

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
CROIZIER G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
J. E. MIRANDA (Brésil / *Brazil*)
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

Revue / Review

- Conservation and utilisation of sericigenous insects in North East region of India . . . 1**
 Conservation et utilisation des insectes séricigènes dans la région du nord-est de l'Inde . . . 17
 R. N. SINGH & M. MAHESHWARI

Scientific papers / Articles scientifiques

- Chorion architecture in the Japanese giant silkworm, *Caligula japonica japonica* Moore 29**
 Architecture du chorion chez le papillon à soie géant japonais, *Caligula japonica japonica* Moore 41
 Y. KAWAGUCHI, M. ICHIDA, T. KUSAKABE & K. KOGA

- Developmental changes in surface architecture and some inorganic components in the muga silkworm (*Antheraea assama*) Ww., Lepidoptera : Saturniidae eggshell (chorion) 45**
 Changements au cours du développement de l'architecture et des composants inorganiques du chorion de l'œuf du papillon à soie muga (*Antheraea assama*) Ww., Lepidoptera : Saturniidae 55
 SUDIP DEY, R. N. K. HOOROO, A. RAGHUVARMAN, N. BISWAS & P. S. DKHAR

- Changes of esterase A4-activity and its relationship with diapause in hot water treated eggs of silkworm, *Bombyx mori* 61**
 Changements de l'activité estérase A4 au cours de la diapause chez les œufs du ver à soie *Bombyx mori* traités à l'eau chaude 69
 XU SHI-QING, HIDENORI KAI, XU JUN-LIANG, SIMA YANG-HU, CHEN XI-LIN & ZHENG BI-PING

Technical reports / Rapports techniques

- Effect of vitamin C on feeding habit and growth and development of the silkworm, *Bombyx mori* L. 73**
 Effets de la vitamine C sur le comportement alimentaire, la croissance et le développement du ver à soie *Bombyx mori* L. 81
 CUI W.-Z., SHANG J.-Y., WANG B. & CHENG A.-W.

- Physio-biochemical changes during plant ageing in mulberry (*Morus alba* L.) 85**
 Changements physio-biologiques et biochimiques au cours du vieillissement du mûrier (*Morus alba* L.) 91
 A. K. MISRA, C. DAS, T. SENGUPTA & B. SARATCHANDRA

- Isolation and culture of leaf protoplast of Indian mulberry (*Morus indica* var. K-2) . 95**
 Isolement et culture des protoplastes de la feuille du mûrier indien (*Morus indica* var. K-2) 103
 ANITA KAPUR, SOMIKA BHATNAGAR & PARAMJIT KHURANA

A protocol to reduce the cost of <i>in vitro</i> propagated plants of mulberry	109
Protocole pour réduire le coût de la multiplication de plants de mûrier <i>in vitro</i>	117
M. C. GAYATRI, H. M. REVANASIDDAIAH & R. KAVYASHREE	

Brief notes / Notes brèves

Ascorbic acid, an index of fungal infection of mulberry leaf	119
L'acide ascorbique, indice d'infection fongique de la feuille de mûrier	123
S. K. MAJUMDER, P. C. BOSE, N. D. BANERJEE & P. PRATHEESH KUMAR	

Phenotypic stability analyses for leaf yield parameters across three-year environments in improved genotypes of mulberry (<i>Morus alba</i> L.)	125
Analyses sur trois ans de la stabilité phénotypique pour les paramètres de rendement foliaire chez des génotypes de mûrier améliorés (<i>Morus alba</i> L.)	129
SANTOSHAGOUDA V. PATIL, S. B. DANDIN & R. S. MALLIKARJUNAPPA	

Bibliographie / Bibliography 131

Sériciculture générale / General sericulture	133
Mûrier / Mulberry	135
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	137
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	141
Vers à soie : génétique / Silkworms : genetics	143
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms : physiology, biochemistry	145
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms : eggs, embryology	147
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms : silk glands	149
Soie / Silk	151

CONSERVATION AND UTILISATION OF SERICIGENOUS INSECTS IN NORTH EAST REGION OF INDIA

R. N. SINGH & M. MAHESHWARI

Central Silk Board, Bangalore 560 068, India.

Keywords : Conservation, sericigenous, *Antheraea proylei*, *Antheraea assama*, *Philosamia ricini*.

INTRODUCTION

Non mulberry silkworm rearing is an exclusive craft of tribes inhabiting the humid and dense forests of the north-eastern region. Tasar and muga are produced by semi-domesticated caterpillars, with wild living and feeding habits but bred in captivity (Sinha, 2000). While tasar is largely confined to Central India (Jolly *et al.*, 1974), muga has its abode in North Eastern India (Assam and Meghalaya) (Thangavelu, *et al.*, 1988). So far as oak tasar is concerned, the population of *Antheraea proylei* – a synthesised hybrid of *Antheraea roylei* (India) and *A. pernyi* (China) is propagated in north eastern region feeding on *Quercus* sp. (Jolly *et al.*, 1973, 1975 and Jolly, 1976). Eri silkworm, *Philosamia ricini* is reared in the North east. The eri silkworm is domesticated like mulberry for its entire life cycle from egg production to rearing and cocoon production (Sarkar, 1988).

North eastern region of India is the natural abode of a large number of sericigenous insects which are in need of providing the conditions for their conservation due to deforestation, urbanisation and shrinking of their natural habitat (Barua *et al.*, 2000 ; Chaudhury, 1981). Several wild silk moths have been reported from India and out of that four are commercially exploited (Jolly *et al.*, 1976). The north-eastern region of India is the richest place in the country where biodiversity is seen in its bed and grandeur. Though sericulture is traditional in this region from time immemorial, eri and muga culture are more or less exclusive prerogatives. Oak tasar culture is, however a recent introduction and its prospects from a commercial point of view are yet to be ascertained (Sengupta, 1985). Various chemotypes in plants as well as races or biotypes in insects have emerged due to continuous feeding and selection pressure exerted by insects and plants on each other: plants develop new chemicals against insects and insects develop detoxification mechanisms, enabling each to enter a new adaptive zone and resulting in diversity (Ananthakrishnan, 1994).

Normally, there are three types of biodiversity which represents wealth of ecosystem; habitat diversity, genetic diversity and species diversity (Mehrotra and Kushalapa, 1994). Each habitat is the home of numerous species which are dependent on the habit (Brazier *et al.*, 1976). Therefore, destruction of any habitat will mean the disappearance of a vast number of species (Raina and Kioko, 2000). There are a large number of beneficial insects inhabiting the region which play an important role in the conservation and utilisation of biodiversity. Wild silk moths is one of them (Frankel, 1982, Peigler 1993 and Kioko, 1998). It is not only a source of silk and delicacies for the people of the North-Eastern region but it also plays an important role in the management of eco-system (Sengupta *et al.*, 1993). Insects are the chief consumers of plants; they are the major predators of plants. They play a major role in the decay of organic matters and they serve as food for other kinds of animals. Knowing these ecological facts, these organisms have been accepted to be diverse and adaptable and

they are (Jolly *et al.*, 1968; Thangavelu and Bhagowati, 1985, Stone 1991 and Jolly, 1976). North Eastern region of India is the centre of diversity of commercially exploited non mulberry silkworms – oak tasar moth (*Antheraea proylei* Jolly), muga moth (*Antheraea assama* Westwood) and eri silk moth (*Philosamia ricini* Bois.), all belonging to the family, saturniidae. Muga moth (*Antheraea assama*) which produces the golden silk is exclusively restricted to the Northeast region of India. Except the eri silkworm all others are reared outdoors subjecting them to hazards from predators, parasites, diseases and climatic odds like extreme hot and cold temperatures, winds, hailstorms, cyclones, etc. (Singh *et al.*, 2000 a & b). Therefore, an attempt has been made to find out suitable strategies for collection and conservation of sericigenous insects and its host plants in the region. It will not only be helpful in preserving the biodiversity but also in increasing the economic conditions of the farmers engaged in sericulture.

NATURAL CONDITION

The Eastern Himalayan region comprising Sikkim, the districts of Darjeeling, CoochBehar and Jalpaiguri of West Bengal and the state of Assam, Manipur, Meghalaya, Nagaland, Arunachal Pradesh, Tripura and Mizoram is one of the 15 agro-climatic zones identified by the Planning Commission, Government of India (Anonymous, 1989). Overall the region has a total geographical area of 274.87 thousand sq. km and stretches between 22°-29° 30'N latitude and 88° 05'-97° 24' E longitude. The topography of the region is divided into three main units i.e. hills and mountain, peninsular plateaus and valleys. The hill area constitutes 77.00% of the region. Of the total areas of the region, 35% lies in the elevation range of above 1,200 m and 18% in the range of 600-1200m. The latitude range from 97 m in the valleys to as high as 5000 m through a confused labyrinth of hills and ranges intervened by deep gorges.

There is a wide disparity in their agro climatic conditions also. In general, the climate of the North Eastern region is like that of sub-tropical, with moderate temperature in all the seasons except heavy rainfalls. Minimum – maximum temperature and relative humidity ranges from 5-35° C and 55-93% respectively. Annual rainfalls are very high. It ranges from 1986 mm to 3039 mm per year (Singh and Sen, 2001). The rainy season is longer in Assam. The soil structure of this belt is sandy to sandy loam rich in humus content. Soil pH varies from 4.97 to 7.95. The total geographical area of the region is about 25.5 million hectares, but statistical information regarding land utilization is available only for about 22.8 million hectares or 89 percent of the total area (Anonymous, 1989).

The bio-ecological condition of all the states located in the region is different and therefore, there is a large number of variation in the flora and fauna. The state of rising sun Arunachal Pradesh is famous for its blue mountain hill which has possessed numerous flora and fauna of economic importance. Assam, the home land of golden muga fabric producing insects, muga silkworm (*Antheraea assama*) is very rich in flora and fauna. Accordingly, Manipur, Meghalaya, Mizoram, Nagaland and Tripura have a tremendous potential for revenue generation through its various types of flora and fauna and it also helps in maintaining an eco-friendly environment in their region. There is a reflection of many diverse factors in the entire region.

FOREST FLORA DISTRIBUTION AND DEPLETION

The forests constitute a powerful ecological unit having a vital environmental significance. They influence the local and regional climate and help in maintaining soil mantle, purifying the air and helping in ensuring a continuous flow of clear water. The forest helps in forming the water sheds on the mountain and checks soil erosion and excess floods (Jain and Bradshwa, 1966). By reducing the silt load of the rivers, the forest also helps in preventing the clogging of reservoirs in hydel projects, irrigation systems and canals. The forests can therefore, be considered as the most crucial life support

system as they conserve water and soil on which food production depends in the region (Frankel, 1970, Raina and Kioko, 2000).

Oak plant distribution is scattered in the entire North Eastern region. It has been estimated that about 40,000 hectares of oak flora is available in Manipur out of which 20,000 hectares is within easy reach of the inhabitants and can be exploited for raising oak tasar crop. The entire oak flora is mainly confined to the hills where it has attained the form of small bushes and dwarf trees because of regular cuttings for fire wood. *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* and *Quercus griffithii* are predominantly found in Manipur. *Quercus serrata* and *Quercus dealbata* are distributed in lower altitude (2000-3000' ASL) region as mixed vegetation while *Quercus griffithii* is mainly available in the upper ridges. In Nagaland Oak flora is mainly available in Kohima, Phek and Tuensang districts at an altitude of 3000-6000 ASL. The total area under oak plantations is roughly estimated to be 15,000-20,000 hectares. The species available are *Quercus serrata*, *Quercus dealbata*, *Quercus griffithii*, *Quercus lineata*, *Quercus lamellosa*, out of which only *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* and *Quercus griffithii* are being utilised for feeding of oak tasar silkworms. All the oak growing areas are easily accessible in the state. Oak tasar plants i.e. *Quercus serrata* and *Quercus dealbata* are abundantly available in North Cachar Hills and Garampani area of Assam. Out of 24,000 hectares of available plantations, only 1000 hectares are utilised for rearing of silkworm. The oak tasar plantation in Meghalaya is confined to Bhoi area east of Khasi hills and Garampani area of Jaintia Hills where nearly 23,000 hectares of *Quercus serrata* and *Quercus dealbata* plantations are available. Most of the plants are in the form of tall trees and widely dispersed over steep hills and deep gorges. The oak plantation in Mizoram is confined to Champai and Lunglei area where 15000 hectares are covered. *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* and *Quercus griffithii* exist as tree species. Further, a total area of 25,000 hectares are under oak plantation in Arunachal Pradesh. However, the species suitable for oak rearing are *Quercus griffithii*, *Quercus semicarpifolia* and *Quercus dealbata*. These species cover an area of 1,70,000 hectares. Though the climate is quite ideal and suitable oak species are available in plenty, yet population density which is very thin (7 per sq. km.) poses great constraints for their commercial exploitation (Stone, 1991, Singh and Sen, 2001). Earlier workers have reported a large diversity in the sprouting and maturity behaviour of various species of oak plants. The same species sprouts at different times at different altitudes. *Q. semicarpifolia* which is a slow maturity variety is abundant at higher altitudes (7000-9000 above MSL) and *Q. himalayana* is found at an altitude of 5000-7000 feet above MSL (Jolly, 1969).

The muga silkworm is polyphagous on certain Lauraceae. The major plant preferred by the silkworm is som (*Machilus bombycina*) and soalu (*Lytsaea polyantha*). Som is naturally abundant in upper Assam (Dibrugarh, Sibsagar, Jorhat and Lakhimpur) in large plantations in the forest which is commercially exploited for reeling cocoon production (Chandarsekhar and Thangavelu, 1986). Soalu is normally distributed in the foot hills of lower Assam extending up to Garo hills ranges of Meghalaya and is utilized as food plants of muga seed cocoon production. It occurs in more scattered form in the forest and also in waste lands among villages. The food plants grow well in warm and humid conditions with rainfalls and acidic soils. These food plants are naturally abundant in North eastern India both in plains of Brahmaputra basin and in eastern Himalayan ranges of Khasi, Garo, Naga, Jaintia, Patkai, Mizo hills and also in major Himalayan ranges extending up to Punjab. Both these trees are also cultivated.

Eri food plants are abundantly available in all parts of North eastern region. Castor, kesseru, payam, tapioca are in order of choice of the food plants. Castor (*Ricinus communis*) is by far the best food plant grown and used mainly for eri culture in all states of North eastern region (Singh *et al.*, 2000, Sarkar, 1988, Misra, 1984). Eri culture is extended, up to the altitude of 5000 m and to the lowest level of plains without any water logging in temperature varying from 26 to 35° C (Misra, 1987).

The host plant dominated forests are being depleted continuously due to various reasons. The phenomenon of forest depletion is not peculiar to North east alone; it relates to other parts of the

country and is also common in the world. Tribal and rural households collect firewood mostly from the forest and orchard plantation conducted under social forestry programme. There is continuous deforestation and several important plants are being cut for house hold purposes. The deforestation is much higher in comparison to afforestation. It has tremendous adverse impact on the ecological unbalance in the nature. "Chanddhuvu" is an important forest resort and tourist place in Assam but continuous depletion of age old plantations has caused an adverse effect on the ecological habitat of the area. Ecological condition within Kaziranga National Park (Assam) is also deteriorated due to deforestation and shortage of other vegetation within the area (Singh and Sen, 2001). Continuous deforestation of major flora and high predominance of phytophagous insect has caused an ecological unbalance and destroyed the native natural habitat of important sericigenous insects in the region. Similar conditions persist in Arunachal Pradesh. The plants are being cut continuously for the use of fuel and other purposes. However, nowadays, attempts have been made to maintain the ecological balance in the nature.

USE AND POTENTIAL

Besides affording environmental protection and conservation, an almost equally important function of forest is the production of wood and a host of non wood products, all of which together have a major bearing on the national economy. The tribal people of the region depends on forest for shifting cultivation, food gathering, building material and employment. The forests provide timber, bamboos, tender leaves, oil seeds, tans and dyes, kutch and katha, gums, pine resin, lac, honey, drugs spices, insecticides, edible products, mahua flower, tamarind, cashew, clove etc., fibres and flosses and silk. Wood is the versatile raw material, which is used by man from the cradle to the grave. The forests constitute a powerful ecological unit having vital environmental significance. They influence the local regional climate and helps in the maintenance of the soil mantle, purifying the air and help in ensuring the continuous flow of clear water. Forest plays a major role as shelter-belts.

Non-mulberry silk production is the by product of forest in the entire region. Most of the plants especially som, soalu, oak plants, castor, payam are used for rearing of various silkworm in the region from a long time. Sericulture plays an important role in the maintenance of ecological condition of the region. Central Silk Board has launched muga augmentation programme and it helped a lot in the conservation of various exotic races in the region. A survey has been conducted for the collection of sericigenous insects in upper Assam and Arunachal Pradesh forest area and attempts are being made for conservation of these races in its native natural habitat (Singh and Sen, 2001).

SERICIGENOUS INSECT

North Eastern region of India is the home of a large number of natural population of sericigenous insects which are in need of providing conditions for their conservation (Arora and Gupta, 1979). Among the one hundred and sixty species of non-mulberry silkworm so far recorded, the genera *Antheraea* is the largest group in the saturniidae comprising a variety of sericigenous insect (Seitz, 1930, Peigler, 1989 and 1996). The most common and commercially exploited species are *A. mylitta* Drury, *A. proylei* Jolly., *A. pernyi* Guer., *A. assama* Westwood, *A. roylei* and *Philosamia ricini* (Jolly, 1985). Some other wild *Antheraea* species have also been reported. The common among them are *A. compta*, *A. frithii* Guer, *A. helferi* Guer, *A. helferi* Guer, *A. knyvetti* Guer, *A. roylei* (Crotch, 1956, Jolly et al., 1975; Sengupta et al., 1993). Three species of *Philosamia* (= *Semia*), two each of *Loepa*, *Salasea*, *Attacus* and *Caligula* and one each of *Actias* and *Dictyoploca* have been reported (Seitz, 1933; Oliver, 1980). Apart from this *Actias selene*, *A. maenas*, *A. leto* and *Attacus atlas*, *A. luna*, *A. edwardsi* are also found in some ecological pockets (Oliver, 1979a & b; Seitz 1930). Recently, a large population of *Criculla trifenestrata* has been recorded from Assam (Ahmed, 1997., Narang and Gupta, 1979a). A total of 11 species of wild silk moths are abundantly available in the entire region and their

conservation will ensure the protection of forest wealth by utilizing the available food plants for rearing thereby generating revenue for the silk farmers in the region (Narang and Gupta, 1980). However, the natural population density of *A. frithii*, *A. pernyi*, *A. roylei*, *A. atlas*, *A. edwardsi* and *P. cynthia* are very low and they are seldom and not regularly collected indicating a trend in the decline of their natural population level (Sinha and Jolly, 1967). There are a large number of morphological similarities among various silkworms but they measure genetically different (Arora and Gupta, 1979). Species that are genetically similar to each other are more likely to share a common ancestor than with the species from which are genetically different. Various species have been hybridized in genus *Antheraea* to know the genetic distance between different species (Jolly, 1976).

The hybrid of *A. roylei* and *A. pernyi* named as a new species, *A. proylei* Jolly (Jolly *et al.*, 1973; Jolly 1976) reveals 30 elements at metaphase I in males in F1 generation, but the number of such elements varies from 32 to 49 in F2 and back cross individuals (Jolly *et al.*, 1973). The hybrid has been reared by self-mating for the last several years. The cytogenetic study confirmed constant chromosome number i.e. $2n = 98$ as this number has been recorded invariably in seven male individuals, though the number of available cells studies is only fifteen (Narang and Gupta, 1979d, 1980). It is however necessary to confirm this point by further studies. Tazima (1974) put forward the view that the increased number of chromosomes of *A. pernyi* evolved from the chromosomes of *A. roylei* by splitting because F1 hybrid show a complete pairing of the chromosomes of both the species and has invariably 30 elements (bivalents and trivalents) at metaphase I. The remarkable fertility of *A. roylei*–*A. pernyi* hybrids, despite the variable chromosome number known to be existing so far (Jolly *et al.*, 1973), further shows closeness of *A. roylei* with *A. pernyi*. Since the population of hybrids is a mixed one having variant chromosome numbers and is an existing symmetric ally with *A. roylei* without attaining reproductive and/or ecological isolation from the latter, its status as a new species seems to be doubtful. Traut and Mosbacher (1968) and Ennis (1976) reported the sex chromatin in the somatic tissues of the females of many lepidopteran species studied and interpreted this female specific heterochromatin to represent the Y. Brigger (1975) reported sex chromatin in germ cells of the females of 3 species of butterflies, and on comparison of its morphology with that of the sex chromosomes, interpreted it to be X. However, the acceptance of Brigger's interpretation should await the sex chromatin study in the somatic tissues as well. Sex chromatin in saturniids has already been reported to be present in somatic tissues of only the females of four species i.e. *P. cynthia*, (Traut and Mosbacher, 1968), *Actias luna*, *Automerisio* and *Dryocampa rubicunda* (Ennis, 1976) and absence in both the sexes of *P. ricini* and *A. assamensis* (Chowdhury & Bhuyan, 1962) and *Anisota senatoria* (Ennis, 1976, Nagarnag and Gupta, 1979e).

Hybrids of *A. assama* × *A. mylitta*, *A. pernyi* × *A. mylitta*; *A. mylitta* × *A. roylei*; *A. mylitta* × *A. frithii* have been trialed and attempts have been made to evolve a suitable variety for exploitation in the entire region (Sengupta, 1985). It has yielded viable offspring, forming cocoons but their resulting moths are sterile. *A. mylitta* is near to *frithii* in comparison to *A. assama* and *pernyi*. The most successful inter specific hybrid is *A. pernyi* × *A. roylei* and its reciprocal. F1 hybrids of these are fully fertile and vigorous showing positive heterosis for almost all the qualitative and quantitative characters (Jolly, 1976, 1985). It reveals fertility on backcrossing to either of the parental species. Morphology of the larvae, cocoons, follicular imprints were predominantly inherited from *A. pernyi*. The chromosome number in various species of *Antheraea* studied, ranges from $2n = 30$ to $2n = 98$. *A. assama* has the lowest chromosome number ($2n = 30$) and *A. pernyi* the highest ($2n = 98$). The diploid chromosome number of indigenous wild *Antheraea roylei* is 60. The chromosomal configuration of *Antheraea mylitta* ($n = 31$) and *A. frithii* ($n = 31$) has been reported to be 62 (Gupta and Narang, 1980a). The rest of the species revealed the model chromosome number of the genus $2n = 60$ and 62 (Oliver, 1979b, Pinhey 1956 & 1975). The chromosome number in saturniid is now known for 25 species belonging to 13 genera (Robinson, 1971; Ennis, 1976; Narang and Gupta, 1979b, c, d). The haploid numbers reported so far range from 13 in *P. cynthia* to 49 in *A. pernyi*, with 31 as a probable model number (Narang and Gupta, 1979c). An intraspecific chromosomal polymorphism

was reported in *P. ricini*: the variation is interpopulation and in female sex only – the Titabar population having $2n = 28$ and Borduar-Dhenubhanga population having $2n = 27$, the lost chromosome in the latter being the Y of the usual XY sex chromosome mechanism (Narang and Gupta, 1979c).

The chromosomal polymorphism has also been observed in *A. roylei* and *A. frithii*, the former from the western region of India has $2n = 62, 64$ and 68 while the latter from the same region of India has $2n = 62$ and 64 (Sinha and Jolly, 1967). It seems in the genus *Antheraea* the chromosomal fission has played a pivotal role in the evolution of the karyotypes. This is quite plausible in the *Antheraea* species, which has a holocentric chromosome. The various chromosomal number known for different species are $60, 62, 64$ and 68 (Sengupta *et al.*, 1993). In the light of the above study, it is probable that *A. assama* with the lowest chromosome number is the ancestral form from which all other species have evolved (Doedikar *et al.*, 1962 & 1969, Gupta and Narang, 1980b).

