTTH-stimulated prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*.

BIRKENBEIL H., DEDOS S.G.

Sachs. Akad. der Wissenschaften zu Leip. AG Neuro., Wirkungsmechanismen, Erbert-Str. 1, PF 100322, 07703, Jena, Germany.

2002 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 32(12), 1625-1634. (E)

Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle.

BRIVIO M.F., PAGANI M., RESTELLI S.

Department of Structural and Functional Biology, Univ. of Insubria, via J.H. Dunant 2, 21100, Varese, Italy.

2002 Exp. Parasitol., Vol. 101(2-3), 149-156. (E)

Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph.

CHOI S.S., RHEE W.J., PARK T.H.

Sch. of Chem. Engin. and Inst. of Chem. Proc., Seoul Nation. Univ., Kwanak-Gu Shilim-Dong San 56-1, Seoul 151-744, Korea

2002 Biotechnol. Prog., Vol. 18(4), 874-878. (E)

Purification and properties of arylsulphatase from the brain of the silkworm *Bombyx mori*.

FAROOQUI A.A., YUSUFI A.N.

Department of Zoology, Aligarh Muslim University, Aligarh, 202001 India.

1976 J. Neurochem., Vol. 27(5), 1191-1195. (E)

The male silkworm moth (*Antheraea pernyi*) is a key ingredient in hu-bao and sheng-bao for specific prolongation of the life-span of the male fruit fly (*Drosophila melanogaster*).

HU K., WANG Q., HU P.Q.

Drosophila Laboratory, Center for Biological Research Hainan University, haikou, China.

2002 Am. J. Chin. Med., Vol. 30(2-3), 263-270. (E)

Co-ordination of firing activity of neurosecretory cells with cardiac activity in the silkworm *Bombyx mori*.

ICHIKAWA T., OKADA Y.

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, 812-8581, Fukuoka, Japan.

2002 Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., Vol. 133(1), 117. (E)

In vitro cultivation of spermatocysts to matured sperm in the silkworm *Bombyx mori*.

KAWAMURA N., SAHARA K.

Biology Lab., Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Sapporo, Japan.

2002 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 44(4), 273-280. (E)

Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (Sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M.

Silk Science Research Institute, Tokyo, Japan.

2002 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 66(6), 1396-1399. (E)

NMR structure of the unliganded *Bombyx mori* pheromone-binding protein at physiological pH.

LEE D., *et al.*

Institut für Molek. und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule-Zürich, Zürich, Switzerland.

2002 *FEBS Lett.*, Vol. 531(2), 314-318. (E)

Amylase and succinate dehydrogenase activity levels in F1 progeny raised from ethyl methanesulfonate treated silkworm, *Bombyx mori* L.

MAHESHA H.B., HONNAIAH S.

Department of Studies in Sericultural Science, Univ. of Mysore, Manasagangotri, Mysore 570 006, India.

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(1), 24-28. (E)

Purification and characterization of hilverdin-binding vitellogenin from the hemolymph of the common cutworm, *Spodoptera litura*.

MARUTA K., YOSHIGA T., KATAGIRI C., OCHIAI M., TOJO S.

Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga, Japan.

2002 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 50(2), 97-106. (E)

***Bombyx* in a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera.**

NIJHOUT H.F., GRUNERT L.W.

Department of Biology, Duke University, Durham, NC 27708.

2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. (E)

Cloning and characterization of testis-specific tektin in *Bombyx mori*.

OTA A., *et al.*

Lab. of Sericultural S., Faculty of Agriculture, Kyushu Univ. Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, 812-8581, Fukuoka, Japan

2002 *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 133(3), 371-382. (E)

Effect of local heavy ion beam irradiation on hemopoietic function of the larval hemopoietic organs of silkworm, *Bombyx mori*.

SHIQING X., KIGUCHI K., ENJUN L., SHIRAI K., FUKAMOTO K., ZHENLI T.

Department of Sericulture, Soochow University, Suzhou 215006, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 298-300. (C)

Behavior of silkworm yolk protein on phospholipid membranes.

TOSHIMA Y., KAWASAKI K.

Insect Biomaterial and Technology Dpt., N. Inst. of Agrobio. S., 1-2 Oowashi, Ibaraki 305-8634, Tsukuba, Japan.

2002 *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1564(2), 375. (E)

Insect juvenile hormone enhancing gene expression in silkworm baculovirus vector system.

WANG H.W., ZHANG Z.F., XIAO Q.L., LI W.G., HE J.L.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, China.

2001 Chinese Journal of Biotechnology, Vol. 17(5), 590-593. (C,e)

Effects of different inducements on esterase proteins in the hemolymph of diapausing pupae of chinese oak silkmoth, *Anthraea pernyi*.