There is a declining trend in the species composition and population density of wild silkmoths in India. The work done by earlier workers (Seitz, 1933, Jolly, 1976, Sengupta, 1985, Barua *et al.*, 2000, Chaudhury, 1981) indicates that more than 19 sericigenous species were reported from India but down the ages the species composition was altered (Narang and Gupta, 1980). It is probably due to scarcity of suitable food plants or due to continuous host plant and insect interaction, which led to the development of various biotype or ecotype and causes extinction (Ananthakrishnan, 1994). Further, the reduction in the species composition and natural population density of wild silk moth may be due to a change in the eco-system / climatic / environment / biotic factors i.e. depletion of food plants, caused by extensive deforestation to meet the ever increasing demands of human population resulting in human colonization in the forest land for human dwelling and cultivation, which has greatly changed the biotic components i.e. flora and fauna (Jain and Bradshwa, 1966, Frankel, 1970, Albough, 1986, Srivastava and Sinha, 2000). The other reason for depletion of these wild silkmoths may be their restricted level of distribution, narrow range of food plants preference (oligophagy), low fecundity, survival rate, increasing attack of natural enemies i.e. parasites, predator and diseases (Sundramurthy, 1977, Singh and Singh, 1988, Oliver, 1983, Chikwenhere, 1992, Singh *et al.*, 2000a). However, this calls for a urgent need for conservation of these rare sericigenous insects which are ecologically important. Except eri, tasar and muga, the other wild silk moths have not been commercially exploited, therefore, their ecological role is also not known. Hence, there is a need to study biodiversity of wild silk moths.

GENETIC DIVERSITY

The genetic diversity observed in natural population of commercially exploited wild silk moths eri, muga and tasar may be due to their wide distribution in their natural habitat, wide range of host plant preference and human endeavour (Sidiqui *et al.*, 2000). Today's requirement is strains capable of good performance under stress condition. Therefore, an attempt has been made to identify potential eco-race and eco types in various parts of North eastern region. The high profile regions of Jayantia, Garo and Khasi hills which are the abode of wild muga is depleting as habitat is lost continuously all these days and therefore, the reduction of even small patches is damaging to the very utility of the breed (Sidiqui and Das, 2000). Muga culture is fastly deteriorating in the upper Assam areas due to adverse biotic factors and destruction of natural habitat (Chaudhury, 1981, Chandrasekhar and Thangavelu, 1986, Thangavelu and Bhagwati, 1985). The seed cocoons are collected from commercial crops of Kotia and Jethua conducted in lower Assam part where the environment is a little more conducive for sustenance of the crop and it is cultivated all over the north eastern region. Results indicate that the conservation of muga moths in the hills of lower Assam is ideal and conducive. The conservation of muga silkworm in different ecological habitat is the need of the hour to increase the diversity in the population. An attempt to rear muga silkworm in Cooch Behar area of West Bengal is an important step for increasing muga sericulture (Bhattacharya and Teotia, 2000).

Sidiqui and Das, 2000). There was sporadic mention about the occurrence of variants in the natural population of *Antheraea assama* by the works of Chaudhury (1974, 1981). However, these were subsequently reported to be extinct (Chaudhury, 1981, Subha Rao, 1976). Besides the colour morphs, the muga silkworm is also reported to have distinct strains as regard to the voltinism. The cultivated variety is usually multivoltine having 5-6 overlapping generations in a year. While the certain wild strains in the natural habitat undergo hibernation in pupal stage during winter season (Chaudhury, 1962, 1992). Thangavelu *et al.*, (1988) have made a brief survey on the natural population of *A. assamensis* which exhibits genetic diversity in respect of egg, larval and cocoon characters. An evaluation of the natural population found in the hinterlands of lower Assam, east and west Garo hills of Meghalaya revealed that a definite diapausing pupal stage leads to bivoltinism (Barua *et al.*, 2000). But a detailed account of the natural history in the region, or indeed of any other region inhabiting an equally hot humid climate, has not hitherto been published.

Need for collection and conservation of genetic diversity:

Vavilov (1932) expressed the need for a broad genetic base for crop plant improvement. This also equally applies to silkworm improvement, whether domestic or wild. However, the problems concerning conservation of genetic resources attracted the world's attention only in 1972 during the United Nations Environment Conference at Stockholm when Food and Agricultural Organization (FAO) and International Biological Programme (IBP) came together on this issue (Frankel, 1982).

In 1974, the International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) was established within the consultative group on International Agricultural Research (CGIAR) to promote, catalyze and coordinate activities on germplasm collection, documentation, evaluation and utilization (Arora, 1993., Brazier *et al.* 1976). However, the efforts were largely on the food and cash crops. The research institutions involved in silkworm and their food plant breeding have been maintaining the germplasm collections required for their specific breeding goals (Oliver, 1980). In India, an institution for collection and conservation of mulberry and mulberry silkworm genetic resources was established recently. However, concerted efforts are yet to be taken on non-mulberry side.

Ideal characteristics of a Germplasm bank:

Well-defined breeds facilitates the breeders for a right choice of the donors in any breeding programme. The following characteristics of a germplasm bank are considered ideal:

- Classified working collections
- Genetic variability in specific traits
- Variability in desired ecological background and genetic basis of the desired trait.
- Basic functions of a germplasm bank

A germplasm bank provides well-defined donors with specific traits to the breeders to enable them to reach their breeding goals. To satisfy the breeder, the germplasm bank needs to perform the following functions:

- Collection and conservation of germplasm material
- Characterisation, evaluation and documentation of the germplasm material
- Conducting basic studies focusing upon species relationships, biochemical or molecular identification of accessions, genetic diversity, etc. and maintaining a reference museum for identification of taxa.

Constraints in collection and conservation of wild silk moths:

Unlike domesticated ones wild silkworms do not usually feed in captivity and hence have to be maintained outdoors leaving them to the nature's vagaries. Since the food plants of many of them are huge trees, it requires a large space and it is also difficult to manage the moving worms and moths.

Since the worms are reared outdoors, breeds collected from different regions may not be able to adjust to the new environment. Besides, the worms live on all trees not within the reach of man, there can be mixing up of breeds and indiscriminate mating of moths capable of flight can occur.

Constraints in utilization of genetic resources:

A breeder, utilizing his basic knowledge of genetics and the information on the genetic resources systematically plans of achieving his specific breeding goals. This needs a clear definition of the problem; target and well defined and documented genetic material. A number of constraints coming in the way of utilization of genetic resources have been identified. They are:

- Lack of sufficient genetic material within the reach of the breeder
- Lack of sufficient evaluated germplasm
- Limited genetic characterization of germplasm
- Difficulty in bringing the donors at one place

Incompatibility:

- Dependency on forests where breeders may not like to stay and work
- Lack of useful mutants in the desirable ecological background
- Lack of facilities for data storage and retrieval
- Insufficient trained staff and funds
- Delay in quarantine clearance, etc.

Factors promoting effective utilization of germplasm collections:

The basic function of a breeder is to systematically incorporate the desired genes into a well adopted breed of the locality (ecological back ground) aiming to achieve specific goals. For a successful breeding, the following factors are considered vital.

- Identification of useful donors
- Pyramiding of genes
- Breeding of a few specific traits at a time
- Use of diversified sources
- Exploitation of inter-specific diversity
- Wide hybridization an inter-disciplinary approach

Expected breeding goals of silkworm breeders:

A silkworm breeder aims mainly at improving the quantity and quality of silk output and a stable crop. This in turn depends on the leaf to silk conversion efficiency, cocoon quality, survival, etc. Survival in turn depends on their tolerance to hard climate, resistance to diseases, etc. Sometimes, breeds with special characters are evolved to produce specialized silk or other purposes. Considering these, the following breeding goals are expected:

- Improvement in quality and quantity of silk production
- Tolerance to harsh climate
- Resistance to diseases
- Better egg production
- Uniform hatching
- Synchronous larval moulting
- Short larval span
- Synchronous spinning
- Synchronous emergence

Measures recommended for effective utilisation of germplasm material:

Utilization of the genetic material can be done in two ways, i. e. by commercial exploitation in the same form or by using them, as donors in breeding programme for evolving desired breeds. Though

the yield and quality are the basic goals of any breeding programme, breeder will also set other goals to overcome various other regional problems such as tolerance to drought, frost, salinity, diseases, pests, etc. Unlike those propagated through seed, any desirable genetic variation can be preserved and well exploited through vegetative propagation. The breeder according to his goals shall draw up a breeding programme and selects the donors. In case of silkworm, a systematic maintenance and preservation of the desired characters is essential. Silkworm breeds are most often exploited as F1 hybrids. Hence, a breeder looks for genetic distance and combining ability to ensure better heterosis.

A correct selection of the donors shall depend on the understanding of the background material as well as the gene pool from which the donors have to be selected. Therefore, it becomes necessary to characterise, evaluate and document the available genetic material preferably in an easily sortable manner. The following measures are recommended for an effective utilization of germplasm material:

- Rapid evaluation and characterization of germplasm collections
- Development and use of efficient screening techniques
- Gene cataloguing
- Transfer of useful genetic variability into desirable agronomic backgrounds
- Strengthening facilities for maintenance and utilization of wild species / primitive cultivars.

Establishing resource centers:

- Establishment of Regional Centers for germplasm storage under natural conditions to serve as backup and correct characterization and evaluation.
- Strengthening of computer facilities for data recording, processing and retrieval.
- Training in genetic resource management.
- Quick exchange of information between the scientists of gene banks and the breeders.
- Wild silk moths are not only the source of silk and delicacies but also play an important role in the management of eco-system (Chikwenhere, 1992, Peigler 1993 and Kioko 1998). Biological adaptability of these silkworms is different and therefore, it feeds on various types of food plants.

ECOLOGICAL DIVERSITY IN SILKWORM REARING

Muga culture:

Muga silkworm *Antheraea assama* is a polyphagous insect feeding mainly on som (*Machilus bombycina*) and soalu (*Litsaea polyantha*) tree which thrives in the Brahmapura valley and foot hills of Naga, Khasi and Garo hills (Bharali 1967, 1969, 1978, 1982, Barah *et al.*, 1989, Thangavelu and Barah, 1986, Chandrasekher and Thangavelu, 1986). By and large, som tree is the only species providing food material for silkworm in the region though soalu is also used as a secondary plant (Bardoloi and Hazarika, 1998). The existing area under muga food plants is estimated at about 3100 ha with Assam accounting over 75 per cent, Meghalaya about 15 per cent and Manipur around 7 per cent of the total area. There has been a gradual increase in the area under food plants since "Muga Sericulture Development Project" and "Muga Food Plant Augmentation Schemes" have been initiated by the Central Silk Board. Muga silkworm is a multivoltine and can be reared throughout the year (Thangavelu *et al.*, 1984). Muga silkworm rearing is an outdoor activity and therefore, exposed to natural vagaries. Generally six crops are undertaken namely Kotia (October/November), Jarua (December/January), Chatua (February/March), Jethua (April/ May), Aherua (June/ July), Bhodia (August / September) (Sahu *et al.*, 2000). Of these two are commercial crops (Jethua and Kotia), two pre-seed crop (Jarua and Aherua) and two seed crops. The duration of rearing is about 45 to 50 days depending upon the season of the year. Generally, during commercial crop rearing the optimum temperature varies between 20-31° C and Relative humidity about 65-95 percent which is suitable for rearing and therefore yield more cocoons (1: 50 or 60). Bhodia, late Jarua are the two

optimum temperature varies between 20-31° C and Relative humidity about 65-95 percent which is suitable for rearing and therefore yield more cocoons (1: 50 or 60). Bhodia, late Jarua are the two important seed crops while Aherua and Jarua are the pre-seed crops. The Bhodia seed crops fall during hostile climatic conditions with 27-35° C temperature and 75-95 per cent R. H. accompanied by heaving rainfalls and hailstorm. The Jethua crop falls in post winter with temperature ranging from 9-30° C and 40-90 per cent R H.

Oak tasar culture:

The discovery of oak tasar in the sub-Himalayan belt of India during late sixties has been one of the most significant achievements which aided a new dimension in the history of Indian sericulture. Survey conducted in north eastern region revealed the existence of a nature grown sericigenous insect species i. e. *Antheraea roylei* which produced double layered unreelable cocoons (Jolly et al., 1975). During the seventies, a viable hybrid was synthesised from the inter specific hybridization between the indigenous species *A. roylei* and its Chinese counterpart *A. pernyi*. It has been characterized as *Antheraea praylei* Jolly. (Jolly et al., 1975). Since then continuous efforts are being made to standardize and stabilize the race in the various parts of India. Rearing of silkworms has been conducted on number of varieties of *Quercus* spp. at different heights to sustain successive rearing for commercial and seed purposes. To raise a successful second crop rearing a concept of low altitude, middle altitude and high altitude rearing has been adopted and it has been found to be economically viable. The first crop rearing is done on *Q. incana* at low altitudes in the month of March. A successful second crop is then raised at higher altitudes on *Q. semicarpifolia* and *Q. himalayana* where the sprouting is delayed (May-June) in comparison to plants at lower altitudes (March). In the middle altitudes rearing, the season is April/May. The cocoon harvest of the middle altitude rearing can be used for reeling purposes.

The pruning of the oak plants is adjusted to provide silkworm quality foliage during suitable rearing season when the temperature and humidity conditions are ideal for silkworms. It has been observed that pruning done during September ensures early leaf sprouting by the end of February or first week of March at low altitude (750 m) and ten days later at middle and higher altitude (1200 m and above) as against sprouting in the middle of March and early April respectively. For second crop rearing pruning may be given one month earlier to onset of rearing. Generally, oak tasar rearing is conducted outdoor and two crops (spring and autumn) are harvested. First crop rearing starts from the first / second week of March in the spring season and hence is termed as spring crop and second crop in autumn. The newly hatched larvae are mounted on the oak bushes and they start feeding immediately. The suitable temperature and humidity for rearing are 20° to 25° C and 70 to 75% relative humidity. Oak tasar larva passes through four moults and the larval period varies from 35-50 days depending upon the atmospheric temperature and humidity. In all oak tasar larva completes its life cycle from cocoon to cocoon in a period of 60-65 days. At present *Antheraea praylei* is the only species used for commercial exploitation however an attempt is made to standardize *Antheraea pernyi*, an exotic species of Chinese origin under Indian conditions. Some other species i.e. *Antheraea frithii* is also reared in Manipur. Besides this, some more hybrid lines have been developed and attempts are being made for their commercial exploitation (Singh et al., 2000a & b). In the north-eastern region the spring crop is the main seed / commercial crop which starts from the first week of March when the natural sprouting takes place in *Q. serrata* plants. However, an additional subsidiary crop can also be taken up during summer or autumn by breaking the pupal diapause by exposing seed cocoons to photoperiodic treatment and by following with light pruning of plants well in advance.

Eri culture:

Eri silkworm (*Philosamia ricini*) is polyphagous, multivoltine and a disease resistant variety confined to the North Eastern states on large scale (Patil et al., 2000). The main food plants used for

rearing of eri silkworm are castor (*Ricinus communis*), Kesseru (*Heteropanax fragrans*), Tapioca (*Manihot utilissima*), Payam (*Evodia flaxinifolia*), Gulancha phool/Champa (*Plumeria acutifolia*), Bhotera (*Jatropha acurcus*), Barkesseru (*Ailanthus glandulosa*), Korha (*Sapium allgeniaefolium*), Bazraman (*Zanthorylum yhesta*), Papaya (*Carica papaya*). Majority of these plants belongs to the Euphorbiaceae family. Eri silkworms larvae prefer to feed on castor leaves and yield large size cocoons having a rich silk content but since there is no regular cultivation of castor or other food plants for the purpose of feeding eri silkworms, the leaves are collected from the scattered castor or kesseru plants nearby the dwelling houses. Eri silkworm rearing is conducted indoor and as such the worms are not exposed to natural vagaries (Patil, 2000, Singh *et al.*, 2000). The rearers take up 5-6 crops in a year. Apart from the use of the silk yarn for production of fabrics, eri silkworm pupa is used as ingredient of daily food by the tribes in north-eastern region of India.

Moriculture:

Numerous types of mulberry are under cultivation in various parts of the north-eastern region; the types differ in their adaptability to various soils and climates, resistances to diseases, food value of the leaf crop for the silkworm and suitability for use as stock or scion in grafting. The most important type of mulberry grown in India for rearing silkworms is *Morus alba* var. *multicaulis* Loud, which is a native of China or Philippines. It is fast-growing and adapted for cultivation as a field crop producing large, tender and thick leaves. *M. alba* var. *atropurpurea* (Shahtut), also a native of China, is cultivated widely as a tree crop for its large, cylindrical, dark purple, succulent fruits. It is also fast-growing and yields large thick leaves, which are at the same time smooth, tender and succulent.

Mulberry is grown on an extensive scale in various parts of north east region of India. It is also grown as a road side and avenue tree. In the Himalayas, it ascends up to an elevation of about 1,200m. In the hills, it is mostly confined to stream beds or places where sufficient moisture is available. It does not grow on dry slopes or shallow soils where moisture is a limiting factor. The old leaves are shed in November – December and the trees are leafless during winter season. The new leaves appear in March-April depending upon the climate of the locality. The mulberry is a shade bearing tree and it can with advantage be grown as under story with other light demanding species. In Assam and Tripura, mulberry is grown as a field crop and leaves are harvested several times in the year to feed the multivoltine races of silkworm. In Meghalaya and Mizoram, it is grown as a tree and leaves are lopped only in one season for rearing the univoltine races of the worm (Rangaswamy *et al.*, 1978).

Mulberry is a fast growing deciduous tree occurring in subtropical, tropical and temperate climate. There are many kinds of mulberry of which *Morus alba* (var. *indica*) and *Morus laevigata* grow wild in the region. Apart from this there are a large number of local varieties which are available all over the region. Assambola and Jatinuni are the most common local varieties which are still used for silkworm rearing in the remote areas of Assam. The old practice of plantation was without any agronomical practices, therefore the leaf yield was very low. High yielding mulberry varieties are propagated and all the agronomical practices, maturing and irrigation provision have been adopted for maintaining the same and it has increased the leaf yield to a considerable extent and helped in the maintenance of biodiversity in the region.

CONCLUSION

Rearing of oak tasar (*A. proylei*), Eri silkworm (*P. ricini*) and muga silkworm (*A. assama*) provides unusual opportunities for improving the socio-economic conditions of people of the North Eastern region. The social relevance of the sericulture industry is very high and therefore, it can be used to improve the people's living standards and it can contribute in arresting the decline of biodiversity. In the entire North Eastern region ecological and economic goals can be integrated in a symbiotic manner by promoting the cultivation of appropriate host plants. There is ample opportunity in the region for expanding the area under *Quercus* for rearing temperate tasar and *Machilus* and

Litsaea for cultivation of muga silkworm. With more research eri cultivation can be taken up to increase the socio-economic condition of the farmers. Due to large genetic diversity there is much difference in the feeding behaviour and reproductive strategies of various wild silk moth, it urgently needs systematic studies to promote growth in wild silk moth, so as to increase sustainable production and productivity of non-mulberry silk in India. There is a need to introduce economic incentives that integrate biological conservation with economic development especially for rural communities.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are extremely thankful to Dr Beera Saratchandra, Director, Central Silk Board, Bangalore for guidance and suggestions made during preparation of revised draft of the original manuscript.

REFERENCES

- AHMED S. A. (1997) Some aspects of biology, morphology and management of *Cricula trifenestrata* Helfer (Lepidoptera : Saturniidae). M. Sc. (Agric.) Thesis. Assam Agricultural University, Jorhat.
- ALBOUGH D. (1986) Food plants of thirty six world wide saturniidae. Youth Entomol. Soc. 39-43.
- ANANTHAKRISHNAN T. N. (1994) Chemical ecology in biological control. Curr. Sci. 59(24): 1319-1322.
- ANONYMOUS (1989) Agro-climatic Regional Planning – Eastern Himalaya Region (Zone II) – Profile and Strategy, Assam Agricultural University, Jorhat, pp. 193.
- ARORA R. K. (1993) IBPGR and Conservation of plant genetic Resources In: Conservation and Management of Plant Genetic Resources. Edited by: R. S. Rana, R. K Saxena, Sanjeev Saxena & Vivek Mitter. Published by NBPGR (ICAR) New Delhi – 110 012, India.
- ARORA G. S. & GUPTA J. J. (1979) Taxonomic studies on some of the Indian Non mulberry silk moths (Lepidoptera: Saturniidae) Mem. Zool. Sur. India. 16(1): 1-64.
- BARAH A., GOSWAMI, M. C., SAMSON M. V. (1989) Consumption and utilisation of food in different instars of muga silkworm *Antheraea assama*, Westwood. Proc Indian Acad. Sci. (Anim. Sci). 98(2): 99-103.
- BARDOLOI S. & HAZARIKA L. K. (1998) Response of muga silkworm *Antheraea assama* to host quality. Entomon, 23(2): 111-115.
- BHARALI N. (1967) Som the muga food plant, importance of vegetative propagation. Indian Silk. 6(1):5.
- BHARALI N. (1969) History of muga silk industry in Assam. Indian Silk. 8(2): 13-14.
- BHARALI N. (1978) Assam the richest valley of wild silks. Indian Silk. 17(6): 79-82.
- BHARALI N. (1982) Selection of most productive muga food plant. Indian Silk 19(10): 15-16.
- BHATACHARYA A. & TEOTIA R. S. (2000) Conservation strategies of wild silkmoths in the North Eastern region of India. Int. Jour of Wild Silkmoth & Silk, 5: 311-313.
- BRAZIER J. D., HUGUES J. F., TABB C. B. (1976) Exploration of natural tropical forest resources and the need for genetic and ecological conservation. In: Tropical Trees: Variation, Breeding and Conservation (Eds. Burley, J. and Styles, B. T.) Linnean Society. Oxford, UK.
- BARUAH B., DUARAH D., CHAKRABORTY D. (2000) Performance of wild silkworms. Int. Jour. Wild Silkmoths & Silk 5: 376-378.
- BRIGGER T. R. L. (1975) Karyotype of some Lepidoptera chromosomes and change in their holokinetic organization as revealed by new cytological techniques. Cytologia, 40: 713-726.
- CHANDRASEKHAR M. & THANGAVELU K. (1986) Muga silkworm food plants and their propagation method. In: Lecture on Sericulture. G. Boraiah (Ed.) Surmya Publishers, Bangalore.
- CHAUDHURY S. N. (1962) Diapause and voltinism in some saturniids. Bull. Nat. Inst. Science (India) No. 19: 140-147.

- CHAUDHURY S. N. (1974) An orange body colour mutant of muga worm, *Antheraea assama*. Indian Silk, 12(9): 15-16.
- CHAUDHURY (1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt of Assam 178 PP.
- CHAUDHURY S. N. (1992) Silk and Sericulture, Directorate of Sericulture, Govt. of Assam, Guwahati.
- CHAUDHURY S. N. & BHUYAN B. N. (1962) Preliminary note on artificial heat parthenogenesis in Assamese silkworm, *Antheraea assama*. Hind All India Congr. Rool., Varanasi. Abs. 58
- CHIKWENHERE G. P. (1992) Distribution and abundance of the African Silk moth (*Gonometa rufobrunnea*) in Matebeland provinces of Zimbabwe. Zimbabwe Journal of Agricultural Research, 29(2): 133-137.
- CROTCH W. J. B. (1956) A Silkmother rearer's hand book, Amateur Entomologists Society, London pp.128.
- DEODIKAR G. B., CHOUDHARY S. N., BHUYAN, KSHIRSAGAR, K. K. (1962) Cytogenetic studies in Indian silkmother. II. Chromosomes number in muga silkworm, *Antheraea assamensis* Ww. Curr. Sci. 31: 247-248.
- DEODIKAR G. B., KSHIRSAGAR K. K. & KAMATE I. A. (1969) Chromosome number in *Actias selene* Hub. — a wild silkmother with reelable cocoons. Ind. J. Genet. Plant Breeding, 29: 126-130.
- ENNIS T. J. (1976) Sex chromatin and chromosome numbers in Lepidoptera. Can. J. Genet. Cytol., 18(119-130).
- FRANKEL O. H. (1970) Genetic resource implants. IBP Handbook No. 11, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- FRANKEL O. H. (1982) Can genetic diversity survive? Advances in Cytogenetic and Plant Improvement. Kalyani Publication New Delhi.
- GUPTA M. L. & NARANG R. C. (1980a) Chromosome number, sex chromatin and sex chromosome mechanism in some saturniid moths of India. Entomon, 5(1): 13-18.
- GUPTA M. L. & NARANG R. C. (1980b) Chromosome number and meiotic mechanism of *Eriogyna pyretorum* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) Nat. Acad. Sci. Letters, 3(9): 279-281.
- JAIN S. K. & BRADSHAW A. D. (1966) Evolutionary divergence among adjacent plant population. Heredity, 21: 407-441.
- JOLLY M. S., CHATURBEDY, S. N. & PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. Indian J. Seric. 9: 25-33.
- JOLLY M. S., NARASIMHANNA M. N., SINHA S. S. & SEN S. K. (1969) Interspecific hybridisation in *Antheraea*. Indian J. Heredity. I. p. 45-48.
- JOLLY M. S., SEN S. K. & ASHAN M. M. (1974) Tasar culture. Ambica Publication Bombay.
- JOLLY M. S., BAKSHI R. R., SINHA S. S. (1973) Interspecific hybridisation in *Antheraea* (Lepidoptera: Saturniidae) with special reference to *Antheraea roylei* MR & *Antheraea pernyi* G. M. XII Int. Silk Congr. Barcelona.
- JOLLY M. S., CHAUDHARY, S. N. & SEN S. K. (1975) Non mulberry Sericulture in India. Central Silk Board, Bombay.
- JOLLY M. S. (1976) Comments on review of the taxonomic status of the hybrids with particular reference to *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae). Indian J. Seric. 15(1): 49-50.
- JOLLY M. S., SONWALKAR T., SEN S. K. & PRASAD G. K. (1976) Non Mulberry Silks. Sericulture Manual—FAO Manual on Sericulture. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome.
- JOLLY M. S. (1985) Species differentiation in the genus *Antheraea*. Sericologia 25(1): 84-94.
- KIOKO E. N. (1998) Biodiversity of wild silk moths (Lepidoptera) and their potential for silk production in East Africa. Ph. D. Thesis, Knyatta University, Nairobi, Kenya.
- MEHROTRA A. & KUSHALAPPA K. A. (1994) An approach for sustaining bio-diversity in India. Indian Forester, 120: 759-772.
- MISRA S. D. (1984) Prospects of developing ericulture as an agroecottage industry in Rajasthan. Proc. Natl. Symp. On Pl. Sci., Jodhpur, 296-297.
- MISRA S. D. (1987) Viability of ericulture and its economics. Sericologia 27(2): 237-242.

- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1979a) Chromosome number of *Cricula trifenestrata helfer* (Lepidoptera: Saturniidae) Curr. Sci, 48(10): 465-466.
- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1979b) Chromosome number of wild silkmoth, *Dictyoploca cachara* Moore (Saturniidae: Lepidoptera) Nat. Acad. Sci. Letters, 2(5): 201-202.
- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1979c) Chromosomal study of eri silkmoth *Philosamia ricini* Hutt (Lepidoptera : Saturniidae) Entomon, 4(3): 217-221.
- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1979d) Notes on the chromosomes of wild silkmoth, *Loepa katinka* Westwood. Chromosome Information Service, No. 26: 17-18.
- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1979e) Chromosome set of wild silkmoth, *Philosamia cynthia* Hutton (Lepidoptera : Saturniidae) Chromosome Information Service No. 27: 7-8.
- NARANG R. C. & GUPTA M. L. (1980) Chromosome number, sex chromatin and sex chromosome mechanism in some saturniid moths of India, Entomon, 5(1): 13-18.
- OLIVER C. G. (1979a) Genetic differentiation and hybrid viability within and between some Lepidopteran species. Ann. Nat. 144: 681-694.
- OLIVER C. G. (1979b) Experimental hybridisation between *Phyciodes tharos* and *P. batessii* (Nymphalidae) in north eastern United States. Ann. Entomol. Soc. Amer. 73: 715-721.
- OLIVER C. G. (1980) Phenotypic differentiation and hybrid breakdown within *Phyciodes tharos* (Lepidoptera: Nymphalidae) in north eastern United States. Ann. Entomol. Soc. Amer. 73: 715-721.
- OLIVER C. G. (1983) Disturbance of eclosion sequence in hybrid Lepidoptera. Can. Entomol. 115: 1445-1452.
- PATIL G. M., KULKARNI K. A., PATIL R. K. & BADIGER K. S. (2000) Performance of eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisd. on different castor genotypes. Inter Jour. Wild Silkmoth & Silk, 5: 193-195.
- PEIGLER R. S. (1989) A revision of Indo-Australian genus *Attacus* (Lepidoptera: Saturniidae). The Lepidoptera Research Foundation, Inc. Beverly Hills, California.
- PEIGLER R. S. (1993) Wild silks of the world. Amer. Entomol. 39(3): 151-160.
- PEIGLER R. S. (1996) Catalogue of Parasitoid of Saturniidae of the Word. J. Res. Lepidoptera, 33: 121.
- PINHEY E. C. G. (1956) The emperor moths of Eastern Africa J. E. Afr. Nat. Hist. Soc. 23: 1-63.
- PINHEY E. C. G. (1975) Moths of Southern Africa Capetown Tafelberg R. S.
- RAINA S. K. & KIOKO E. N. (2000) Harvesting wild silkmoths of the African continent: Implications on biodiversity and community development. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk, 5: 307-310.
- RANGASWAMY G., NARASIMHANNA M. N., & SASTRY C. R. (1978) Sericulture Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Agricultural Service Bulletin.
- ROBINSON R. (1971) Lepidoptera Genetics. Pregamon Press, Torronto.
- SAHU A K. SINGHA B. B., DAS P. K. (2000) Phenological study in muga silkworm, *Antheraea assama* Ww. (Lepidoptera: Saturniidae) in relation to its rearing and grainage behaviour. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk 5: 25-28.
- SARKAR D. C. (1988) Ericulture in India, Central Silk Board, Bangalore.
- SENGUPTA K. (1985) Non-mulberry sericulture – its problems and prospects. Sericologia, 25(1): 95-100.
- SENGUPTA A. K., SINHA A. K., SENGUPTA K. (1993) Genetic reserves of *Antheraea mylitta*. Indian Silk, 32: 39-46.
- SEITZ A. (1930) The Indo-Australian Bombyces and Spinges, X, Microlepidoptera of the world, Alfred Kernen. Stuttgart, pp. 506.
- SEITZ A. (1933) The Microlepidoptera of the world, X, Alfred Kernen, Stuttgart, pp. 503-504.
- SIDDIQUI A. A. & DAS P. K. (2000) Genetic variation and correlation studies for technological traits in *Antheraea assama* Westwood: Endemic species of north-east India. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk, 5: 145-147.
- SIDDIQUI A. A., SAHA L. M. & DAS P. K. (2000a) Genetic variability and correlation studies of some quantitative traits in eri silkworm, Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk, 5: 234-236.

- SINGH N. I., KEISA J., SINGH R. Y., SINGH N. (2000b) Evolution of improved breeds of *Antheraea proylei* J. through hybridisation and selection. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk 5: 204-206.
- SINGH I., SINGH N. I., KEISA J., SINGH R. T. & SINGH K. C. (2000) Conservation and utilisation of Indian oak fed *Antheraea* fauna. Int. Jour Wild Silkmoth & Silk 5: 330-331.
- SINGH K. C. & SINGH N. I. (1998) Biology and Ecology of temperate tasar silkmoths *Antheraea proylei* Jolly and *Antheraea pernyi*: - A review. Indian J. Seric. 37(2): 89-100.
- SINGH K. C., & SEN S. K. (2001) Annotated Compendium on Muga culture. Published by Central Muga and Eri Research Institute, Jorhat.
- SINHA S. S. & JOLLY M. S. (1967) Chromosome number in tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury Curr. Sci., 36(13): 359.
- SINGH R. N., SAMSON M. V. & DATTA R. K. (2000) Pest Management in Sericulture. Indian Publishers Distributors, Delhi.
- SINHA S. S. (2000) Rearing methods, seed and cocoon production. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk 5: 15-19.
- SRIVASTAVA A. K. & SINHA B.R.R.P. (2000) Host-pest interaction between *Litsaea monopetala* and *Liothrips litseae* with bionomics of the Thrips. Int. Jour. Wild Silkmoth & Silk 5: 336-339.
- STONE S. E. (1991) Food plants of world saturniidae. Lepidopteran Society Memoir. 4: 15-20.
- SUBHA RAO (1976) Degeneration of muga worms. Indian Silk, 15(5): 11-13.
- SUNDRAMURTHY T. S. (1977) *Antheraea assama* cocoon and its characteristic. In: Technology of Tasar and Problems of Non-mulberry Sericulture). K. I. Ahmed (Ed.) CSB, Bombay, 35-39.
- THANGAVELU K. & BARAH A. (1986) Occurrence of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) in north eastern India, Distributional significance. Curr. Sci 55:940.
- THANGAVELU & BHAGOWATI A. K. (1985) Studies on natural population on *Antheraea assama* Westwood (Saturniidae: Lepidoptera). Sericologia, 25(1) 71-76.
- THANGAVELU K., BHAGOWATI A. K. & CHAKRABORTHY A. K. (1984) Colour polymorphism in muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae). Curr. Sci., 53(11): 594-595.
- THANGAVELU K., CHAKRABORTHY A. K., BHAGOWATI A. K. & ISSA M. D. (1988) Hand Book of Muga Culture. Central Silk Board, Bangalore.
- TRAUT W. & MOSBACHER G. C. (1968) Geschlechtschromatin bei Lepidopteran. Chromosoma, 25: 343-356.
- TAZIMA Y. (1974) A review on chromosome behaviour in interspecific hybrid *Antheraea roylei* × *Antheraea pernyi*. Proc. Ist. Int. Se. Non-Mulberry Silks, 51-52.
- VAVILOV N. I. (1932) The process of evolution of cultivated plants. pp. 331-342. In proceedings of the VI International Congress of Genetics. Brooklyn, Botanic Garden, New York.

CONSERVATION ET UTILISATION DES INSECTES SERICIGENES DANS LA REGION DU NORD-EST DE L'INDE

R. N. SINGH & M. MAHESHWARI

Central Silk Board, Bangalore 560 068, Inde.

INTRODUCTION

L'élevage des vers à soie non-mûrier est un artisanat exclusif des tribus habitant les forêts humides et denses de la région du nord-est. Le tasar et le muga sont produits par des chenilles semi domestiquées avec des habitudes d'habitat et de nourrissage sauvages mais elles sont élevées en captivité (Sinha, 2000). Alors que le tasar est en grande partie confiné à l'Inde du centre (Jolly et coll., 1974), le muga habite dans le nord-est de l'Inde (Assam et Meghalaya) (Thangavelu et coll., 1988). En ce qui concerne le tasar du chêne, la population d'*Antheraea proylei* – un hybride mis au point à partir d'*Antheraea roylei* (Inde) et de *A. pernyi* (Chine) s'est multipliée dans la région du nord-est de l'Inde et se nourrit sur *Quercus* sp. (Jolly et coll., 1973, 1975 et Jolly, 1976). Le ver à soie eri, *Philosamia ricini* est élevé dans le nord-est. Le ver à soie eri est domestiqué comme le ver à soie mûrier pendant tout son cycle de vie de la production des oeufs aux stades de l'élevage et de la production de cocons (Sarkar, 1988).

La région du nord-est de l'Inde est l'habitat naturel d'un grand nombre d'insectes séricigènes pour lesquels il faut réunir les conditions nécessaires à leur conservation en raison de la déforestation, de l'urbanisation et du recul de leur habitat naturel (Barua et coll., 2000 ; Chaudhury, 1981). Plusieurs papillons à soie sauvages ont été répertoriés en Inde et parmi eux, quatre sont exploités commercialement (Jolly et coll., 1976). La région du nord-est de l'Inde est l'endroit le plus riche du pays et la biodiversité s'y déploie dans toute sa splendeur. Bien que la sériciculture soit traditionnelle dans cette région depuis des temps très reculés, l'élevage de l'eri et du muga y sont plus ou moins des privilèges exclusifs. La culture du tasar du chêne est cependant une introduction récente et on n'est pas encore sûr de ses perspectives d'un point de vue commercial (Sengupta, 1985). Des chémotypes variés de plants ainsi que des races ou des biotypes d'insectes ont émergé en raison de la pression de l'alimentation et de la sélection continue exercée par les insectes et les plantes les uns sur les autres : les plantes développent de nouvelles substances chimiques contre les insectes et les insectes développent des mécanismes de désintoxication, qui permettent à l'un et l'autre d'entrer dans une zone d'adaptation qui entraîne la diversité (Ananthakrishnan, 1994).

Normalement, il existe trois types de biodiversité qui représente la richesse d'un écosystème : la diversité de l'habitat, la diversité génétique et la diversité des espèces (Mehrotra et Kushalapi, 1994). Chaque habitat héberge de nombreuses espèces qui sont dépendantes de l'habitat (Brazier et coll., 1976). La destruction de n'importe quel habitat entraînera donc la disparition d'un grand nombre d'espèces (Raina et Kioko, 2000). Il y a un grand nombre d'insectes bénéfiques qui habitent la région et qui jouent un rôle important pour la conservation et l'utilisation de la biodiversité. Le papillon à soie sauvage est l'un d'eux (Frankel, 1982, Peigler, 1993 et Kioko, 1998). Il n'est pas seulement la source de soie et de douceurs pour les gens de la région du nord-est mais il joue aussi un rôle important dans la gestion de l'écosystème (Sengupta et coll., 1993). Les insectes sont les principaux consommateurs des plantes ; ils sont les principaux prédateurs des plantes. Ils ont un rôle majeur dans la dégradation des matières organiques et ils servent de nourriture à d'autres types d'animaux. Compte tenu de ces données écologiques, il est couramment accepté que ces organismes sont divers et adaptables et ils le sont (Jolly et coll., 1968 ; Thangavelu et Bhagowati, 1985, Stone, 1991 et Jolly, 1976). La zone du nord-est de l'Inde est le centre de la diversité des vers à soie non-mûrier

commerciallement exploités : le papillon tassar du chêne (*Antheraea proylei* Jolly), le papillon muga (*Antheraea assama* Westwood) et le papillon à soie eri (*Philosamia ricini* Boisd.), qui appartiennent tous à la famille des Saturniidae. Le papillon muga (*Antheraea assama*) qui produit la soie dorée se limite exclusivement à la région du nord-est de l'Inde. A l'exception du ver à soie eri, tous les autres sont élevés à l'extérieur, ce qui les soumet aux dangers des prédateurs, des parasites, des maladies et aux risques climatiques comme les températures chaudes et froides extrêmes, les vents, la grêle, les cyclones, etc... (Singh et coll., 2000a & b). Nous avons donc essayé de trouver des stratégies adaptées de recueil et de conservation des insectes séricigènes et des plantes hôtes de la région. Cela permettra non seulement de préserver la biodiversité mais aussi d'améliorer les conditions économiques des fermiers impliqués dans la sériciculture.

CONDITIONS NATURELLES

La région de l'est de l'Himalaya qui comprend le Sikkim, les régions de Darjeeling, de CoochBehrar et de Jalpaiguri du Bengale ouest, l'état de l'Assam et les zones de Manipur, du Meghalaya, du Nagaland, de l'Arunachal Pradesh, de Tripura et de Mizoram est l'une des 15 zones agro-climatiques identifiées par la Commission de Planification du Gouvernement indien (Anonyme, 1989). En tout, la région a une surface totale de 274,87 mille km² et s'étend entre les latitudes 22°-29° 30'N et les longitudes 88° 05'-97° 24'E. La topographie de la région est divisée en trois unités principales, c'est à dire les collines et la montagne, les plateaux et les vallées péniinsulaires. La surface occupée par les collines constitue 77 % de la région. Sur la surface totale de la région, 35 % s'élève au-dessus de 1 200 m et 18 % se situent entre 600 et 1200 m. L'altitude est comprise entre 97 m dans les vallées et 5000 m en passant par un labyrinthe de collines et de montagnes coupées par des défilés profonds.

Il existe aussi une grande disparité des conditions agro-climatiques. En général, le climat de la région du nord-est est semblable à celui des régions sub-tropicales, avec une température modérée pendant toutes les saisons sauf en cas de précipitations élevées. Les températures minimum – maximum et l'humidité relative sont comprises respectivement entre 5 et 35° C et 55 et 93 %. Les précipitations annuelles sont très élevées. Elles sont comprises entre 1986 mm et 3039 mm par an (Singh et Sen, 2001). La saison des pluies dure plus longtemps dans l'Assam. La structure du sol de cette région est soit du sable soit un terreau sablonneux riche en humus. Le pH du sol varie de 4,97 à 7,95. La surface totale de la région est d'environ 25,5 millions d'hectares, mais les statistiques concernant l'utilisation de la terre ne sont disponibles que pour 22,8 millions d'hectares soit 89 pour-cent de la surface totale (Anonyme, 1989).

Les conditions bio-écologiques de tous les états situés dans la région sont différentes et il y a donc une grande variation de la flore et de la faune. L'état du soleil levant, l'Arunachal Pradesh est réputé pour ses montagnes bleues et il possède une flore et une faune nombreuses importantes sur le plan économique. L'Assam, la terre de l'insecte qui produit la soie muga dorée, le ver à soie muga (*Antheraea assama*), est très riche en flore et en faune. Par conséquent, le Manipur, le Meghalaya, le Mizoram, le Nagaland et le Tripura ont un potentiel énorme de génération de revenus grâce à leurs types de flore et de faune variés qui permettent de maintenir un environnement non nuisible dans la région. Dans toute la région, il y a de nombreux facteurs variables.

DISTRIBUTION ET DIMINUTION DE LA FLORE DE LA FORET

Les forêts représentent une unité écologique puissante vitale pour l'environnement. Elles influencent le climat local et régional et aident à maintenir la couche du sol, en purifiant l'air et en aidant à assurer un flux continu d'eau. La forêt aide à former les lignes de partage des eaux dans la montagne et contrôle l'érosion du sol et les inondations excessives (Jain et Bradshaw, 1966). La forêt aide aussi à prévenir le blocage des réservoirs dans les projets de barrage, de systèmes d'irrigation et

de canaux en réduisant la quantité de limon des rivières. Les forêts peuvent donc être considérées comme le système de soutien vital le plus crucial puisqu'elles conservent l'eau et le sol dont dépend la production de nourriture dans la région (Frankel, 1970, Raina et Kioko, 2000).

Les plants de chênes sont répartis dans toute la région du nord-est. On estime qu'il y a environ 40 000 hectares de chênes disponibles dans le Manipur dont 20 000 hectares sont accessibles par les habitants et peuvent être exploités pour élever le tasar. Toute la flore du chêne se confie principalement aux collines où elle se présente sous la forme de petits buissons et d'arbustes nains en raison de coupes régulières du bois combustible. On trouve *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* et *Quercus griffithii* principalement dans le Manipur. *Quercus serrata* et *Quercus dealbata* sont distribués à des altitudes plus basses (600 à 900 m au-dessus du niveau de la mer) en végétation mixte tandis que *Quercus griffithii* se trouve principalement dans les chaînes en hauteur. Dans le Nagaland, la flore du chêne est principalement disponible dans les régions de Kohima, Phek et Tuensang à une altitude de 600 à 1800 m au-dessus du niveau de la mer. La surface totale des plantations de chênes est en gros estimée à 15 000 - 20 000 hectares. Les espèces disponibles sont *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* et *Quercus griffithii*, *Quercus lineata*, *Quercus lamellosa* dont seulement *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* et *Quercus griffithii* sont utilisées pour le nourrissage des vers à soie du tasar du chêne. Toutes les zones où poussent le chêne sont facilement accessibles dans l'état. Les plantes du tasar du chêne c'est à dire *Quercus serrata* et *Quercus dealbata* sont disponibles en abondance dans les collines du nord du Cachar et dans la zone de Garampani dans l'Assam. Sur 24 000 hectares de plantations disponibles, seuls 1 000 hectares sont utilisés pour l'élevage du ver à soie. La plantation de tasar du chêne dans le Meghalaya est confinée à la zone de Bhoi, à l'est des collines de Khasi et dans la zone de Garampani des collines de Jaintia où il existe près de 23 000 hectares de plantations de *Quercus serrata* et de *Quercus dealbata*. La plupart des plants se présentent sous la forme de grands arbres et sont largement dispersés sur des collines escarpées et dans des défilés profonds. La plantation de chênes dans le Mizoram est confinée à la zone de Champai et de Lunglei où 15 000 hectares en sont recouverts. Les espèces d'arbres qui existent sont *Quercus serrata*, *Quercus dealbata* et *Quercus griffithii*. De plus, une surface totale de 25 000 hectares est couverte de chênes dans l'Arunachal Pradesh. Cependant, les espèces adaptées à l'élevage du ver du chêne sont *Quercus griffithii*, *Quercus semicarpifolia* et *Quercus dealbata*. Ces espèces couvrent une surface de 1 70 000 hectares. Bien que le climat soit assez idéal et que les espèces de chêne adaptées soient disponibles en abondance, la densité de la population qui est très faible (7 par km²) pose de grandes contraintes pour l'exploitation commerciale (Stone, 1991, Singh et Sen, 2001). Les chercheurs ont déjà rapporté une grande diversité de comportement de bourgeonnement et de maturité des diverses espèces de plants de chênes. Les mêmes espèces débourent à des périodes différentes à différentes altitudes. *Q. semicarpifolia*, qui est une variété à maturité lente est abondante à des altitudes plus élevées (2100 à 2700 m au dessus du niveau de la mer) et on trouve *Q. himalayana* à une altitude de 1 500 à 2 100 m au-dessus du niveau de la mer (Jolly, 1969).

Le papillon à soie muga est polyphage sur certaines Lauraceae. Les plantes principales préférées du ver à soie sont le Som (*Machilus bombycina*) et le Soalu (*Lytsaea polyantha*). Som est naturellement abondant dans l'Assam supérieur (Dibrugarh, Sibsagar, Jorhat et Lakhimpur) dans de grandes plantations dans la forêt, commercialement exploitées pour la production de cocons de dévidage (Chandrasekhar et Thangavelu, 1986). Soalu est normalement distribué dans les contreforts du bas de l'Assam, qui s'étendent jusqu'aux chaînes de collines du Garo dans le Meghalaya et est utilisé comme plante hôte pour la production de cocons muga de grainage. On le trouve d'une manière plus dispersée dans la forêt et aussi dans les terres en friche des villages. Les plantes hôtes poussent bien dans les conditions de tiédeur et d'humidité avec des précipitations et des sols acides. Ces plantes hôtes sont naturellement abondantes dans le nord-est de l'Inde à la fois dans les plaines du bassin du Brahmaputra et à l'est des chaînes himalayennes de Khasi, Garo, Naga, Jaintia, Patkai, les collines de Mizo et aussi dans les chaînes himalayennes principales qui s'étendent jusqu'au Punjab. On pratique aussi la culture de ces deux arbres.

Les plantes hôtes de l'eri sont abondamment disponibles dans toutes les parties de la région du nord-est. Le ricin, le kesseru, le payam, le manioc sont les plantes hôtes par ordre de préférence. Le ricin (*Ricinus communis*) est de loin la meilleure plante hôte cultivée et est principalement utilisée pour l'élevage de l'eri dans tous les états de la zone du nord-est (Singh et coll., 2000, Sarkar, 1988 ; Misra, 1984). L'élevage de l'eri a lieu, jusqu'à une altitude de 5000 m et au niveau le plus bas dans les plaines sans aucun détrempe avec une température qui varie de 26 à 35° C (Misra, 1987).