WENCHU L.

College of Art Design, South China Agricultural University, 510642, Guangzhou, China

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(1), 19-23. (E)

Expression of the gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide during post-embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*.

XU W.H., YAMASHITA O.

The Sericulture Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212000, China.

1996 Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), Vol. 28(2), 214-217. (E)

Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*.

YU K., KIM K., LEE J., LEE H., KIM S., CHO K., NAM M., LEE L.

Dept. of Life S., Hoseo Univ., 29-1 Sechuli, Baebang-Myum, 336-795, Asan City Choongnam-DO, South Korea.

2002 Dev. Comp. Immunol., Vol. 26(8), 707.

Effect of silk fibroin of the silkworm (*Bombyx mori* L.) on cholesterol metabolism in the rat.

ZHONGZHENG G., DAHUAN Z.

The Sericulture R. Inst., Chinese Academy of agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 301-303. (C)

Foreign insect hormones stimulating the transcription of the ie-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in vivo and in vitro.

ZHOU Y., XIAO Q., ZHANG Z., HE J., ZHANG Y.

Min. of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Acad. of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu, China.

2002 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 66(7), 1488-1494. (E)

Foreign insect hormones stimulating the transcription of the ie-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in Vivo and in Vitro.

ZHOU Y., XIAO Q., ZHANG Z., HE J., ZHANG Y.

Key Lab. of Silkworm Bio., Min. of Agric., Seric. Res. Inst., C. Acad. of Agric. Sci., Zhenjiang, 212018, Jiangsu, China

2002 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 66(7), 1488-1494. (E)

Effects of insect hormones on the replication of nucleopolyhedrovirus.

ZHOU Y.J., YI Y.Z., XIAO Q.L., ZHANG Z.F., HE J.L., ZHANG Y.X.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, Jiangsu, China.

2002 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 4(2), 137-141. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

The influence of supercooling silkworm eggs on the induction ratio of tetraploid and the sex ratio of the offspring.

FUSHENG C.

Dpt of Seric. and Apiculture, C. of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.
2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 294-297. (C)

The artificial intelligence system of measure and control for the hatching condition of silkworm eggs.

MING Z., XIAOGUANG L., SHANGREN C., JIAN W.

Nanjing Nanda Mingxue Sience and Technology Ltd., Nanjing 210093, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 356-360. (E)

The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkmoth *Bombyx mori* : hormonal control and ovarian expression.

SWEVERS L., EYSTATHIOY T., IATROU K.

Inst. of Biol., Nat. Centre for S. R. "Semokritos", P.O. Box 60228, Aghia Paraskevi Attikis, 15310, Athens, Greece.

2002 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol.32(12), 1643-1652. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Ultrastructure of the major ampullate gland of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*.
CASEM M.L., TRAN L.P., MOORE A.M.
Dpt. of Biol. S., California State University, P.O. Box 6850, 92834-6850, Fullerton, CA. USA.
2002 Tissue Cell, Vol. 34(6), 427-436. (E)

Solute diffusion in genetically engineered silk-elastinlike protein polymer hydrogels.
DINERMAN A., CAPPELLO J., GHANDEHARI H., HOAG S.
Univ. of Maryland School of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Sciences, 20 N. Pine Street, 21201,
Baltimore, MD. USA.
2002 J. Control Release, Vol. 82(2-3), 277. (E)

Study on construct and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk in *Escherichia coli*.
LI M., ZHANG W.X., HUANG Z.H., HUANG J.K.
College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China.
2002 Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, Vol. 18(3), 331-334. (E)

Controlled release of plasmid DNA from a genetically engineered silk-elastinlike hydrogel.
MEGEED Z., CAPPELLO J., GHANDEHARI H.
Univ. of Maryland School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, Baltimore 21201,
USA.
2002 Pharm. Res., Vol. 19(7), 954-959. (E)

Surprising strength of silkworm silk.
SHAO Z., VOLLRATH F.
Dept. of Macromolecular S. and Key Lab. of Polymer Engin. of Educ. Min., Fudan Univ.,
Shanghai 200433, China.
2002 Nature, Vol. 418(6899), 741. (E)

Soie

Silk

Silk-based biomaterials.

ALTMAN G.H., *et al.*

Dpt of Chemical and Biol. Engineering, Bioengineering Center, Tufts Univ., 4 Colby Street, 02155, Medford, MA, USA.

2003 Biomaterials, Vol. 24(3), 401-416. (E)

Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments.

ALTMAN G.H., HORAN R.L., LU H.H., MOREAU J., MARTIN I., RICHMOND J.C., KAPLAN D.L.

Bioengineering Center, Dept. of Chemical and Biological Engineering, Tufts Univ., Medford, MA 02155, USA.