Les forêts dominées par les plantes hôtes reculent continuellement pour des raisons variées. Le phénomène de recul de la forêt n'est pas particulier seulement au nord-est ; il a aussi lieu dans d'autres parties du pays et dans le monde entier. Les foyers tribaux et ruraux ramassent le bois combustible surtout dans la forêt et dans les plantations potagères réalisées dans le cadre de programmes de sylviculture sociaux. Il y a une déforestation continue et plusieurs plants importants sont coupés à des fins domestiques. La déforestation est beaucoup plus importante que le reboisement. Cela a un effet négatif énorme sur le déséquilibre écologique de la nature. " Chanddhuvi " est une station forestière touristique importante dans l'Assam mais la diminution continue des plantations séculaires a eu un effet néfaste sur l'habitat écologique de la zone. Les conditions écologiques à l'intérieur du Parc National de Kaziranga (Assam) se sont aussi détériorées à cause du déboisement et du manque d'autres végétations dans la zone (Singh et Sen, 2001). Le déboisement continu de la flore majeure et la prédominance élevée d'insectes phytophages a entraîné un déséquilibre écologique et détruit l'habitat naturel indigène d'insectes séricigènes importants dans la région. Des conditions similaires existent dans l'Arunachal Pradesh. Les plants sont coupés continuellement pour être utilisés en tant que combustible et à d'autres fins. Cependant, de nos jours, des essais ont été faits pour maintenir l'équilibre écologique dans la nature.

UTILISATION ET POTENTIEL

En dehors de la protection et de la conservation de l'environnement, une des fonctions importantes de la forêt est la production de bois et l'hébergement de produits non bois, qui ont tous des répercussions importantes sur l'économie nationale. Les tribus de la région dépendent de la forêt pour le changement des cultures, le recueil de la nourriture, la construction des matériaux et pour l'emploi. Les forêts apportent du bois, du bambou, des feuilles tendres, des graines à huile, des colorants et des teintures, du kutch et du katha, du caoutchouc, de la résine de pin, du miel, des drogues, des insecticides, des produits comestibles, la fleur de mahua, le tamarin, la noix de cajou, le clou de girofle, des fibres et de la soie. Le bois est une matière première versatile, qui est utilisé par l'homme du berceau à la tombe. La forêt constitue une unité écologique puissante qui est vitale pour l'environnement. Elle influence le climat régional local et permet de maintenir la couche du sol, purifie l'air et aide à assurer le flux d'eau claire. La forêt joue un rôle principal comme " écran de protection ".

La production de soie non-mûrier est le sous-produit de la forêt dans toute la région. La plupart des plantes, surtout som, soalu, les chênes, le ricin, le payam, sont utilisées pour l'élevage des divers vers à soie dans la région depuis longtemps. La sériciculture joue un rôle important dans le maintien des conditions écologiques de la région. Le *Central Silk Board* a lancé un programme d'augmentation du muga et il a contribué pour une grande part à la conservation de races exotiques variées dans la région. Une étude a été réalisée sur le recueil des insectes séricigènes dans l'Assam supérieur et dans la zone forestière d'Arunachal Pradesh et des essais ont été faits pour conserver ces races dans leur habitat naturel indigène (Singh et Sen, 2001).

INSECTES SERICIGENES

La région du nord-est de l'Inde héberge une population naturelle nombreuse d'insectes séricigènes qui ont besoin de réunir les conditions nécessaires à leur conservation (Arora et Gupta, 1979). Parmi les cent soixante espèces de vers à soie non-mûrier enregistrées jusqu'à présent, le genre

Antheraea est le plus grand groupe de saturniidae comprenant des insectes sérieigènes variés (Seitz, 1930, Peigler, 1989 et 1996). Les espèces les plus courantes et exploitées commercialement sont *A. mylitta* Drury, *A. proylei* Jolly, *A. pernyi* Guer., *A. assama* Westwood, *A. roylei* et *Philosamia ricini* (Jolly, 1985). D'autres espèces sauvages *Antheraea* ont aussi été signalées. Les plus communes de ces espèces sont *A. compta*, *A. frithii* Guer., *A. helferi* Guer, *A. knyvetti* Guer, *A. roylei* (Crotch, 1956, Jolly et coll., 1975 ; Sengupta et coll., 1993). On a rapporté trois espèces de *Philosamia* (= *Samia*), dont deux des genres *Loepa*, *Solasea*, *Attacus* et *Caligula* et une d'*Actias* et de *Dictyoploca* (Seitz, 1933 ; Oliver, 1980). En dehors d'elles, on trouve aussi *Actias selene*, *A. maenas*, *A. leto* et *Attacus atlas*, *A. luna* *A. edwardsi* dans certaines zones écologiques (Oliver, 1979a & b ; Seitz 1930). On a récemment enregistré une population importante de *Criculla trifenestrata* dans l'Assam (Ahmed, 1997., Narang et Gupta, 1979a) Un ensemble de 11 espèces de papillons à soie sauvages sont disponibles dans la région entière et leur conservation assurera la protection de la richesse de la forêt en utilisant les plantes hôtes disponibles pour l'élevage ce qui générera par la-même un revenu pour les magnaneries de la région (Narang et Gupta, 1980). Cependant, la densité de population naturelle de *A. frithii*, *A. pernyi*, *A. roylei*, *A. atlas*, *A. edwardsi* et *P. cynthia* est très faible et on les recueille rarement et peu régulièrement, ce qui indique une tendance au déclin du niveau de leur population naturelle (Sinha et Jolly, 1967). Il y a un grand nombre de similarités morphologiques entre les divers vers à soie mais ils ont des caractéristiques génétiques différentes (Arora et Gupta, 1979). Les espèces qui sont génétiquement similaires sont plus susceptibles de partager un ancêtre commun que les espèces qui sont génétiquement différentes. Des espèces variées ont été hybridées dans le genre *Antheraea* pour évaluer la distance génétique entre les espèces différentes (Jolly, 1976).

L'hybride de *A. roylei* et de *A. pernyi* nommé comme nouvelle espèce, *A. proylei* Jolly (Jolly et coll., 1973 ; Jolly, 1976) révèle 30 éléments à la métaphase I chez les mâles de la génération F1, mais le nombre de tels éléments varie entre 32 et 49 en F2 et les individus du croisement de retour (Jolly et coll., 1973). L'hybride a été élevé par auto-accouplement au cours des dernières années. L'étude cytogénétique confirme un nombre de chromosomes constant, c'est à dire $2n = 98$ puisque l'on a enregistré ce nombre invariablement chez sept individus mâles, bien que le nombre d'études disponibles sur les cellules ne soit que de quinze (Narang et Gupta, 1979d, 1980). Il est cependant nécessaire de confirmer ce point par des études supplémentaires. Tazima (1974) a avancé l'idée que l'augmentation du nombre de chromosomes chez *A. pernyi* a évolué à partir des chromosomes de *A. roylei* par division parce que l'hybride F1 présente un appariement complet des chromosomes des deux espèces et a invariablement 30 éléments (bivalents et trivalents) à la métaphase I. La fertilité remarquable des hybrides *A. roylei* – *A. pernyi*, bien que l'on sache à présent qu'il existe un nombre de chromosomes variables (Jolly et coll., 1973), montre la proximité de *A. roylei* avec *A. pernyi*. Puisque la population des hybrides comporte des individus avec des nombres de chromosomes variés et une association symétrique avec *A. roylei* sans avoir atteint l'isolement écologique et / ou reproductif du dernier, son statut comme nouvelle espèce semble douteux. Traut et Mosbacher (1968) et Ennis (1976) ont rapporté de la chromatine sexuelle dans les tissus somatiques des femelles de nombreuses espèces de lépidoptères étudiées et en ont déduit que cette hétérochromatine spécifique femelle représente Y. Brigger a observé de la chromatine sexuelle dans les cellules germinales des femelles de 3 espèces de papillons et en comparant sa morphologie avec celle des chromosomes sexuels, en a déduit que c'était X. Cependant, pour accepter l'interprétation de Brigger il faudrait aussi étudier la chromatine sexuelle des tissus somatiques. On a déjà observé la présence de chromatine sexuelle dans les tissus somatiques de quatre espèces de femelles saturnidés c'est à dire *P. cynthia* (Traut et Mosbacher, 1968), *Actias luna*, *Automeris io* et *Dryocampa rubicunda* (Ennis, 1976) et son absence pour les deux sexes chez *P. ricini* et *A. assamensis* (Chowdhury & Bhuyan, 1962) et *Anisota senatoria* (Ennis, 1976, Nagarn et Gupta, 1979e).

Les hybrides de *A. assama* × *A. mylitta*, *A. pernyi* × *A. mylitta* ; *A. mylitta* × *A. roylei* ; *A. mylitta* × *A. frithii* ont été testés et des essais ont été faits pour mettre au point une variété adaptée pour l'exploitation dans la région entière (Sengupta, 1985). Cela a donné une descendance viable, qui forme

des cocons mais les papillons qui en résultent sont stériles. *A. mylitta* est proche de *frithii* par comparaison à *A. assama* et *pernyi*. L'hybride inter-spécifique le plus réussi est *A. pernyi* × *A. roylei* et son réciproque. Leurs hybrides F1 sont pleinement fertiles et vigoureux, et ont une hétérosis positive pour presque tous les caractères qualitatifs et quantitatifs (Jolly 1976, 1985). Le croisement de retour est fertile avec n'importe laquelle des espèces parentales. La morphologie des larves, des cocons, des empreintes folliculaires sont principalement héritées de *A. pernyi*. Le nombre de chromosomes chez diverses espèces d'*Antheraea* étudiées est compris entre $2n = 30$ et $2n = 98$. *A. assama* a le nombre de chromosomes le plus faible ($2n = 30$) et *A. pernyi* le plus élevé ($2n = 98$). Le nombre de chromosomes diploïdes chez *Antheraea roylei* sauvage est de 60. On a rapporté que la configuration chromosomique chez *Antheraea mylitta* ($n = 31$) et *A. frithii* ($n = 31$) est de 62 (Gupta et Narang, 1980a). Le reste des espèces révèle un nombre type de chromosomes du genre de $2n = 60$ et 62 (Oliver, 1979b, Pinhey & 1975). On connaît maintenant le nombre de chromosomes chez les saturniidés pour 25 espèces appartenant à 13 genres (Robinson, 1971 ; Ennis, 1976 ; Narang et Gupta, 1979b, c, d). Les nombres haploïdes rapportés jusqu'à présent sont compris entre 13 chez *P. cynthia* et 49 chez *A. pernyi*, avec 31 comme nombre type probable (Narang et Gupta, 1979c). On a rapporté un polymorphisme chromosomique interspécifique chez *P. ricini* : la variation est entre les populations et seulement pour le sexe femelle – la population de Titabar ayant $2n = 28$ et la population de Borduar-Dhenubhanga ayant $2n = 27$, le chromosome perdu de ce dernier étant le Y du couple sexuel XY (Narang et Gupta, 1979c).

On a aussi observé un polymorphisme chromosomique chez *A. roylei* et *A. frithii*, le premier de la région de l'ouest a $2n = 62$, 64 et 68 tandis que le second de la même région de l'Inde a $2n = 62$ et 64 (Sinha et Jolly, 1967). Il semble que chez le genre *Antheraea* la fission chromosomique ait joué un rôle pivot dans l'évolution des cariotypes. Cela est assez plausible chez l'espèce *Antheraea*, qui a un chromosome holocentrique. Le nombre de chromosomes variés connus pour différentes espèces est de 60, 62, 64 et 68 (Sengupta et coll., 1993). A la lumière de cette étude, il est probable qu'*A. assama* avec le nombre de chromosomes le plus faible est la forme ancestrale à partir de laquelle les autres espèces ont dérivé (Doedikar et coll., 1962 & 1969, Gupta et Narang, 1980b).

Il y a une tendance au déclin de la composition des espèces et de la densité de la population de papillons à soie sauvages en Inde. Les recherches dans le passé (Scitz, 1933, Jolly, 1976, Sengupta, 1985, Barua et coll., 2000, Chaudhury, 1981) indiquent que plus de 19 espèces séricigènes étaient présentes en Inde mais qu'au cours du temps, la composition des espèces a été altérée (Narang et Gupta, 1980). Cela est probablement dû à la rareté de plantes hôtes adaptées ou à l'interaction continue entre plantes hôtes et insectes, qui a entraîné le développement de biotype ou d'écotype variés et en a entraîné l'extinction (Ananthakrishnan, 1994). De plus, la diminution de la composition des espèces et de la densité de population naturelle de papillons à soie sauvages pourrait être due à un changement des facteurs de l'écosystème / du climat / de l'environnement / ou à un facteur biotique c'est à dire à la diminution des plantes hôtes, provoqué par un déboisement intense pour répondre aux besoins de plus en plus importants de la population humaine, qui a entraîné la colonisation par l'homme de zones forestières pour les habitations et la culture, ce qui a grandement changé les composants biotiques, c'est à dire la flore et la faune (Jain et Bradshaw, 1966, Frankel, 1970, Albough, 1986, Srivastava et Sinha, 2000). L'autre raison expliquant la diminution de ces papillons à soie pourrait être le niveau restreint de distribution, la gamme étroite de préférence pour la plante hôte (oligophagie), leur fertilité et leur taux de survie faibles, l'augmentation des attaques par les ennemis naturels c'est à dire les parasites, les prédateurs et les maladies (Sundramurthy, 1977, Singh et Singh, 1988, Oliver, 1983, Chikwenhere, 1992, Singh et coll., 2000a). Cependant, il est nécessaire de conserver ces insectes séricigènes rares qui sont importants sur le plan écologique. A l'exception de l'eri, du tasar et du muga, les autres papillons à soie sauvages n'ont pas été exploités sur le plan commercial, on ne connaît donc pas leur rôle écologique. Il est donc nécessaire d'étudier la biodiversité des papillons à soie sauvages.

DIVERSITE GENETIQUE

La diversité génétique que l'on observe dans la population naturelle des papillons à soie sauvages exploités sur le plan commercial l'eri, le muga et le tasar pourrait être due à la distribution étendue de leur habitat naturel, leur préférence variée pour les plantes hôtes et aux efforts humains (Sidiqi et coll., 2000). A l'heure actuelle, on a besoin de souches capables de bonnes performances dans des conditions de stress. On a donc essayé d'identifier l'écotype et les écotypes potentiels dans diverses parties de la région du nord-est. Les régions élevées des collines de Jayantia, de Garo et de Khasi qui hébergent le muga sauvage diminuent car il y a une perte de l'habitat de manière continue à l'heure actuelle et donc, la perte même de petites parcelles est nuisible à la véritable continuité de la lignée (Sidiqi et Das, 2000). L'élevage du muga se détériore rapidement dans les zones de l'Assam supérieur en raison de facteurs biotiques néfastes et de la destruction de l'habitat naturel (Chaudhury, 1981, Chandrasekhar et Thangavelu, 1986, Thangavelu et Bhagwati, 1985). Les cocons de grainage sont recueillis à partir des récoltes commerciales de Kotia et de Jethua réalisées dans le bas de l'Assam où l'environnement est un petit peu plus propice au maintien de la récolte et on l'élève dans toute la région du nord-est. Les résultats indiquent que la conservation des papillons muga dans les collines du bas de l'Assam est idéale et propice. A l'heure actuelle, on a besoin de conserver le ver à soie muga dans différents habitats écologiques pour augmenter la diversité de la population. On a essayé d'élever le ver à soie muga dans la zone de Cooch Behar du Bengale Ouest, ce qui représente une étape importante dans l'accroissement de la sériciculture muga (Bhattacharya et Teotia, 2000, Sidiqi et Das, 2000). Les travaux de Chaudhury (1974, 1981) ont mentionné la présence sporadique de variantes dans la population naturelle d'*Antheraea assama*. Cependant, on a par la suite rapporté que ces variants s'étaient éteints (Chaudhury, 1981, Subhar Rao, 1976). En plus des polymorphismes de couleur, on rapporte que le ver à soie muga possède des souches distinctes pour le voltinisme. La variété cultivée est en général polyvoltine et possède 5 à 6 générations qui se chevauchent sur une année. Alors que dans l'habitat naturel certaines souches sauvages rentrent en hibernation au stade nymphal pendant la saison hivernale (Chaudhury, 1962, 1992). Thangavelu et coll., (1988) ont fait une brève étude de la population naturelle d'*A. assamensis* qui présente une diversité génétique pour les caractères de l'œuf, de la larve et du cocon. Une évaluation de la population naturelle que l'on a trouvée dans l'arrière pays du bas de l'Assam dans les collines de l'est et de l'ouest du Garo dans le Meghalaya révèle qu'un stade de diapause nymphale entraîne un bivoltinisme (Barua et coll., 2000). Mais jusqu'à présent on n'a pas publié de rapport détaillé sur l'histoire naturelle de la région ou de n'importe quelle autre région où prévaut un climat aussi chaud et humide.

Nécessité de recueillir et de conserver la diversité génétique :

Vavilov (1932) a expliqué qu'il faut une base génétique large pour l'amélioration des plantes cultivées. Cela s'applique également à l'amélioration du ver à soie domestique ou sauvage. Cependant, les problèmes concernant la conservation des ressources génétiques n'ont attiré l'attention mondiale qu'en 1972 pendant la Conférence Environnementale des Nations Unies à Stockholm quand l'Organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation (O.A.A.) et le Programme Biologique International (PBI) se sont réunis à ce sujet (Frankel 1982).

En 1974, le Bureau International pour les Ressources Génétiques des Plantes (IBPGR) a été établi à l'intérieur du groupe consultatif sur la Recherche Agricole Internationale (CGIAR) pour promouvoir, catalyser et coordonner les activités sur le recueil, la documentation, l'évaluation et l'utilisation des germoplasmes (Arora, 1993, Brazier et coll., 1976). Cependant, les efforts ont largement porté sur les cultures vivrières et commerciales. Les institutions de recherche impliquées dans le lignage du ver à soie et de leurs plantes hôtes ont maintenu les collections de germoplasmes en fonction de leurs objectifs de lignage respectifs (Oliver, 1980). En Inde, on a récemment mis en place une institution pour le recueil et la conservation du mûrier et les ressources génétiques du ver à soie du mûrier. Cependant, il faut encore entreprendre des efforts concertés du côté non-mûrier.

Caractéristiques idéales d'une banque génétique :

Des lignées bien définies aident les sélectionneurs à choisir correctement les donneurs dans n'importe quel programme de lignage. On considère que les caractéristiques suivantes sont idéales pour une banque génétique :

- Classification des collections de travail
- Variabilité génétique des traits spécifiques
- Variabilité de la base écologique et de la base génétique désirées pour le trait désiré
- Fonctions de base d'une banque génétique

Une banque génétique fournit des donneurs bien définis avec des traits spécifiques pour les sélectionneurs qui leur permettent d'atteindre leurs objectifs de lignage. Pour satisfaire le sélectionneur, la banque génétique doit assurer les fonctions suivantes :

- Recueil et conservation du matériel génétique
- Caractérisation, évaluation et documentation du matériel génétique
- Réalisation d'études de base centrées sur les relations d'espèces, l'identification biochimique ou moléculaire des variétés, la diversité génétique et le maintien d'un musée de référence pour l'identification des taxa.

Contraintes de recueil et de conservation des papillons à soie sauvages :

A l'inverse des vers à soie domestiqués, en général les vers à soie sauvages ne se nourrissent pas en captivité et doivent être maintenus à l'extérieur, ce qui les soumet aux caprices de la nature. Puisque les plantes hôtes d'un grand nombre d'entre eux sont de grands arbres, il faut beaucoup d'espace et il est difficile de gérer les déplacements des vers et des papillons.

Puisque les vers sont élevés à l'extérieur, les lignées recueillies dans différentes régions pourraient ne pas s'adapter au nouvel environnement. De plus, les vers vivent sur tous les arbres qui ne sont pas à la portée de l'homme, il peut y avoir un mélange des lignées et un accouplement non discriminant des papillons qui peuvent voler.

Contraintes d'utilisation des ressources génétiques :

Un sélectionneur, utilisant ses connaissances génétiques de base et l'information sur les ressources génétiques prévoit systématiquement d'atteindre des objectifs de lignage spécifiques. Il faut clairement définir le problème et avoir un matériel génétique ciblé, bien défini et documenté. On a identifié un certain nombre de contraintes qui viennent de la manière dont les ressources génétiques sont utilisées. Elles sont les suivantes :

- le manque de matériel génétique suffisant à la portée du sélectionneur
- le manque de germoplasmes suffisamment évalués
- une caractérisation génétique limitée du germoplasme
- la difficulté à amener les donneurs dans un lieu donné

Incompatibilité :

- Dépendance des forêts où les sélectionneurs n'ont peut-être pas envie de rester et travailler.
- Manque de mutants utiles pour l'environnement écologique désirable
- Manque d'installations pour le stockage et la recherche des données
- Insuffisance de personnel formé et de fonds
- Délai du contrôle de quarantaine, etc..

Facteurs favorisant l'utilisation efficace des collections de germoplasmes :

La fonction de base d'un sélectionneur est d'incorporer systématiquement les gènes désirés chez une lignée bien adaptée de la localité (base écologique) dans le but d'atteindre des objectifs spécifiques. Pour un lignage réussi, les facteurs suivants sont considérés comme vitaux :

- Identification des donneurs utiles

- Pyramidage des gènes
- Lignage de quelques traits spécifiques à la fois
- Utilisation de sources diversifiées
- Exploitation de la diversité inter-spécifique
- Large hybridation et approche inter-disciplinaire

Objectifs de lignage attendus par les sélectionneurs de vers à soie :

Le but du sélectionneur de vers à soie est d'améliorer la quantité et la qualité de la production de soie et d'obtenir une récolte stable. Ces objectifs dépendent à leur tour de l'efficacité de conversion feuille-soie, de la qualité du cocon, de la survie, etc. La survie à son tour dépend de la tolérance au climat difficile, de la résistance aux maladies, etc. Parfois, des lignées aux caractères spéciaux sont mises au point pour produire de la soie spécialisée ou à d'autres fins. Compte tenu de cela, on a déterminé les objectifs de lignage suivants:

- Amélioration de la qualité et de la quantité de soie produite
- Tolérance au climat difficile
- Résistance aux maladies
- Meilleure production d'œufs
- Ecllosion uniforme
- Mue larvaire synchronisée
- Durée de vie courte
- Filage synchronisé
- Emergence synchronisée

Mesures recommandées pour une utilisation efficace du matériel génétique :

L'utilisation de matériel génétique peut être faite de deux façons, c'est à dire en l'exploitant commercialement sous la même forme ou en l'utilisant en tant que donneur dans des programmes de lignage pour mettre au point les lignées désirées. Bien que le rendement et la qualité soient les objectifs de base de n'importe quel programme de lignage, le sélectionneur se fixera aussi d'autres objectifs pour surmonter des problèmes régionaux variés tels que la tolérance à la sécheresse, au gel, à la salinité, les maladies, les insectes nuisibles, etc. Contrairement à la multiplication par les graines, on peut préserver et bien exploiter n'importe quelle variation génétique désirable grâce à la multiplication végétative. Selon ses objectifs, le sélectionneur peut concevoir un programme de lignage et sélectionner les donneurs. Dans le cas du ver à soie, il est essentiel de maintenir et de conserver systématiquement les caractères désirés. Les lignées de ver à soie sont la plupart du temps exploitées comme hybrides F1. Ainsi, un sélectionneur recherche la distance génétique et la capacité de combinaison pour s'assurer d'une meilleure hétérosis.

La sélection correcte des donneurs dépendra de la compréhension du matériel de base ainsi que du pool génétique où les donneurs doivent être sélectionnés. Il devient donc nécessaire de caractériser, d'évaluer et de documenter le matériel génétique disponible de préférence d'une manière facilement classifiable. Les mesures suivantes sont recommandées pour une utilisation efficace du matériel génétique.

- Evaluation rapide et caractérisation des collections de germoplasmes
- Développement et utilisation de techniques de criblage efficaces
- Catalogage des gènes
- Transfert ou variabilité génétique utile dans les environnements agronomiques désirables
- Renforcement des installations pour le maintien et l'utilisation des espèces sauvages / primitives de cultivars

Etablissement des centres de ressource :

- Etablissement de Centres Régionaux pour le stockage des germoplasmes dans des conditions naturelles pour servir de soutien et caractérisation et évaluation correctes
- Renforcement des équipements informatiques pour l'enregistrement, le traitement et la recherche des données
- Formation en gestion des ressources génétiques
- Echange rapide d'information entre les scientifiques des banques génétiques et les sélectionneurs
- Les papillons à soie sauvages ne sont pas seulement la source de la soie mais ils jouent aussi un rôle important dans la gestion de l'écosystème (Chikwenhere, 1992 ; Peigler, 1993 et Kioko 1998). L'adaptabilité biologique de ces vers à soie est différente et donc elle se nourrit de différents types de plantes hôtes.

DIVERSITE ECOLOGIQUE DE L'ELEVAGE DE VERS A SOIE

Elevage du muga :

Le ver à soie muga *Antheraea assama* est un insecte polyphage qui se nourrit principalement sur les arbres Som (*Machilus bombycina*) et Soalu (*Litsaea polyantha*) qui prospèrent dans la vallée du Brahmaputre et les contreforts du Naga, Khasi et Garo (Bharali 1967, 1969, 1978, 1982, Barah et coll., 1989, Thangavelu et Barah, 1986, Chandrasekher et Thangavelu, 1986). Généralement, l'arbre som est la seule espèce qui apporte du matériel alimentaire au ver à soie dans la région bien que soalu soit aussi utilisé comme plante secondaire (Bardoloi et Hazarika, 1998). On estime que la surface existante de plantes hôtes du muga est d'environ 3100 ha avec l'Assam qui représente plus de 75 pour cent, le Meghalaya environ 15 pour cent et le Manipur environ 7 pour cent de la surface totale. Il y a eu une augmentation progressive de la surface de plantes hôtes puisque le *Central Silk Board* a lancé le "Projet de Développement Séricicole du Muga" et les "Programmes d'Augmentation des Plantes Hôtes du Muga". Le ver à soie muga est polyvoltin et peut être élevé pendant toute l'année (Thangavelu et coll., 1984). L'élevage du ver à soie muga est une activité extérieure et elle est donc exposée aux caprices de la nature. Généralement, six récoltes sont entreprises à savoir Kotia (octobre / novembre), Jarua (décembre / janvier), Chatua (février / mars), Jethua (avril / mai), Aherua (juin / juillet), Bhodia (août / septembre) (Sahu et coll., 2000). Parmi elles, deux sont des cultures commerciales (Jethua et Kotia), deux sont des récoltes avant le grainage (Jarua et Aherua) et deux sont des récoltes de grainage. La durée de l'élevage est d'environ 45 à 50 jours en fonction de la saison et de l'année. En général, pendant l'élevage des récoltes commerciales la température optimum varie entre 20 et 31° C et l'humidité relative est comprise entre 65 à 95 %, ce qui est adapté pour l'élevage et permet donc d'obtenir plus de cocons (1 : 50 ou 60). Bhodia et la dernière Jarua sont les deux récoltes de grainage importantes tandis qu'Aherua et Jarua sont les récoltes d'avant le grainage. Les récoltes de grainage Bhodia ont lieu dans des conditions climatiques hostiles avec 27 à 35° C de température et 75 à 95 % d'H. R. accompagnées par de fortes précipitations et de grêles. La récolte Jethua a lieu après l'hiver à une température comprise entre 9 et 30° C et 40 à 90 % d'H. R.

Elevage du tasar du chêne :

La découverte du tasar du chêne dans la région sub-Himalayenne de l'Inde pendant la fin des années soixante a été l'une des réussites les plus significatives qui ont permis à l'histoire de la sériciculture indienne de prendre une nouvelle dimension. Une étude réalisée dans la région du nord-est révèle l'existence d'une espèce d'insecte séricigène élevé dans la nature *Antheraea roylei* qui produit des cocons non dévidables à couche double (Jolly et coll., 1975). Pendant les années soixante dix, un hybride viable a été mis au point à partir d'une hybridation inter-spécifique entre l'espèce indigène *A. roylei* et son homologue chinois *A. pernyi*. On l'a nommé *Antheraea proylei* Jolly (Jolly et coll., 1975). Depuis lors des efforts continuels ont été entrepris pour standardiser et stabiliser la race à divers endroits en Inde. L'élevage des vers à soie a été réalisé sur un certain nombre

de variétés de *Quercus* spp. à différentes hauteurs pour permettre des élevages consécutifs à des fins commerciales et de grainage. Pour obtenir un deuxième élevage de récolte réussi, on a adopté un concept d'élevage à basse altitude, altitude moyenne et altitude élevée que l'on a trouvé économiquement viable. Le premier élevage de récolte se fait sur *Q. incana* à de faibles altitudes pendant le mois de mars. On procède ensuite à une deuxième récolte réussie à des altitudes plus élevées sur *Q. semicarpifolia* et *Q. himalayana* où le bourgeonnement est retardé (mai-juin) par comparaison aux plantes poussant à des altitudes plus basses (mars). Pour l'élevage à des altitudes moyennes, la saison est avril/mai. La récolte de cocons pour l'élevage à altitude moyenne peut être utilisée à des fins de dévidage.

On ajuste la taille des plants de chênes pour apporter au ver à soie un feuillage de qualité pendant la saison d'élevage adaptée quand les conditions de température et d'humidité sont idéales pour les vers à soie. On a observé qu'une taille réalisée en septembre assure un débouillage précoce de la feuille dès la fin février ou pendant la première semaine de mars à une faible altitude (750 m) et dix jours plus tard à une altitude moyenne et élevée (1200 m et au-dessus) contre un bourgeonnement respectivement au milieu de mars et au début d'avril. Pour le deuxième élevage de récolte, on peut avoir recours à une taille un mois avant le début de l'élevage. En général, l'élevage du tassar du chêne se réalise à l'extérieur et on obtient deux récoltes (printemps et automne). Le premier élevage de récolte commence à partir de la première / deuxième semaine de mars au printemps et on l'appelle donc récolte de printemps et la deuxième récolte a lieu en automne. Les larves qui viennent d'éclore sont montées sur les buissons de chêne et elles commencent à se nourrir immédiatement. La température et l'humidité adaptées pour l'élevage sont de 20 à 25° C et 70 à 75 % d'humidité relative. La larve du tassar du chêne passe par quatre mues et la période larvaire varie de 35 à 50 jours en fonction de la température et de l'humidité atmosphériques. En tout, la larve du tassar du chêne achève le cycle de vie de son cocon en 60 à 65 jours. A présent, *Antheraea proylei* est la seule espèce utilisée pour l'exploitation commerciale, cependant, nous avons essayé de standardiser *Antheraea pernyi*, une espèce exotique d'origine chinoise dans des conditions indiennes. Une autre espèce, *Antheraea frithii* est aussi élevée dans le Manipur. En plus de cela, d'autres lignées hybrides ont été mises au point et on a essayé de les exploiter commercialement (Singh et coll., 2000a & b). Dans la région du nord-est, la récolte du printemps est la principale récolte de grainage / commerciale qui commence à partir de la première semaine de mars quand a lieu le débouillage naturel des plants de *Q. serrata*. Cependant, une récolte supplémentaire subsidiaire peut aussi être entreprise en été ou en automne en rompant la diapause nymphale en exposant les cocons de grainage au traitement photopériodique et en taillant légèrement les plants bien en avance.

Elevage eri :

Le ver à soie eri (*Philosamia ricini*) est polyphage, polyvoltin et est une variété résistante à la maladie confinée à grande échelle aux états du nord-est (Patil et coll., 2000). Les principales plantes hôtes utilisées pour l'élevage du ver à soie eri sont le ricin (*Ricinus communis*), Kesseru (*Heteropanax fragrans*), le manioc (*Manihot utilissima*), Payam (*Evodia flaxinifolia*), Gulancha phool/Champa (*Plumeria acutifolia*), Bhotera (*Jatropha acurcas*), Barkesseru (*Ailanthus glandulosa*), Korha (*Sapium allgeniaefolium*) et Bazraman (*Zanthorylum yhesta*), Papaya (*Carica papaya*). La plupart de ces plantes appartiennent à la famille des Euphorbiaceae. Les larves du ver à soie eri préfèrent se nourrir sur des feuilles de ricin et donnent des cocons de grande taille avec une teneur en soie importante mais il n'y a pas de culture régulière du ricin ou d'autres plantes hôtes dans le but de nourrir les vers à soie eri, les feuilles sont recueillies à partir des plants de ricin ou de kesseru disséminés près des habitations. L'élevage du ver à soie eri se réalise à l'intérieur et les vers ne sont donc pas exposés aux caprices de la nature (Patil, 2000, Singh et coll., 2000). Les éleveurs entreprennent jusqu'à 5 à 6 élevages par an. En plus de l'utilisation de son fil de soie pour la production de tissus, les tribus du nord-est de l'Inde utilisent la nymphe du ver à soie comme ingrédient quotidien pour la nourriture.

Moriculture :

De nombreux types de mûrier sont cultivés à divers endroits dans la région du nord est : les types diffèrent de par la variabilité de leur adaptabilité aux sols et aux climats, de leur résistance aux maladies, de la valeur nutritive de la feuille pour le ver à soie et de leur utilisation comme stock ou greffon pour les greffes. Le type de mûrier le plus important cultivé en Inde pour l'élevage des vers à soie est *Morus alba* var. *multicaulis* Loud., qui est un natif de Chine ou des Philippines. Il pousse rapidement et est adapté à la culture sur le terrain et produit de grandes feuilles tendres et épaisses. *M. alba* var. *atropurpurea* (Shahtut), aussi originaire de Chine, est largement cultivé pour ses grands fruits cylindriques, violet foncé et succulents. Il pousse vite aussi et donne de grandes feuilles épaisses qui sont tout à la fois lisses, tendres et succulentes.

Le mûrier est cultivé à grande échelle dans divers endroits de la région du nord-est en Inde. On le cultive aussi comme arbre pour les haies ou les avenues. Dans l'Himalaya, on le trouve jusqu'à une hauteur de 1 200 m. Dans les collines, il est principalement confiné aux lits ou aux bords des rivières où il y a assez d'humidité. Il ne pousse pas sur les pentes sèches ou dans les sols peu profonds où l'humidité est un facteur limitant. Les vieilles feuilles tombent en novembre – décembre et les arbres n'ont pas de feuilles en hiver. Les nouvelles feuilles apparaissent en mars-avril en fonction du climat de la localité. Le mûrier est un arbre qui supporte l'ombre et on peut le cultiver avec succès sous d'autres espèces ayant besoin de lumière. Dans l'Assam et le Tripura, le mûrier est cultivé sur le terrain et ses feuilles sont récoltées plusieurs fois dans l'année pour nourrir les races de ver à soie polyvoltines. Dans le Meghalaya et le Mizoram, il est cultivé comme arbre et on ne taille ses feuilles que pendant une saison pour élever les races monovoltines du ver à soie (Rangaswamy et coll., 1978).

Le mûrier est un arbre à feuilles caduques qui pousse vite et que l'on trouve aussi bien sous un climat subtropical, tropical que tempéré. Il y a de nombreux types de mûrier dont *Morus alba* (var. *indica*) et *Morus laevigata* qui poussent de manière sauvage dans la région. A part eux, il y a un grand nombre de variétés locales qui sont disponibles dans toute la région. Assambola et Jatinuni sont les variétés locales les plus courantes qui sont encore utilisées pour l'élevage du ver à soie dans les zones éloignées de l'Assam. Auparavant, on n'avait pas recours aux pratiques agronomiques dans les plantations, le rendement en feuilles était donc très faible. Les variétés de mûrier à rendement élevé sont multipliées et toutes les pratiques agronomiques, de maturation et d'apport d'irrigation ont été adoptées pour leur entretien, ce qui permet d'augmenter considérablement le rendement foliaire et de maintenir la biodiversité dans la région.

CONCLUSION

L'élevage du tassar du chêne (*A. proylei*), du ver à soie eri (*P. ricini*) et du ver à soie muga (*A. assama*) offre des opportunités inhabituelles d'amélioration des conditions socio-économiques des populations de la région du nord-est. La légitimité sociale de l'industrie séricicole est donc très élevée, elle peut donc être utilisée pour améliorer les conditions de vie de la population et contribuer à l'arrêt du déclin de la biodiversité. Dans toute la région du nord-est, on peut associer en symbiose des objectifs écologiques et économiques pour promouvoir la culture des plantes hôtes adaptées. Il existe de vastes possibilités d'extension de la surface sous *Quercus* dans la région pour l'élevage du tassar tempéré et sous *Machilus* et *Litsaea* pour l'élevage du ver à soie muga. En entreprenant plus de recherches, on pourrait entreprendre l'élevage de l'eri pour améliorer les conditions socio-économiques des fermiers. Compte tenu de la grande diversité génétique, les divers papillons à soie sauvages ont des stratégies de nourrissage et de reproduction très différentes, il est donc nécessaire d'entreprendre des études systématiques de manière urgente pour promouvoir la croissance du papillon à soie sauvage, pour augmenter la production durable et la production de la soie non-mûrier en Inde. Il faut mettre en place des incitations économiques qui associent la conservation biologique au développement économique surtout pour les communautés rurales.

CHORION ARCHITECTURE IN THE JAPANESE GIANT SILKMOTH, *CALIGULA JAPONICA JAPONICA* MOORE

Y. KAWAGUCHI^{1*}, M. ICHIDA², T. KUSAKABE¹ & K. KOGA¹

1. Laboratory of Silkworm Science, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

2. Experimental Farm, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-0962, Japan.

The chorion of *Caligula japonica japonica* was observed for its surface, sections and other structures mainly by scanning electron microscopy. At the anterior pole region of the surface, there was a micropylar opening surrounded by multiple lines of petal-like cell imprints forming a large rosette. The anterior pole region had four to eight "sperm ducts," dangling from the inside surface of the chorion. The whole surface areas except the micropylar region were comparatively smooth, but were found to have fine wrinkles. Neither polygonal network patterns nor knobs were seen. A large number of huge aeropyles were located in the lateral flat, marginal and posterior pole regions, but not in the anterior pole region. Cross-sections of the chorion revealed three layers, outer, middle and inner. The inner layer consisted of small columns oriented perpendicularly to the oocyte surface. The outer layer was very thin making a smooth crust. The middle layer, which was the thickest, was further divided into four zones: the *a* zone was holey, *b* had marked air space, *c* was the thickest with oblique lamellae and *d* had regularly oriented lamellae. These structures, together with the above-described large aeropyles, may facilitate gas exchange and seemed to be adaptive to wild habitation.

Key words: *Caligula japonica japonica*, wild silkmoth, chorion structure, micropylar apparatus, sperm ducts.

INTRODUCTION

The insect chorion has a highly ordered architecture comprised of a large number of chorion proteins. These proteins are produced by the follicular epithelial cells, which are specialized for the synthesis and secretion of the chorion proteins when these are engaged in choriogenesis (Kafatos *et al.*, 1977; Regier and Kafatos, 1985). The chorion structures, in particular the micropylar apparatus, numerous aeropyles, hard outer layers and holey inner layers (Hinton, 1970; Margaritis, 1985), permit complicated functions, such as sperm entry, gas exchange, protection from environmental hazards and maintenance of water. Morphological features of chorion, including the external polygonal network imprints and the internal layer structures, of lepidopteran insects have mainly been observed in *Bombyx mori* (Omura and Kataoka, 1943; Akai, 1957, 1976; Sakaguchi *et al.*, 1973; Kanda *et al.*, 1974; Ohtsuki *et al.*, 1977a, b; Ohtsuki and Kanda, 1978; Nadel and Kafatos, 1980; Katsuno, 1984a, b; Kawaguchi *et al.*, 1993), *Bombyx mandarina* (Omura and Kataoka, 1943; Nho, 1990; Sakaguchi *et al.*, 1990, 1998; Kawaguchi *et al.*, 1996b, c), *Antheraea polyphemus* (Mazur *et al.*, 1980, 1982, 1989;

* To whom correspondence should be addressed

Regier *et al.*, 1982), *Hyalophora cecropia* (Smith *et al.*, 1971) and *Samia cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 2000).

The Japanese giant silkmoth, *Caligula japonica japonica* Moore [Lepidoptera: Saturniidae], which inhabits Japan, is known for the silk-gut made of the silk glands taken out of its larvae named "Shiraga-taroh." Spinning yarn is also produced from its cocoon, which has been called "Sukashidawara" (Koyama and Miyata, 1980). Although this insect has not been reared artificially in Japan for the production of wild silk, it was often served as an experimental tool, e.g., for the biochemistry of phenol oxidase or tyrosinase and haemolymph proteins (Kawasaki and Sato, 1985; Shimada *et al.*, 1992), the physiology of aestivation photoperiodism (Nagase and Masaki, 1991) and the molecular biology of telomeric repeats (Kubo *et al.*, 2001).

In the present study, we observe the surface structures of the chorion of *C. japonica japonica*, mainly using a scanning electron (SE) microscope. There was a morphological singularity in the surface and cross-sectional surface structures at the lateral flat regions of the chorion in comparison with previously reported features of *B. mori* (Kawaguchi *et al.*, 1993), *B. mandarina* (Kawaguchi *et al.*, 1996b, c) and *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 2000).

MATERIALS AND METHODS

Insects:

Cocoons of *C. japonica japonica* were collected from maidenhair trees and chestnut trees in the suburbs of Mimasaka in Okayama Prefecture. Pupae were kept until eclosion; female moths shortly after emergence were put in a large paper bag and allowed to lay unfertilized eggs, which were washed thoroughly with distilled water using a sonicator and air-dried. All laboratory procedures were performed at 25° C.

Morphological observation of chorion:

Whole eggs were fixed in Carnoy's fluid for 4 to 5 days at 0° C and observed for the surface structure of chorion under either a binocular (Nikon SMZ-10) or an SE microscope (JSM 5200, at 15 kV). Alternatively, a chorion was torn by a watchmaker's forceps in distilled water, dehydrated in a graded series of ethanol, freeze-dried with *tert*-butyl alcohol, mounted on aluminum stubs with a double-stick carbon tape, sputter coated with gold and observed for cross-sectional structures of chorion by SE microscopy. Egg dimensions, i.e., the lengths of major and minor axes, the area of surface, the length and inside diameter of the sperm duct and the area of putative polygonal units, were measured using photographs as described previously (Kawamura and Nakada, 1981; Kawaguchi *et al.*, 1996a). Each value was the average of 30 eggs from egg batches deposited by three moths (10 eggs per batch).

RESULTS

Shape, dimensions and surface structures of the egg:

The egg of *C. japonica japonica* was roundish-cylindrical in shape, and narrower at the anterior pole area than at the posterior (arrows in Fig. 1A). It was opaque and white in color with brownish spots printed on the whole outer surface by some dye, making the appearance very similar to that of quail's egg. The lengths of the major and minor axes were 2.46 ± 0.10 and 1.67 ± 0.08 mm, respectively, and the area of lateral region was 3.68 ± 0.26 mm² (mean $\pm$ SD, $N=30$). There was a micropyle at the anterior pole region. It had a single external opening (arrow in Fig. 1B), surrounded by imprints forming a rosette with seven to eight concentric lines of petals. The number of petals directly surrounding the micropyle was six to nine, on average 7.7 ± 0.8 , in eggs from a single moth. No aeropyles were seen on these petals. Inside the micropyle, there were plural openings (invisible in the Fig. 1C), which may provide entranceways for sperms.

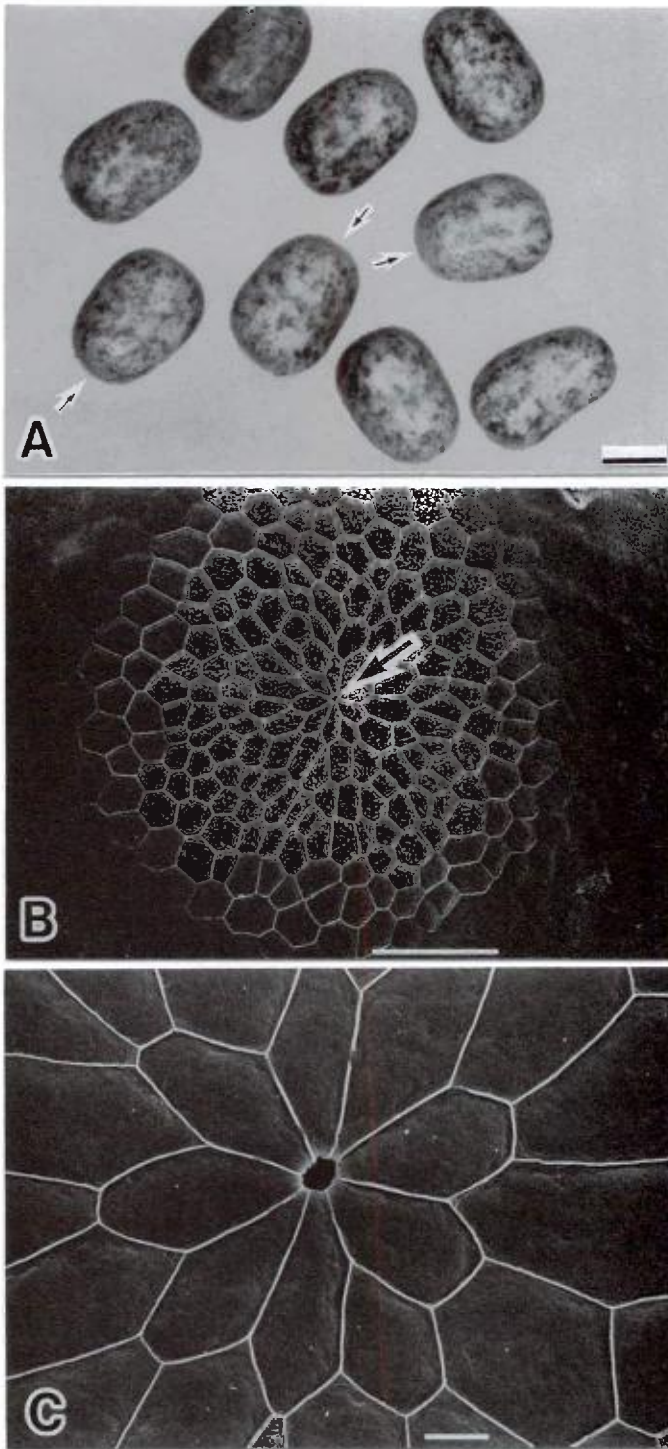


Fig. 1. Binocular view at the lateral flat sides of eggs (A) and SE micrographs of the surface morphology at the anterior pole region of the chorion (B and C). Arrow in A indicates the anterior pole region of each egg. Arrow in B points a micropylar opening.

C: enlarged prints at the micropylar opening and surrounding petal imprints. Scale bar = 1 mm, 100 μ m and 5 μ m in A, B and C, respectively.

Fig. 1. Vue binoculaire des côtés plats latéraux des oeufs (A) et micrographies au microscope électronique à balayage de la morphologie de la surface dans la zone du pôle antérieur du chorion (B et C). La flèche dans A indique la zone du pôle antérieur de chaque oeuf. La flèche dans B pointe vers une ouverture micropylaire.