2002 Biomaterials, Vol. 23(20), 4131-4141. (E)

Swelling behavior of a genetically engineered silk-elastinlike protein polymer hydrogel.

DINERMAN A.A., CAPPELLO J., GHANDEHARI H., HOAG S.W.

Dept of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Maryland School of Pharmacy, 20 N. Pine Street, Baltimore, MD 20201, USA.

2002 Biomaterials, Vol. 23(21), 4203-4210. (E)

Research on relationship between cocooning circumstances and raw silk neatness.

FENGZHU Z., LONGJIE L., YANG H., JIANJUN P., XIDANG S.

College of Forestry Shandong Agriculture University, Taian 271018, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 317-319. (C)

Acid hydrolysis of silk fibroins and determination of the enrichment of isotopically labeled amino acids using precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry.

HESS S., VAN BEEK J., PANNELL L.K.

S. Mass Spectr. Fac., Nt. I. of Diab. and Dig. and Kid. Dis., Nt. I. of Hth. B. 8, Rm B2A27, 20892-0805 Bethesda, MD, USA

2002 Anal Biochem., Vol. 311(1), 19-26. (E)

Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly (ethylene oxide).

JIN H.J., FRIDRIKH S.V., RUTLEDGE G.C., KAPLAN D.L.

Dpt of Chemical & Biol. Engineering, Bioengin. Center, Tufts Univ., 4 Colby Street, Medford, Massachusetts 02155.

2002 Biomacromolecules, Vol. 3(6), 1233-1239. (E)

Effect of pH of dye bath on dyeability of chitosan-treated tussah silk fabric dyed with acid, basic and disperse dyes.

KAKO T.

2002 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 71(2), 115-117. (J)

Amyloidogenic nature of spider silk.

KENNEY J.M., KNIGHT D., WISE M.J., VOLLRATH F.

Inst. for Storage Ring Facilities, Univ. of Aarhus, Denmark.

2002 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 269(16), 4159-4163. (E)

High-performance fibers from spider silk.

KUBIK S.

Inst. für Org. Chemie und Makro. Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany.

2002 *Angew Chem. Int. Ed Engl.*, Vol. 41(15), 2721-2723. (E)

Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets.

LI M., OGISO M., MINOURA N.

Material Engineering Inst. of Suzhou Univ., Ganjiang Eastern Road 178, 215021, Suzhou, China.

2003 *Biomaterials*, Vol. 24(2), 357-365. (E)

Genetic synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive silk-elastinlike protein block copolymers.

NAGARSEKAR A., CRISSMAN J., CRISSMAN M., FERRARI F., CAPPELLO J., GHANDEHARI H.

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Maryland School of Pharmacy, Baltimore, Maryland 21201.

2002 *J. Biomed Mater Res.*, Vol. 62(2), 195-203. (E)

Dyeing of silk with brazirein.

NAGASHIMA N., OGASAWARA S., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University, Kaga 1-18-1, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan.

2002 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 71(2), 83-88. (J)

Rheology and dynamic lights scattering of silk fibroin solution extracted from the middle division of *Bombyx mori* silkworm.

OCHI A., HOSSAIN K.S., MAGOSHI J., NEMOTO N.

Dpt. of Molecular and material Sciences, IGSES, Kyushu Univ., Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan.

2002 *Biomacromolecules*, Vol. 3(6), 1187-1196. (E)

Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo.

VOLLRATH F., BARTH P., BASEDOW A., ENGSTROM W., LIST H.

Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, England.

2002 *In Vivo*, Vol. 16(4), 229-234. (E)

Preliminary study on the primary structure of dragline fibroin from the spider *Araneus ventricosus*.

WANG Y., XIE J.Y., LIANG S.P.

Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081, China.

1997 *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, Vol. 29(5), 469-474. (E)

The effect of initiation less graft copolymerization on silk fibre properties.

XUE B., GUOQIANG C.

College of Material Engineering, Soochow University, Suzhou 215021, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 349-351. (C)

Preparation of a novel core-shell nanostructured gold colloid-silk fibroin bioconjugate by the protein in situ redox technique at room temperature.

ZHOU Y., CHEN W., ITOH H., NAKA K., NI Q., YAMANE H., CHUJO Y.

Dept. of Polymer Chemistry, Graduate School of Engin., Kyoto Univ., Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501, Japan;

2001 Chem. Commun., Vol. 23, 2518-2519. (E)

Preliminary report on a cocoon cutting machine.

ZUOZHONG H., ZHOUHE D., SHENG B., YINGHE W., HUAMING Z., RONG P., JIE P.

The Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, China.

2002 Canye Kexue, Vol. 28(4), 352-355. (C)

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 x 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.