C : agrandissements de l'ouverture micropylaire et empreintes en forme de pétale autour. Echelle = 1 mm, 100 μ m et 5 μ m respectivement dans A, B et C.

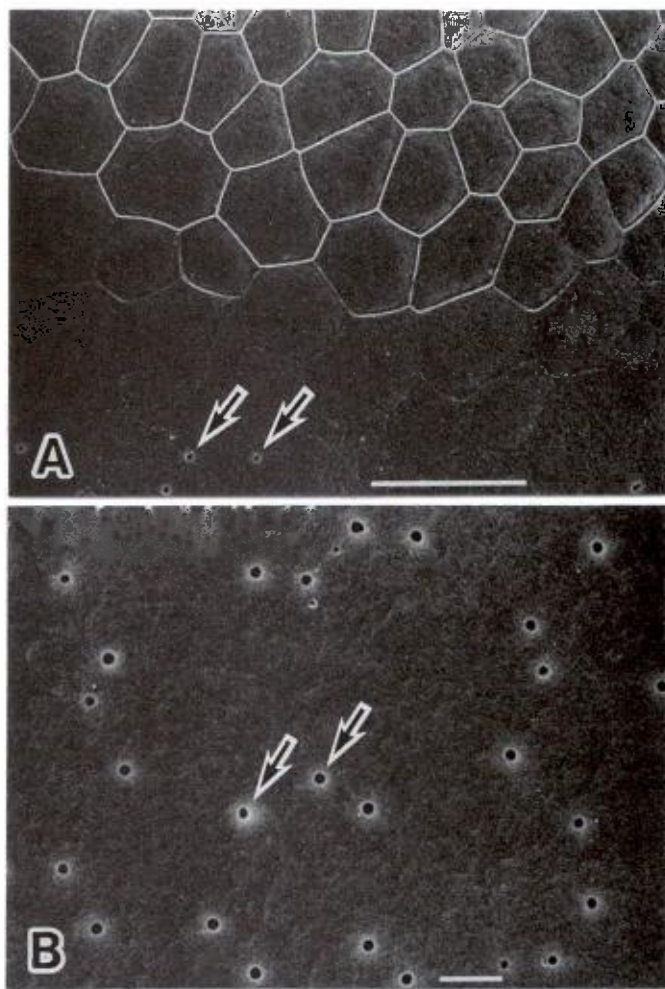


Fig. 2. SE micrographs for the morphology of egg surface. A, the anterior pole region (close to the micropylar area); B, the lateral flat side region. No polygonal imprints are seen. The posterior pole region and lateral marginal region are similar to the lateral flat side region (B) and figures are omitted. Arrows indicate aeropylar openings. Scale bar = 10 μ m.

Fig. 2. Micrographies au microscope électronique à balayage de la morphologie de la surface de l'oeuf. A : zone du pôle antérieur (proche de la zone micropylaire) ; B, la zone du côté plat latéral. On ne voit pas d'empreintes polygonales. La zone du pôle postérieur et la zone marginale latérale sont similaires à la zone du côté plat latéral (B) (les figures sont omises). Les flèches indiquent les ouvertures aéropylaires. Echelle = 10 μ m.

All surface regions except at the micropyle were fairly smooth, with numerous, minute wrinkles (Fig. 2A and B). Neither network patterns of imprints called polygons nor structures called knobs were observed at the areas surrounding the anterior pole, posterior pole, lateral flat and marginal regions; instead many large-type aeropyles (arrows in Fig. 2), whose diameter was about 2 μ m, were scattered. There are no differences between the lateral flat side and marginal regions, and the posterior pole region.

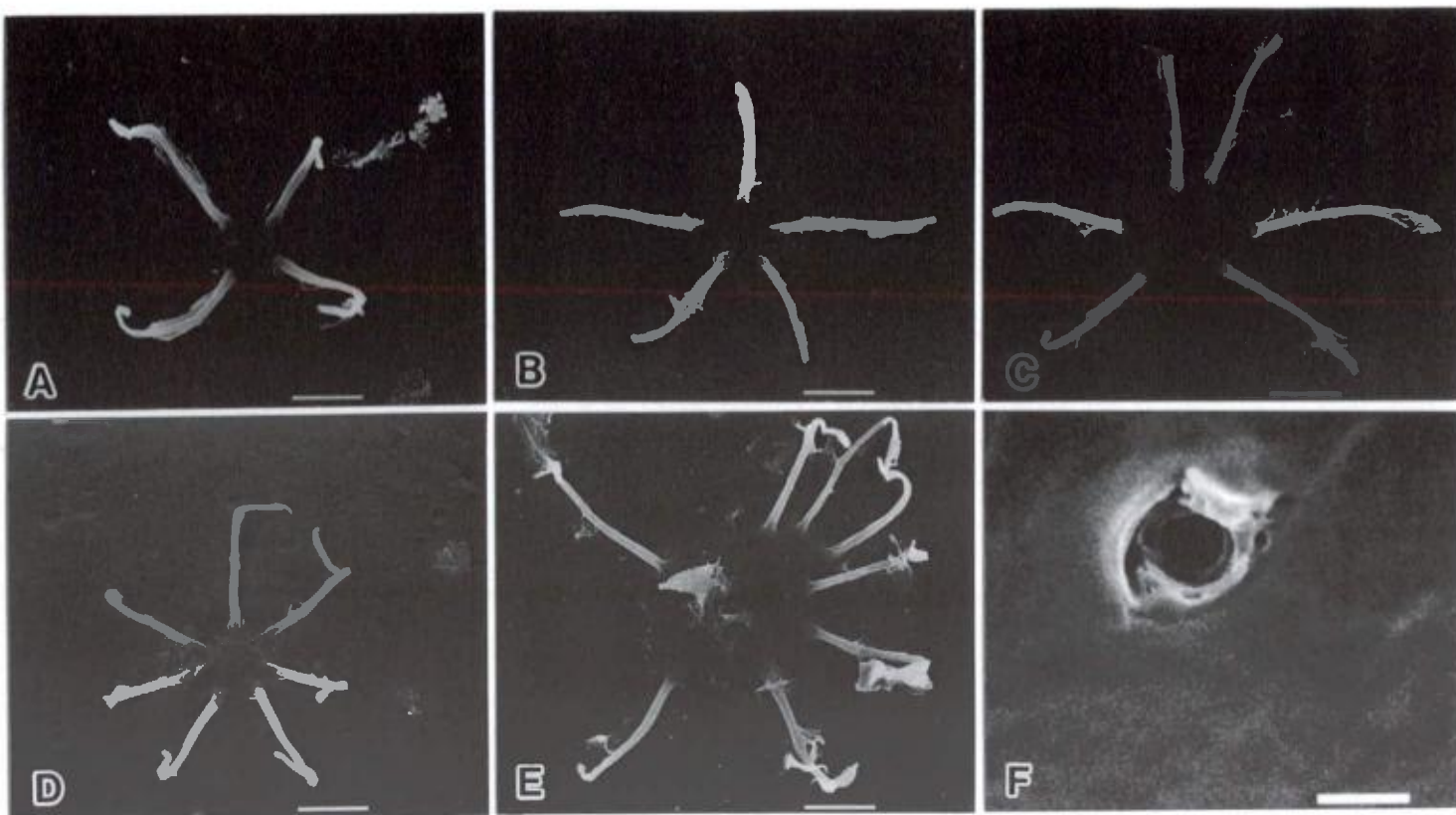


Fig. 3. SE micrographs of “sperm ducts” hanging from the inside surface at the anterior pole region of the chorion. Presumably connected with the external micropylar opening. The number of ducts varies from 4 (A) to 8 (E), from individual to individual. F, a sperm duct observed in a sectional specimen. Scale bar = 10 μ m in A to E and 1 μ m in F.

Fig. 3. Micrographies au microscope électronique à balayage des “canaux spermatiques” accrochés à la surface interne dans la zone du pôle antérieur du chorion, probablement reliés avec l’ouverture micropylaire externe. Le nombre de canaux varie de 4 (A) à 8 (E), d’un individu à l’autre. F : un canal spermatique observé sur un spécimen en coupe. Echelle = 10 μ m dans A et E et 1 μ m dans F.

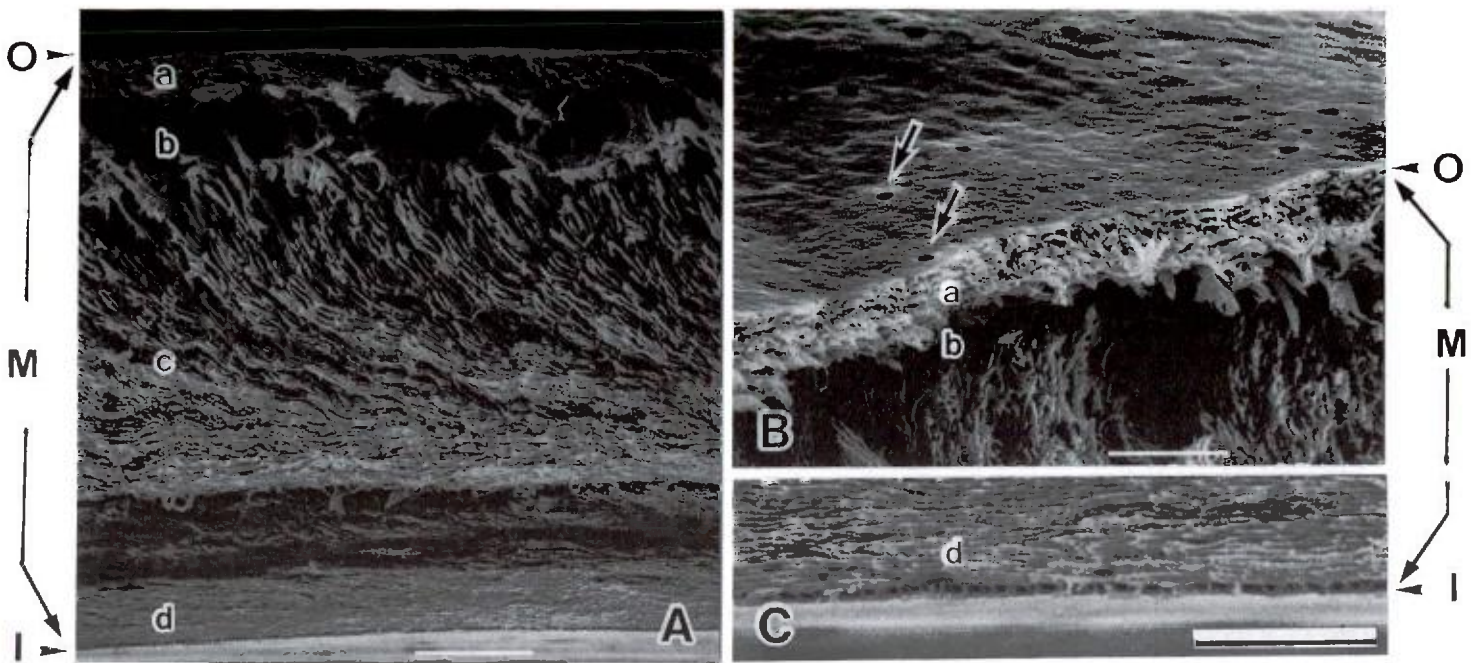


Fig. 4. SE micrographs of the cross-section and surface at the lateral flat region of the chorion. A, whole cross-section; B, outer surface and inside close to it; C, cross-section at the bottom. O, M and I denote the outer, middle and inner layers, respectively. The M layer could be subdivided into four zones: a, holey lamellae; b, large air space supported by perpendicular lamellae; c, oblique lamellae occupying most of the M layer; d, compact, horizontal lamellae close to the I layer. The holey structures and perpendicular lamellae of the a and b zones, respectively, are well observed in B. Arrows indicate aeropyles. The I layer is mono-trabecular, consisting of short pillars oriented perpendicularly to the oocyte surface. Scale bar = 10 μ m in A and B, and 5 μ m in C.

Fig. 4. Micrographies au microscope électronique à balayage de la coupe transversale et de la surface de la zone plate latérale du chorion. A : coupe transversale entière, B : surface externe et interne proches ; C, coupe transversale au bas. O, M et I indiquent respectivement les couches externe, médiane et interne. La couche M pourrait être subdivisée en quatre zones : a, lamelles trouées ; b : grand espace pour l'air soutenu par des lamelles perpendiculaires ; c, lamelles obliques occupant la plupart de la couche M ; d, lamelles horizontales, compactes proches de la couche I. On observe bien dans B, les structures trouées et les lamelles perpendiculaires des zones a et b, respectivement. Les flèches indiquent les aérotyles. La couche I est mono-trabéculaire, et constituée de piliers courts orientés perpendiculairement par rapport à la surface de l'ovocyte. Echelle = 10 μ m pour A et B et 5 μ m pour C.

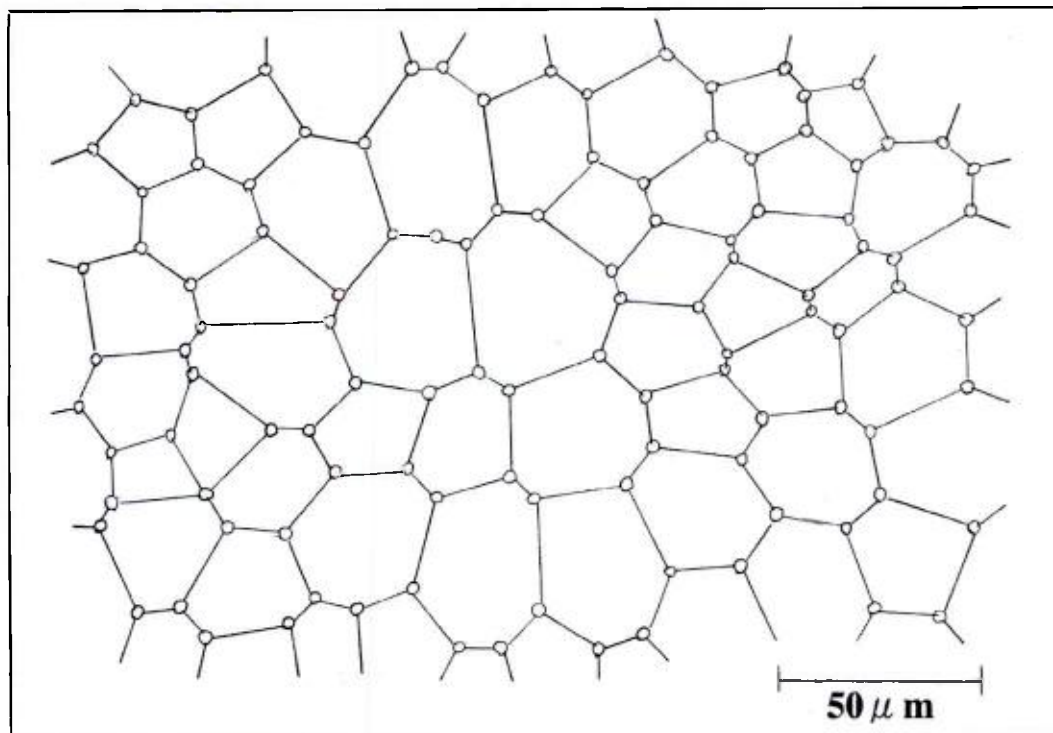


Fig. 5. Putative polygonal units drawn by joining the aeropyles on a photoprint. The resulting patterns are very similar to those of the polygonal network imprints reported for *B. mori* and *S. Cynthia ricini* (see text for refs.)

*Fig. 5. Unités polygonales putatives dessinées en joignant les aéroyles sur une photo imprimée. Les schémas qui en résultent sont très similaires à ceux du réseau d'empreintes polygonales rapportées chez *B. mori* et *S. Cynthia ricini* (voir le texte pour les références).*

Sperm ducts hanging from the inside surface of the chorion:

From the inside surface of chorion at the micropylar region, tubular channels called "sperm ducts" were hanging. Their number varied from four to eight among eggs (Fig. 3A to E). Their average length was $25.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$ and the inside diameter was $0.72 \pm 0.07 \mu\text{m}$ (Fig. 3F). It is highly likely that these ducts are connected with the external micropylar openings and allow the passage of sperms.

Cross-sectional morphology of the chorion:

Internal structures of the chorion at the lateral flat regions were visualized using cross-sectional specimens. These comprise three layers, outer, middle and inner, abbreviated as O, M and I, respectively (Fig. 4). The outermost O layer was thin and smooth, making a mono-stratum crust (Fig. 4A and B). Large aeropyles were present on the surface (arrows in Fig. 4B), where no polygons exist but minute wrinkles (Fig. 4B). The M layer occupies most of the chorion and could be further distinguished into four zones named a, b, c and d (Fig. 4). The a zone consists of spongy, distorted lamellae and is holey as seen in Fig. 4B. Then comes the b zone, an irregular and rough perpendicular lamellae making air space (Fig. 4A and B). The c zone is the thickest, with oblique layers of lamellae, whereas the d zone makes regularly oriented, compact lamellae (Fig. 4A and C). Finally, the

innermost, trabecular layer (I) is also very thin (Fig. 4A and C), consisting of small pillars oriented perpendicularly to the oocyte surface.

DISCUSSION

The surface of insect chorion has been recognized to have spatially differentiated regions. In the *A. polyphemus* egg, the aeropyle crown, flat side, meridional stripe and micropylar regions were characterized (Regier *et al.*, 1980; Mazur *et al.*, 1980). On the surface of the *B. mori* and *B. mandarina* eggs, there exist the micropyle in the anterior region, the polygonal unit areas in the lateral flat regions and the knobs in the dorsal, ventral and/or posterior regions (Ohtsuki *et al.*, 1977a, b; Kawaguchi *et al.*, 1993, 1996a, b, c). Also the *S. cynthia ricini* egg has the comparatively uniform polygonal network imprints except in the anterior region (Kawaguchi *et al.*, 2000). The aeropyle crown reported in *A. polyphemus* was not recognized in *B. mori* (Kawaguchi *et al.*, 1993), *B. mandarina* (Kawaguchi *et al.*, 1996b, c) and *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 2000). This is again not the case with *C. japonica japonica*, as far as observed in the present study. Highly characteristic of the *C. japonica japonica* egg surface structure was the fact that the polygonal network patterns and the knobs residing inside the polygons are completely lacking. *C. japonica japonica* was found to have large aeropyles, as *S. cynthia ricini* did (Kawaguchi *et al.*, 2000).

These lines of species-specificity in egg-surface morphology, in particular that related to the polygonal imprints, may be ascribed to some functional variation of the follicular epithelial cells, from which chorion proteins are secreted. Interestingly, putative polygonal units like those observable in other insects could be recognized in *C. japonica japonica*, when we draw lines from aeropyle to aeropyle using photoprints (Fig. 5). Although the artificially manifested unit patterns for the present species were somewhat more irregular in the shape of unit than the real ones in *B. mori*, *B. mandarina* and *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1996b, c, 2000), the average unit area was comparable to those of the three species (Table I).

The dimensions of chorion morphology measured here for *C. japonica japonica* are compared with those of *S. cynthia ricini*, *B. mori* and *B. mandarina* analyzed to date (Table I). Among the four insects, *C. japonica japonica* was the largest in egg size, but the smallest in number of petals surrounding the external micropyle. The rosette pattern surrounding the micropyle in *C. japonica japonica* was found to contain multiple (seven to eight) concentric lines of petals, and such large numbers of concentric lines have never found in *B. mori*, *B. mandarina* and *S. cynthia ricini*; in the latter three species, only one to four petal lines are seen (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1996b, c, 2000).

The sperm ducts dangling from the chorion inside surface observed in *C. japonica japonica* were very similar in overall features to those in *B. mori*, *B. mandarina* and *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1996b, c, 2000). The number of sperm ducts in the present species was larger than in *B. mori* and *B. mandarina*, but smaller than in *S. cynthia ricini*. On the other hand, the duct in *C. japonica japonica* was the longest among the four insects; this may be related to the fact that the egg size of this species was by far the largest among them (Table I).

In vertical sections of chorion, *C. japonica japonica* exhibited the three layers resembling those of *B. mori*, *B. mandarina* and *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1996b, c, 2000). The thinnest outermost layer of wild silkmoths like the present species and *S. cynthia ricini* must be sufficiently strong. Morphological features of the innermost layer were very common to all insects observed so far. It is worth noting that the massive M layer of the *C. japonica japonica* egg, subdivided into plural zones like that of *S. cynthia ricini*, exhibited the two lamellar structures with numerous holes and large air space, i.e., the a and b zones, respectively, shown in Fig. 4A and B. Such airy lamellar structures were not found in *S. cynthia ricini* (Kawaguchi *et al.*, 1993) but reminiscent of the large air space in *B. mandarina* (Sakaguchi *et al.*, 1990; Kawaguchi *et al.*, 1996b, c). These features, in addition to the large aeropyles in the present species and also in *S. cynthia ricini*, might be adequate to maintain gas exchange and adaptive to their outdoor style of life.

Table 1. Summarized traits of chorions in *C. japonica japonica*, *S. cynthia ricini*, *B. mori* and *B. mandarina*^a.**Tableau 1. Résumés des caractéristiques des chorions de *C. japonica japonica*, *S. cynthia ricini*, *B. mori* et *B. mandarina*^a.**

	<i>C. japonica japonica</i>	<i>S. cynthia ricini</i> ^b	<i>B. mori</i> ^b	<i>B. mandarina</i> ^b
Egg size / Taille de l'oeuf				
Major axis / Axe majeur (mm)	2.46 ± 0.10 [30]	1.83 ± 0.06 [30]	1.22 ± 0.03 [50]	1.21 ± 0.02 [50]
Minor axis / Axe mineur (mm)	1.67 ± 0.08 [30]	1.39 ± 0.10 [30]	0.98 ± 0.02 [50]	0.95 ± 0.01 [50]
Area of lateral flat region (mm ²)	3.68 ± 0.26 [30]	2.14 ± 0.10 [30]	1.10 ± 0.04 [50]	0.92 ± 0.20 [50]
Surface de la zone plate latérale (mm ²)				
Micropyle				
No. of petals close to the micropyle	6-9	12-20	8-13	9-11
Nbre de pétales proches du micropyle				
No. of concentric lines of petals	7-8	1-2	2-4	1-2
Nbre de lignes concentriques de pétales				
Polygonal network / Réseau polygonal				
Unit area (µm ²) ^c	607.7 ± 226.9	557.7 ± 46.3	673.2 ± 56.0	538.8 ± 48.9
Surface unitaire (µm ²) ^c	[120] ^d	[250]	[250]	[50]
Sperm duct / Canal spermatique				
Number / Nombre	4-8	6-10	2-6	2-5
Length (µm) / Longueur (µm)	25.3 ± 2.7 [30]	17.5 ± 2.2 [30]	14.1 ± 2.1 [50]	13.5 ± 1.5 [50]

^aAs far as possible, data are expressed in mean ± SD, with the No. of examined specimens in parentheses / Dans la mesure du possible, les données sont exprimées en tant que moyenne ± écart type avec le nombre de spécimens examinés entre parenthèses.

^bCited from Kawaguchi *et al.* (1993, 1996b, c, 2000). / D'après Kawaguchi *et coll.* (1993, 1996b, c, 2000).

^cPolygons in the lateral flat regions were subjected to the calculation; in *C. japonica japonica* (d), putative units (Fig. 5) were calculated, since polygonal network imprints were not observed (cf. Fig. 2). / Les polygones dans les zones plates latérales sont soumis au calcul : chez *C. japonica japonica* (d), les unités putatives (Fig. 5) sont calculées, puisqu'on n'observe pas d'empreintes du réseau polygonal (cf. Fig. 2).

As a whole, the findings described above, together with those reported previously, have uncovered inter- and intraspecific variation of chorion structures in several lepidopterans, although the basic constructions of chorion, in particular those related to micropyle, acropyle and internal lamellar structures composed of three layers, are confirmed to be common. The present article may serve as a step of more systematic comparisons of chorion morphology with special reference to the ecophysiological significance of species in the Lepidoptera.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (Nos. 10460026 and 14656024), and for the National Bioresource Project, from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- AKAI H. (1957) Studies on the electron microscopic structure of the egg shell in *Bombyx mori* L. (I). J. Seric. Sci. Jpn. 26: 335-340.
- AKAI H. (1976) Surface structure of insects. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 139.
- HINTON H.E. (1970) Insect eggshells. Sci. Amer. 22: 84-91.
- KAFATOS, F.C., REGIER J.C., MAZUR G.D., NADEL M.R., BLAU H.M., PETRI W.H., WYMAN A.R., GELINAS R.E., MOORE P.B., PAUL M., EFSTRATIADIS A., VOURNAKIS J.M., GOLDSMITH M.R., HUNSLEY J.R., BAKER B., NARDI M., KOEHLER M. (1977) The eggshell of insects: differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. In Results and Problems in Cell Differentiation, Vol. 8 (W. Beermann, ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 45-145.
- KANDA T., MATSUMURA H., OHTSUKI Y. (1974) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) egg. I. Fine structure of micropylar apparatus. J. Seric. Sci. Jpn. 43: 379-383.
- KATSUNO S. (1984a) Size of polygonal patterns of the egg-shell and facets of the compound eye in the tetraploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 53: 1-6.
- KATSUNO S. (1984b) Surface structure of the egg-shell in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 53: 97-107.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H. (1996a) Changes of yolk and haemolymph proteins during ovarian development in the miniature egg mutant, *emi*, of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 65: 13-20.
- KAWAGUCHI Y., ICHIDA M., KUSAKABE T., KOGA K. (2000) Chorion morphology of the Eri-silk, *Samia cynthia ricini* (Donovan) (Lepidoptera: Saturniidae). Appl. Entomol. Zool., 35: 427-434.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUJII H. (1993) Polygonal patterns on eggshells of giant egg mutant and large eggs induced by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 39: 437-443.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., KAWARABATA T., DOIRA H. (1996c) Comparison of the chorion structure of eggs from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae) and their first filial generation. Appl. Entomol. Zool. 31: 407-415.
- KAWAGUCHI Y., M.-K. XU, BANNO Y., KOGA K., KAWARABATA T., DOIRA H. (1996b) Eggshell architecture in the wild silkmoth, *Bombyx mandarina*, inhabiting China. Sericologia, 36: 609-618.
- KAWAMURA N. & NAKADA T. (1981) Studies on the increase in egg size in tetraploid silkworms induced from a normal and a giant egg strains. Jpn. J. Genet. 56: 249-256.
- KAWASAKI H. & SATO H. (1985) The tanning agent in the silk of the Japanese giant silkmoth, *Dictyoploca japonica* Bteler. Insect Biochem. 15: 681-684.
- KOYAMA N. & MIYATA W. (1980) Wild silkmoths in Japan. In Structural Basis of Silk Fibre (N. Hojo ed.). Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, pp. 19-34.
- KUBO Y., OKAZAKI S., ANZAI T., FUJIWARA H. (2001) Structural and phylogenetic analysis of TRAS, Telomeric repeat-specific non-LTR retrotransposon families in lepidopteran insects. Mol. Biol. Evol., 18: 848-857.
- MARGARITIS L.H. (1985) Structure and physiology of the eggshell. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 1 (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 153-230.
- MAZUR G.D., REGIER J.C., KAFATOS F.C. (1980) The silkmoth chorion: Morphogenesis of surface structures and its relation to synthesis of specific protein. Develop. Biol. 76: 305-321.
- MAZUR G.D., REGIER J.C., KAFATOS F.C. (1982) Order and defects in the silkworm chorion, a biological analogue of a cholesterol liquid crystal. In Insect Ultrastructure (R.C. King and H. Akai eds.). Vol. 1, Plenum Pub. Corp., New York, pp. 150-185.
- MAZUR G.D., REGIER J.C., KAFATOS F.C. (1989) Morphogenesis of silkmoth chorion: Sequential modification of an early helicoidal framework through expansion and densification. Tissue Cell. 2: 227-42.

- NADEL M.R. & KAFATOS F.C. (1980) Specific protein synthesis in cellular differentiation. IV. The chorion formation of *Bombyx mori* and their program of synthesis. *Develop. Biol.*, 75: 26-40.
- NAGASE A. & MASAKI S. (1991) Terminal photoperiodic responses in aestivating pupae of *Dictyoploca japonica* (Lepidoptera: Saturniidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 26: 387-396.
- NHO S.K. (1990) Chorion gene expression in the cellular differentiation and accumulation of chorion protein of silkworm, *Bombyx mandarina*. I. Specific structure of egg-shell and chorion protein. *Korean J. Appl. Entomol.* 29: 157-164.
- OHTSUKI Y. & KANDA T. (1978) Characteristic structure of egg shell in the collapsing egg strain of the silkworm. *J. Seric. Sci. Jpn.* 47: 215-220.
- OHTSUKI Y., KANDA T., MATSUMURA H. (1977a) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*). II. Characteristics of different areas of egg surface. *J. Seric. Sci. Jpn.* 46: 45-50.
- OHTSUKI Y., KITAZAWA T., KANDA T. (1977b) *In vitro* formation of egg shell in the silkworm (*Bombyx mori*). *Zool. Mag.* 86: 168-173.
- OMURA S. & KATAOKA T. (1943) Shape, sizes and their formation of the surface pattern of the egg-shell in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 14: 263-275.
- REGIER J.C. & KAFATOS F.C. (1985) Molecular aspects of chorion formation. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 1 (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 113-151.
- REGIER J.C., MAZUR G.D., KAFATOS F.C. (1980) The silkworm chorion: Morphological and biochemical characterization of four surface regions. *Develop. Biol.* 76: 286-304.
- REGIER J.C., MAZUR G.D., KAFATOS F.C., PAUL M. (1982) Morphogenesis of silkworm chorion: Initial framework formation and its relation to synthesis of specific proteins. *Develop. Biol.* 92: 159-174.
- SAKAGUCHI B., CHIKUSHI H., DOIRA H. (1973) Observation of the eggshell structures controlled by gene action in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 18: 53-62.
- SAKAGUCHI B., SUGAHARA K., NINAKI O., GOLDSMITH M.R., KAWAGUCHI Y., KOGA K. (1998) Analysis of chorion proteins of *Bombyx mandarina* in comparison with those of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 67: 197-203.
- SAKAGUCHI B., SUGAHARA K., NAKAJIMA Y., KOGA K., NINAKA O., SUGIMOTO Y., GOLDSMITH M. R., MAZUR G. D., KAFATOS F. C. (1990) Expression of chorion multigene families of *Bombyx mandarina* in comparison with those of *Bombyx mori*. In *Advances in Invertebrate Reproduction*, (M. Hoshi and O. Yamashita eds.). Vol. 5, Elsevier, Amsterdam, pp. 517-522.
- SHIMADA T., KOBAYASHI J., MIYATA T., NAGATA N., KOBAYASHI M. (1992) Comparison of arylphorins among species belonging to Saturniidae and Bombycidae (Lepidoptera) by immunodiffusion analyses. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, 36: 119-125.
- SMITH D.S., TELFER W.H., NAVILLE A.C. (1971) Fine structure of the chorion of a moth, *Hyalophora cecropia*. *Tissue Cell* 3: 477-498.

ARCHITECTURE DU CHORION CHEZ LE PAPILLON A SOIE GEANT JAPONAIS, *CALIGULA JAPONICA JAPONICA* MOORE

Y. KAWAGUCHI^{1*}, M. ICHIDA², T. KUSAKABE¹ & K. KOGA¹

1. Laboratory of Silkworm Science, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japon.

2. Experimental Farm, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-0962, Japon.

Nous avons observé la surface, les sections et les autres structures du chorion de *Caligula japonica japonica* principalement par microscopie électronique à balayage. Il y a une ouverture micropylaire entourée par les lignes multiples d'empreintes cellulaires en forme de pétales qui forment une grande rosace dans la zone du pôle antérieur. La zone du pôle antérieur présente entre quatre et huit "canaux spermatiques" qui sont accrochés à la surface interne du chorion. Toutes les zones de surface sauf la zone micropylaire sont comparativement lisses mais avec de fines rides. On ne voit ni de réseaux polygonaux ni de protubérances. Un grand nombre d'aéropyles énormes sont situés dans les zones latérales, plates et marginales du pôle postérieur mais pas dans la zone du pôle antérieur. Les coupes du chorion révèlent trois couches : une couche externe, moyenne et interne. La couche interne est constituée de petites colonnes orientées de manière perpendiculaire par rapport à la surface de l'ovocyte. La couche externe est très fine et fait une petite croûte lisse. La zone médiane qui est la plus épaisse se divise à nouveau en quatre zones : la zone a est trouée, b a un volume important pour l'air, c est la plus épaisse avec des lamelles obliques et d a des lamelles orientées de manière régulière. Ces structures avec les grands aéropyles décrits ci-dessus pourraient faciliter l'échange de gaz et semblent être adaptées à un habitat sauvage.

INTRODUCTION

Le chorion de l'insecte a une architecture très ordonnée constituée d'un grand nombre de protéines du chorion. Ces protéines sont produites par les cellules épithéliales folliculaires, qui sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion des protéines du chorion quand elles sont engagées dans la choriogénèse (Kafatos et coll., 1977 ; Regier et Kafatos 1985). Les structures du chorion, en particulier l'appareil micropylaire, les nombreux aéropyles, les couches externes dures et les couches internes trouées (Hinton, 1970 ; Margaritis, 1985) permettent des fonctions compliquées telles que l'entrée du sperme, l'échange de gaz, la protection contre les risques environnementaux et le maintien de l'eau. Les caractéristiques morphologiques du chorion, y compris les empreintes polygonales externes en réseau et les structures des couches internes des insectes lépidoptères ont surtout été observées chez *Bombyx mori* (Omura et Kataoka, 1973 ; Akai, 1957, 1976 ; Sakaguchi et coll., 1973 ; Kanda et coll., 1974 ; Ohtsuki et coll., 1977a, b ; Ohtsuki et Kanda, 1978 ; Nadel et Kafatos, 1980 ; Katsuno, 1984a, b ; Kawaguchi et coll., 1993), *Bombyx mandarina* (Omura et Kataoka, 1943 ; Nho, 1990 ; Sakaguchi et coll., 1990, 1998 ; Kawaguchi et coll., 1996b, c), *Antheraea polyphemus* (Mazur

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

et coll., 1980, 1982, 1989 ; Regier et coll., 1982), *Hyalophora cecropia* (Smith et coll., 1971) et *Samia cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 2000).

On sait que le papillon à soie géant japonais, *Caligula japonica japonica* Moore [Lepidoptera : Saturniidae], qui habite le Japon est connu pour son crin de Florence, qui est constitué des glandes séricigènes provenant de sa larve nommée " Shiraga-taroh ". Le fil est aussi produit par son cocon, appelé " Sukashidawara " (Koyama et Miyata, 1980). Bien qu'on n'élève pas cet insecte de manière artificielle au Japon pour la production de soie sauvage, il a souvent servi comme outil expérimental par exemple pour la biochimie de la phénol oxydase ou de la tyrosinase et pour les protéines de l'hémolymphe (Kawasaki et Sato, 1985 ; Shimada et coll., 1992), la physiologie du photopériodisme de l'estivation (Nagase et Masaki, 1991) et la biologie moléculaire des répétitions télomériques (Kubo et coll., 2001).

Dans cette étude, nous avons observé les structures de la surface du chorion de *C. japonica japonica*, principalement en utilisant la microscopie électronique à balayage (SE). Il y a une singularité morphologique des coupes et des structures de surfaces des zones plates latérales du chorion par comparaison aux caractéristiques qui ont été rapportés précédemment chez *B. mori* (Kawaguchi et coll., 1993), *B. mandarina* (Kawaguchi et coll., 1996b, c) et *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 2000).

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

Les cocons de *C. japonica japonica* sont recueillis sur les arbres d'adiante et les châtaigniers aux alentours de Mimasaka dans la Préfecture d'Okayama. Les nymphes sont conservées jusqu'à l'émergence, peu après l'émergence les papillons femelles sont disposés dans un grand sac en papier et on les laisse pondre leurs œufs non fécondés, qui sont lavés avec soin avec de l'eau distillée en utilisant un traitement à ultrasons et séchés à l'air. Toutes les procédures de laboratoire sont réalisées à 25° C.

Observation morphologique du chorion :

Les œufs entiers sont fixés dans du liquide de Carnoy pendant 4 à 5 jours à 0° C et on observe la structure de la surface du chorion soit avec un microscope binoculaire soit avec un microscope électronique à balayage (JSM 2500 à 15 kV). Alternativement, on déchire un chorion avec une pince d'horloger dans de l'eau distillée, on le déshydrate dans une série graduée d'éthanol, on le lyophilise avec de l'alcool *ter*-butyl, on le monte sur des montants en aluminium avec du ruban carbone à double face, on le saupoudre avec de l'or et on observe les structures en coupe du chorion par microscopie électronique à balayage. Les dimensions des œufs, c'est à dire les longueurs des axes majeur et mineur, la superficie de la surface, la longueur et le diamètre interne du canal spermatique et la surface des unités polygonales putatives sont mesurées en utilisant les photographies d'après les descriptions précédentes (Kawamura et Nakada, 1981 ; Kawaguchi et coll., 1996a). Chaque valeur représente la moyenne pour 30 œufs provenant de lots d'œufs pondus par trois papillons (10 œufs par lot).

RESULTATS

Forme, dimensions et structures de la surface des œufs :

L'œuf de *C. japonica japonica* est arrondi et cylindrique et plus étroit dans la zone du pôle antérieur que dans la zone postérieure (flèches dans la Fig. 1a). Il est opaque et blanc avec des points marron imprimés sur toute la surface externe, ce qui rend son apparence très similaire à celle de l'œuf de caille. Les longueurs des axes majeur et mineur sont de respectivement $2,46 \pm 0,10$ et de $1,67 \pm 0,08$ mm et la surface de la zone latérale fait $3,68 \pm 0,26$ mm² (moyenne $\pm$ écart type, N = 30). Il y a un micropyle dans la zone du pôle antérieur. Il a une ouverture externe unique (flèche dans la Fig. 1B).

entourée par des empreintes formant une rosette avec sept à huit rangées de pétales concentriques. Six à neuf pétales entourent directement le micropyle, soit une moyenne de $7,7 \pm 0,8$ par œuf d'un seul papillon. On ne voit pas d'aéropyle sur ces pétales. À l'intérieur du micropyle, il y a plusieurs ouvertures (invisibles dans la Fig. 1C) qui pourraient servir d'entrées pour le sperme.

Toutes les zones de surface sauf celles du micropyle sont assez lisses avec de nombreuses petites rides (Fig. 2A et B). On n'observe ni de dessins en réseau des empreintes appelées polygones ni de structures appelées protubérances dans les zones entourant le pôle antérieur, le pôle postérieur, les zones plates latérales et marginales ; à la place de nombreux aéropytes de grande taille (flèches dans la Fig. 2) dont le diamètre est d'environ $2\mu\text{m}$, sont éparpillés. Il n'y a pas de différence entre le côté plat latéral et les zones marginales et la zone du pôle postérieur.

Canaux spermatiques accrochés à la surface interne du chorion :

Dans la zone micropylaire, des canaux tubulaires appelés "canaux spermatiques" sont accrochés à partir de la surface interne du chorion. Leur nombre varie de quatre à huit dans les œufs (Fig. 3A à E). Leur longueur moyenne est de $25,3 \pm 2,7\mu\text{m}$ et leur diamètre interne est de $0,72 \pm 0,07\mu\text{m}$ (Fig. 3F). Il est très probable que ces canaux sont reliés aux ouvertures micropylaires externes et permettent le passage du sperme.

Morphologie en coupe du chorion :

Les structures internes du chorion dans les zones plates latérales sont visualisées en utilisant des spécimens en coupe. Elles comprennent trois couches, une couche externe, médiane et interne, que l'on dénomme respectivement O, M et I (Fig. 4). La couche la plus externe O est fine et lisse, et forme une croûte unique (Fig. 4A et B). De grands aéropytes sont présents sur la surface (flèches dans Fig. 4B) où il n'existe pas de polygones mais des rides très fines (Fig. 4B). La couche M occupe la plus grande partie du chorion et on peut à nouveau la diviser en quatre zones nommées a, b, c et d (Fig. 4). La zone a est constituée de lamelles spongieuses, déformées et est trouée comme on le voit dans la Fig. 4B. Puis, la zone b constituée de lamelles perpendiculaires irrégulières et rugueuses qui font de l'espace pour l'air (Fig. 4A et B). La zone c est la plus épaisse, avec des couches de lamelles obliques, tandis que la zone d a des lamelles compactes, régulièrement orientées (Fig. 4A et C). Finalement, la couche trabéculaire la plus interne (I) est aussi très fine (Fig. 4A et C) et est constituée de petits piliers orientés perpendiculairement par rapport à la surface de l'ovocyte.

DISCUSSION

La surface du chorion de l'insecte a des zones différenciées dans l'espace. Dans l'œuf de *A. polyphemus*, on a décrit les caractères de la couronne aéropylaire, du côté plat de la bande méridienne et les zones micropylaires (Regier et coll., 1980 ; Mazur et coll., 1980). À la surface des œufs de *B. mori* et de *B. mandarina*, il existe un micropyle dans la zone antérieure, des surfaces unitaires polygonales dans les zones plates latérales et des protubérances dans les zones dorsale, ventrale et / ou postérieure (Ohtsuki et coll., 1977a, b ; Kawaguchi et coll., 1993, 1996a, b, c). L'œuf de *S. cynthia ricini* a un réseau d'empreintes polygonales comparativement uniforme sauf dans la zone antérieure (Kawaguchi et coll. 2000). On ne reconnaît pas la couronne aéropylaire rapportée chez *A. polyphemus* chez *B. mori* (Kawaguchi et coll., 1993), *B. mandarina* (Kawaguchi et coll., 1996b, c) et *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 2000). Cela n'est pas le cas non plus chez *C. japonica japonica*, comme on peut l'observer dans cette étude. La surface de l'œuf de *C. japonica japonica* est caractérisée par une absence complète du réseau de dessins polygonaux et de protubérances à l'intérieur des polygones. *C. japonica japonica* présente de grands aéropytes comme *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 2000).

Ces traits spécifiques de l'espèce pourraient être le résultat d'une variation fonctionnelle des cellules épithéliales folliculaires à partir desquelles les protéines du chorion sont sécrétées. De

manière intéressante, on reconnaît les unités polygonales putatives que l'on observe chez d'autres insectes chez *C. japonica japonica*, quand on tire des lignes d'un aécopyle à l'autre en utilisant des photos (Fig. 5). Bien que les dessins unitaires obtenus artificiellement aient une forme quelque peu plus irrégulière que les vrais chez *B. mori*, *B. mandarina* et *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 1993, 1996b, c, 2000), la surface unitaire moyenne est comparable à celle de ces trois espèces (Tableau I).

On compare les dimensions pour la morphologie du chorion mesurées ici chez *C. japonica japonica* avec les analyses réalisées jusqu'à présent sur *S. cynthia ricini*, *B. mori* et *B. mandarina* (Tableau I). Des quatre insectes, l'œuf de *C. japonica japonica* est le plus grand en taille mais a le plus petit nombre de pétales entourant le micropyle externe. Le schéma en rosette entourant le micropyle de *C. japonica japonica* s'avère contenir de multiples rangées (sept à huit) concentriques de pétales et on n'a jamais trouvé un nombre aussi important de rangées concentriques chez *B. mori*, *B. mandarina* et *S. cynthia ricini* ; chez ces trois dernières espèces, il n'y a qu'une à quatre rangées de pétales (Kawaguchi et coll., 1993, 1996b, c, 2000).

Les canaux spermatiques accrochés à la surface interne du chorion observés chez *C. japonica japonica* sont très similaires en tous points à ceux de *B. mori*, *B. mandarina* et *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 1993, 1996b, c, 2000). Le nombre de canaux spermatiques chez cette espèce est plus important que chez *B. mori* et *B. mandarina* mais moins important que chez *S. cynthia ricini*. D'autre part, le canal de *C. japonica japonica* est le plus long des quatre insectes ; cela pourrait être lié au fait que la taille de l'œuf de cette espèce est de loin la plus grande (Tableau I).

Dans les coupes verticales du chorion, *C. japonica japonica* présente les trois couches qui ressemblent à celles de *B. mori*, *B. mandarina* et *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 1993, 1996b, c, 2000). La couche externe la plus fine chez les papillons à soie sauvages comme chez l'espèce étudiée et chez *S. cynthia ricini* doit être suffisamment solide. Les caractéristiques morphologiques de la couche la plus interne sont communes à tous les insectes observés jusqu'à présent. Cela vaut la peine de noter que la couche massive M de l'œuf de *C. japonica japonica*, subdivisée en plusieurs zones comme chez *S. cynthia ricini*, présente deux structures lamellaires aux trous nombreux et un grand espace pour l'air, c'est à dire respectivement les zones a et b, présentées dans la Fig. 4A et B. On ne trouve pas de telles structures lamellaires légères chez *S. cynthia ricini* (Kawaguchi et coll., 1993) mais elles rappellent le grand espace pour l'air de *B. mandarina* (Sakaguchi et coll., 1990 ; Kawaguchi et coll., 1996b, c). Ces caractéristiques, comme les grands aécopyles de l'espèce étudiée et de *S. cynthia ricini*, pourraient être conçues pour maintenir l'échange de gaz et pour leur adaptation au style à la vie à l'extérieur. Dans l'ensemble, les observations décrites ci-dessus et celles rapportées précédemment, ont mis à jour une variation inter et intra spécifique des structures du chorion chez plusieurs lépidoptères bien que l'on sache que les constructions de base du chorion, en particulier celles liées au micropyle, à l'aécopyle et aux structures lamellaires internes composées de trois couches, soient courantes. Cet article pourrait servir de base pour des comparaisons plus systématiques de la morphologie du chorion en particulier pour comprendre la signification écophysologique chez les espèces de Lépidoptères.

DEVELOPMENTAL CHANGES IN SURFACE ARCHITECTURE AND SOME INORGANIC COMPONENTS IN THE MUGA SILK MOTH (*ANTHRAEA ASSAMA*) Ww., LEPIDOPTERA : SATURNIDAE) EGGSHELL (CHORION)

SUDIP DEY^{*1}, R. N. K. HOOROO², A. RAGHUVARMAN², N. BISWAS³ & P. S. DKHAR

1. Electron Microscope Laboratory, Regional Sophisticated Instrumentation Center, North Eastern Hill University, Shillong – 793003, India.
2. Department of Zoology, North Eastern Hill University, Shillong 793022, India.
3. Central Silk Board Research Extension Centre, Diphu – 782460, India.
4. Atomic Absorption Spectroscopy Laboratory, RSIC, North Eastern Hill University, Shillong – 793003, India.

Developmental changes in surface architecture of the muga silk moth (Antheraea assama) egg shell and the kinetics of some inorganic components of the chorion, from the time of egg laying to pre-hatching are described. Scanning electron microscopy revealed alternate regular and disturbed arrangements of air space and chorionic plate upto 120 hours after egg laying, but disturbed arrangements alone, were exhibited from 120 hour stage onwards until hatching. Significant changes in the concentration of several elements, i.e. calcium, zinc, magnesium, iron, copper, cobalt and nickel in the chorion during the development of egg was evident, indicating the importance of these elements in functioning of chorion and developmental physiology of underlying serosa and the embryo.

Keywords : Muga, *Antheraea assama*, chorion, elements, SEM.

INTRODUCTION

The silk moth, *Antheraea assama* is a species of genus *Antheraea*, whose distribution is restricted to Assam, a province in the north-eastern part of India. Apart from the unique nature of the silk produced by the insect, general morphology, fine structures of some tissues, behaviour and physiology are known to be different from other related species (Dey *et al.*, 1997; Hazarika and Bordoloi, 1998; Dey, 1999; Dey *et al.*, 1999). Although a few reports exist on unique structure-function relation on some vital organs of the silkworm e. g. sensory system (Dey *et al.*, 1997; Hazarika and Bordoloi, 1998 ; Dey *et al.*, 2000), digestive system (Dey *et al.*, 1999) etc, the same is not available for the reproductive structure. The eggshell or chorion, a complex extracellular proteinaceous formation, has been studied extensively from ultra-structural and morphogenesis point of view in many silk moth species, except the muga silk moth (Hamodrakas *et al.*, 1983; Hamodrakas, 1984; Hamodrakas *et al.*, 1984). Numerous scanning and transmission electron microscopic studies on insect eggs exhibited bewildering variations in the external surface structure of the chorion, which revealed diagnostic characteristic useful in assessing phylogenetic relationship, and also have provided us with a precise understanding of the mechanism of fertilisation (Hinton, 1981; Mazzini and Gaino, 1985; Fehrenbach *et al.*, 1987; Marchiondo, 1980).

* To whom correspondence should be made.

The chorion of the egg serves a protective function and also plays an important role in respiration of the developing embryo.

Although extensive studies have been carried out on protein components of eggshell or chorion, very little is known on other chemical constituent of this complex structure (Hinton, 1981). As far as the inorganic components are concerned, it has been reported that the chorion of some specialised Lepidoptera (Saturniidae, Bombycidae) contains a large amount of sulphur and stabilises the protein by di-sulphide bonds. Some of the chorionic proteins are reported to be stabilized by phosphate ester bridges or phosphate-calcium-phosphate bridges because of the presence of phosphoserine (Hinton, 1981). However, importance of other elements in structural stabilisation of chorion has not been studied in detail. Further, studies on the possibilities of involvement of element in thermal, optical and electrical phenomena of chorion which are directly associated with functioning of growing embryo does not exist in literature.

The aim of the present study, are (i) to examine the surface architecture of the muga silk moth chorion to understand its uniqueness, if any, as compared to other related species; (ii) to determine the dynamics of surface features and some inorganic components in relation to embryonic development during the time between egg-laying and hatching.

MATERIAL AND METHODS

Sample preparation:

The female muga moths, *Antheraea assama*, after coupling, were obtained from a commercial muga silk farm and were brought to the laboratory for oviposition. The eggs were collected after every 6 hours from laying until hatching and were prepared for Scanning Electron Microscopy and Atomic Absorption Spectroscopy as follows.

Scanning Electron Microscopy:

For Scanning Electron Microscopical studies, the eggs were washed with distilled water and air dried, as described by Hinton (1981). The samples were mounted to the specimen brass stub (10 mm diameter × 30 mm high) using double coated adhesive tape, connected via a patch of silver paint to ensure charge conduction, taking care to avoid any trapped air bubble. A thin conductive coating of gold was applied to the sample using JFC 1100 (Jeol) ion sputter, at a relatively low vacuum of 10^{-3} torr on the sputtering chamber. The coated samples were examined with the help of a JSM-35 CF (Jeol) Scanning Electron Microscope operated at 15KV.

The tilt control was fixed at 0° for setting the specimen stage in a horizontal position, the WD selector was used to set the working distance (WD) to 15mm.

Atomic Absorption Spectroscopy:

The egg shell (chorion) samples for Atomic Absorption Spectroscopy were separated from serosa and underlying embryo following the method suggested by Hamodrakas *et al.*, (1984) for Laser-Raman spectroscopical studies. The eggs were cut in half with fine scissors and washed several times in de-ionized distilled water to remove the developing embryo and the under lying serosa. The insoluble chorions were washed in 95% and 100% ethanol followed by de-ionized distilled water. Aldehydes were used to leach out diffusable elements (Morgan, 1980) so that only those elements, which form structural components of the chorion are retained. Aldehyde treatment was followed with repetitive wash in de-ionized water and air-drying. 0.5 g of chorion samples were treated with few drops of hydrogen peroxide, kept overnight and evaporated to dryness; 0.5 ml of perchloric acid was added to it and heated to dryness. The process was repeated 2-3 times; 2-3 ml of HCl was added to the sample and the solution was diluted with distilled water to 25ml. The elemental analysis was carried out in the Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin-Elmer, 2380.

RESULTS AND DISCUSSION

1. General feature of the chorionic surface:

Aeropyles of *Antheraea assama* consist of a large numbers of oval or round spaces or concavities, about 35μ in diameter which are surrounded by 5-6 round plates ($\sim 15\mu$), arranged in a regular fashion. Each of the round chorionic plates exhibits some crenations at its inner border (Figs. 1, 2). The adjacent chorionic plates oriented in a circular fashion surrounding the cavity are found to establish a connection with each other through rod like structures, around 5μ long and 1μ broad. The arrangement of round plates surrounding the concavity has some similarities with that of another species of the genus *Antheraea*, i.e., *Antheraea yamamai* Guer., as described by Hinton (1981). However, the concavity in *A. yamamai*, was found to be deeper as compared to that in muga silk moth, *Antheraea assama*, where the round plates and the concavity are more or less in the same plane. Further, the continuity between the adjacent plates, established through rod like structure in *A. assama* was not observed in *A. yamamai* described by Hinton (1981). Similarly, although there is a resemblance in organization of chorionic plates between *A. assama* and *A. pernyi*, there are some basic differences too. The crenations in the inner border of the plates in *A. pernyi* are much more elongated and pronounced as compared to those of *A. assama*. Besides these, inter-plate rod-like connections characteristics of muga silk moth chorion is absent in the chorion of *Antheraea pernyi*. The concavity in *A. pernyi*, like that of *A. yamamai* is deep and, not nearly co-planar as in *A. assama*. Although the exact nature of the role of the characteristic features of *A. assama* chorion is yet to be resolved, the intra-plate connections and nearly co-planar arrangement of the concavities and the plates appear to be significant. These architectural features of the chorionic surface of *A. assama* which are different from those of the other species of *Antheraea*, are, likely to increase the sensitivity of chorion to air and other abiotic factors, because the plates are interconnected and they exist in more or less same plane as the concavities. This implies that changes in temperature, humidity and light conditions will have a larger impact on the muga silk moth chorion due to the inter-plate connections, as compared to other species where the plates are not inter-connected, making the effects less wide spread. However, experimental evidences are required to substantiate the theoretical assumption, before any conclusion is drawn in this regard.

2. Developmental changes in chorionic architecture:

Scanning electron microscopy of chorionic surface during development of egg from laying to hatching reveals significant difference in surface architecture. Twelve hours after laying, most of the portions of the chorionic surface shows drastic changes in orientation of plates, characterized by irregularities in their distribution, shrinkage and mild disruption of the plates and partial or total loss of demarcating lines of the concavities (Figs 3, 4; Table I.) This continues until 48-h stages of egg development. At 48 hour stage, the orientation changes again, and the chorionic surface shows regular arrangement of chorionic plates, and definite demarcating lines of the concavities (Figs 5, 6; Table I). At 72 hour stage, disorganisation of chorionic plates takes place followed by the loss of their demarcation lines (Figs. 7, 8 ; Table I). At 96 hour stage on the other hand, the chorionic surface shows regular arrangements of the plates and reappearance of demarcating lines of the concavities (Table I.) From 120-hour stage onwards, however, the irregularities in arrangement of the plates and loss of demarcating lines of the concavities take place. These features are retained until hatching, although minor changes in the size of the concavities continue (Table I).

The present study indicates that, changes in chorionic surface feature takes place during development of egg. Although surface ultra-structure and morphogenesis of chorion have been studied extensively in several silkworm egg shell, (Hamodrakas, 1984), the same is not investigated in muga silk moth, *Antheraea assama*. Further, reports on scanning electron microscopic studies on changes in chorionic surface architecture during development of egg until hatching, do not exist in literature.

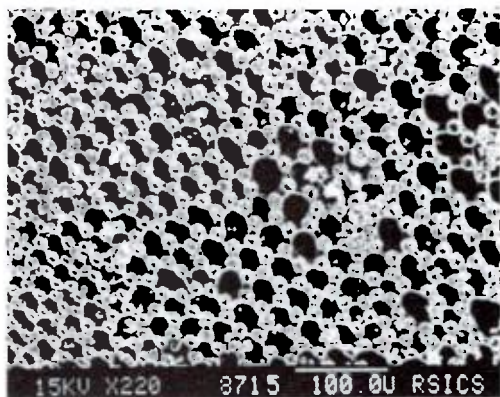


Fig. 1. Scanning electron micrograph of chorionic surface of *A. assama* eggshell immediately after egg laying. (bar = 100 μ) ($\times$ 220).

Fig. 1. Micrographie électronique à balayage de la surface chorionique chez A. assama immédiatement après la ponte. (barre = 100 μ) ($\times$ 220).

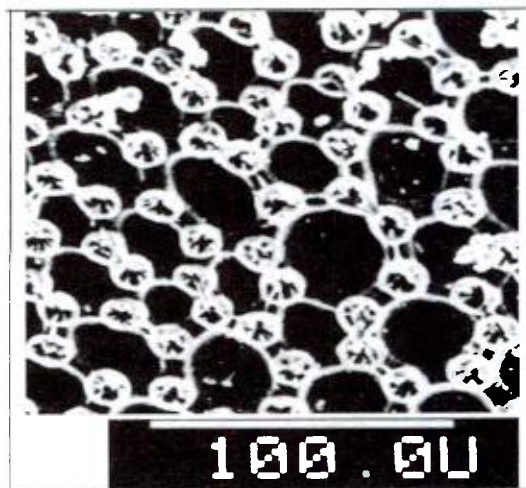


Fig. 2. Enlarged view of Fig. 1., showing crenation on the inner border of chorionic plates and rod like structure connecting the adjacent plates. (bar = 100 μ) ($\times$ 900).

Fig. 2. Agrandissement de la Fig. 1., montrant la crénelure du bord interne des plaques chorioniques et la structure en forme de crochet liant les plaques adjacentes. (barre = 100 μ) ($\times$ 900).

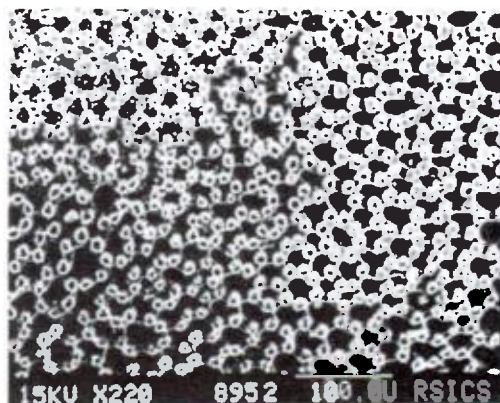


Fig. 3. Chorionic surface of 12h stage eggs (bar = 100 μ) showing distortion at some portions ($\times$ 220).

Fig. 3. Surface chorionique des œufs âgés de 12 h (barre = 100 μ) présentant une distortion à certains endroits ($\times$ 220).

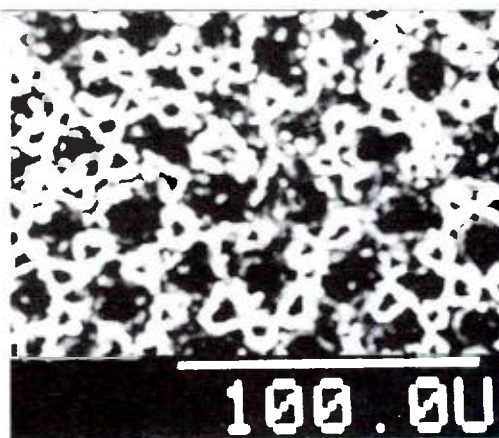


Fig. 4. Enlarged view of a portion of Fig. 3 showing marked distortion of chorionic plates. (bar = 100 μ) ($\times$ 900).

Fig. 4. Agrandissement d'une partie de la Fig. 3. montrant une distortion marquée des plaques chorioniques (barre = 100 μ) ($\times$ 900).

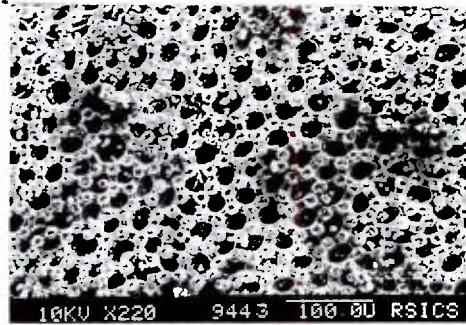


Fig. 5. Chorionic surface of 48h stage egg (bar = 100 μ) showing regular arrangements of chorionic plates ($\times 200$).

Fig. 5. Surface chorionique de l'œuf de 48 h (barre = 100 μ) présentant les arrangements réguliers des plaques chorioniques ($\times 200$).

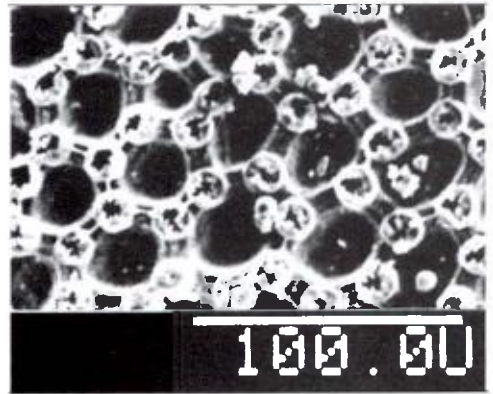


Fig. 6. Enlarged view of Fig. 5. (bar = 100 μ) ($\times 900$).

Fig. 6. Agrandissement de la Fig. 5. (barre = 100 μ) ($\times 900$).

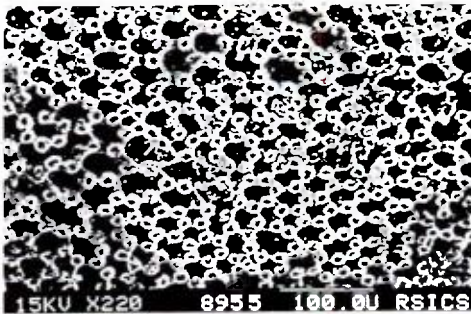


Fig. 7. Chorionic surface of 72h stage egg (bar = 100 μ) ($\times 220$) showing disorganization and distortion of chorionic plates.

Fig. 7. Surface chorionique de l'œuf à 72 h (barre = 100 μ) ($\times 220$) présentant la désorganisation et la distorsion des plaques chorioniques.

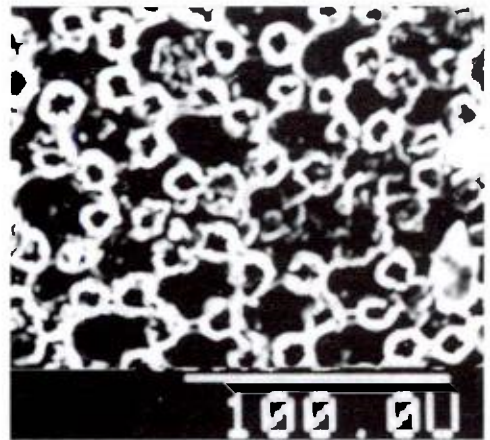


Fig. 8. Enlarged view of a portion of fig. 7 showing clear distortion and disorganization of chorionic plates. (bar = 100 μ) ($\times 900$).

Fig. 8. Agrandissement d'une partie de la fig. 7. présentant une distorsion claire et une désorganisation des plaques chorioniques. (barre = 100 μ) ($\times 900$).

Table 1. Changes in chorionic surface architecture from egg laying to hatching. Values are mean $\pm$ S. D. of 15 observations.**Tableau 1.** Changements de l'architecture de la surface chorionique de la ponte jusqu'à l'éclosion. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'écart type pour 15 observations.

Stages of development	Size of concavity (Air space)	Shape of concavity (Air space)	Outline of the concavity	Arrangement of the chorionic plates
<i>Etapes de développement</i>	<i>Taille de la concavité (espace pour l'air)</i>	<i>Forme de la concavité (espace pour l'air)</i>	<i>Contour de la concavité</i>	<i>Disposition des plaques chorioniques</i>
"0" hour (immediately after hatching) <i>heure "0" (immédiatement après l'éclosion)</i>	35.7 $\pm$ 1 μ 35.7 $\pm$ 1 μ	Round <i>Ronde</i>	Demarcating lines are continuous <i>Les lignes de démarcation sont continues</i>	Oriented regularly surrounding the concavity <i>Orientées régulièrement en entourant la concavité</i>
12 hours <i>12 heures</i>	21.4 $\pm$ 1.1 μ	Roundness is slightly disturbed <i>L'arrondissement est légèrement perturbé</i>	Discontinuous demarcating lines <i>Lignes de démarcation discontinues</i>	Orientation is disturbed and plates are slightly disrupted <i>L'orientation est dérangée et les plaques sont légèrement perturbées</i>
48 hours <i>48 heures</i>	34 $\pm$ 1 μ 34 $\pm$ 1	Oval <i>Ovale</i>	Demarcating lines are continuous <i>Les lignes de démarcation sont continues</i>	Regular orientation <i>Orientation régulière</i>
72 hours <i>72 heures</i>	22 $\pm$ 1.2 μ 22 $\pm$ 1.2 μ	Roundness disturbed <i>Rondeur perturbée</i>	Loss of demarcating lines <i>Perte des lignes de démarcation</i>	Orientation is disturbed <i>L'orientation est dérangée</i>
96 hours <i>96 heures</i>	35 $\pm$ 1.5 μ 35 $\pm$ 1.5 μ	Oval and round <i>Ovale et ronde</i>	Reappearance of demarcating lines <i>Réapparition de lignes de démarcation</i>	Regular orientation <i>Orientation régulière</i>
120 hours <i>120 heures</i>	25 $\pm$ 1.5 μ 25 $\pm$ 1.5 μ	Oval and round <i>Ovale et ronde</i>	Loss of demarcating lines <i>Perte des lignes de démarcation</i>	Orientation is greatly disturbed <i>L'orientation est très perturbée</i>

Table II. Concentration of some elements in chorion immediately after egg laying. Values are mean $\pm$ S. D. of 15 observations. $P = 0.05$.

Tableau II. Concentration en certains éléments du chorion immédiatement après la ponte. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'écart type pour 15 observations. $P = 0,05$.

Elements	Concentration (ppm)
Magnesium	7775 $\pm$ 250
Iron / Fer	4468 $\pm$ 200
Copper / Cuivre	93.8 $\pm$ 4.0
Cobalt	250 $\pm$ 15.0
Zinc	2187.5 $\pm$ 20
Calcium	5750 $\pm$ 500
Nickel	243 $\pm$ 20

Table III. Changes in concentration of different elements in eggshell during the period between egg laying and hatching.

Tableau III. Changements de la concentration en différents éléments de la coque de l'oeuf pendant la période entre la ponte et l'éclosion.

Elements	Concentration (ppm)					
	24 hr	48hr	72hr	96hr	120hr	144hr
Magnesium	13020 $\pm$ 400	8780 $\pm$ 300	10218 $\pm$ 200	13711 $\pm$ 450	7815 $\pm$ 200	10251 $\pm$ 150
Iron / Fer	1739 $\pm$ 120	3750 $\pm$ 125	1522 $\pm$ 150	4346 $\pm$ 200	2689 $\pm$ 150	4698 $\pm$ 200
Copper / Cuivre	76.2 $\pm$ 5.1	38.5 $\pm$ 5.0	125 $\pm$ 5	80 $\pm$ 5	150 $\pm$ 20	86 $\pm$ 5
Zinc	1156 $\pm$ 70	976 $\pm$ 70	1265 $\pm$ 50	906 $\pm$ 20	1420 $\pm$ 50	2520 $\pm$ 50
Cobalt	280 $\pm$ 20	211.5 $\pm$ 25.5	65 $\pm$ 5	79.5 $\pm$ 5	66 $\pm$ 5	88 $\pm$ 5
Calcium	5142 $\pm$ 120	3269 $\pm$ 110	5861 $\pm$ 125	4615 $\pm$ 120	2256 $\pm$ 110	1883 $\pm$ 120
Nickel	130 $\pm$ 10	76 $\pm$ 10	220 $\pm$ 25	125 $\pm$ 20	183 $\pm$ 25	194 $\pm$ 30

The architecture of the proteinaceous, lamellar, silk moth egg shell is helicoidal, like a cholesteric liquid crystal (Hamodrakas *et al.*, 1984). The helicoidal structure is known to be made of successive parallel planes or sheets of fibrils. The chorion is reported to consist of 10 to 20 μm fibrils, which increases in number during the early and middle periods of morphogenesis, while during the late period they thicken until they coalesce (Hamodrakas, 1984). The dynamics of its formation and its geometrical structure suggests that chorion is a biological analogue of liquid crystal (Hamodiakas, 1984), and is characterized by sequential production of its protein components during development (Hamodrakas *et al.*, 1983). However, since chorion is formed before ovulation and fertilisation, the surface architectural changes in chorion during development of egg cannot be related to its liquid crystalline nature and protein self assembly, because at the late stage of development of chorion, it is hardened by di-sulphide bonds, which crosslink the proteins (Hamodrakas *et al.*, 1984). Hence, chemical components of chorion other than protein may be important in causing the observed surface change.

3. Inorganic components of chorion:

The chorion of insect egg does not contain chitin (Neville, 1975), and a large number of protein dominates its composition. As many as 186 protein components have been resolved by two dimensional gel electrophoresis, from the chorion of eggs produced by and individual *Antheraea polyphemus* moth (Hamodrakas *et al.*, 1983). Total amino acid composition of many insect eggs, including several silk moth have been reported (Neville, 1975). However, in spite of the fact that, biochemically, the chorion is considered to be surprisingly complex, a very few attempts have been made to understand the involvement of chemicals other than protein in defining the complexity of the structure. The present study describes for the first time the composition of several elements in the chorion of the muga silk moth *Antheraea assama*, immediately after egg laying (Table II).

The concentration of calcium in the chorion is found to be very high. This is expected in chorion, since calcium is regarded as a major trigger of activity both in extra-cellular and intra-cellular system. Further, the effect of calcium on the organization of protein components is well known (Williams, 1989).

Magnesium is found to constitute the highest concentration of all the elements studied in muga silk moth chorion. Besides its known association with protein, magnesium may also be an important component of the pigments of chorion, like other coloured biological structures (Dey *et al.*, 1998).

Intimate association between iron and protein is well acknowledged in literature (Williams, 1990) and hence its occurrence in a proteinaceous structure, such as chorion, is quite expected. Besides these, the role of iron in determining the photobiological and electrical properties of biological structures have been reported (Dey *et al.*, 1998).

Zinc and copper detected in high concentration in the chorion may play an important role in chorionic function because of their association with protein, and also because of their important optical and thermal properties (Strobel, 1973).

The presence of nickel in chorion seems to be very interesting, since no report of any physiological role of the metal in insect exists in literature. However, resistance of nickel to corrosion against many acids, salts alkalis, fresh and salt-water and in wet and dry gases is reported (Seilker *et al.*, 1988).

Cobalt is known to act as coenzymes in several biochemical processes and hence its presence in a proteinaceous formation like chorion is not unexpected.

4. Dynamics of elemental concentration of chorion during embryonic development:

Along with the changes in surface architecture, a significant change in the concentration of several elements was observed in the chorion during embryonic development (Table III). It is clear from the Table that the element shows either an increase or a decrease in its concentration during the development, from 12 hours after egg laying until hatching. This indicates that the inflow or outflows of chorionic elements are related to the increase or decrease in size of the air space and regular or

irregular arrangements of the plates surrounding the space. The similar type of changes in shape of biological structure in relation to inflow or outflow of some elements through it, has been reported by several authors (Williams, 1990). Thus, it appears that changes in chorionic inorganic components are related to mechanical movements (of its surface structures) during development.

CONCLUSION

Scanning electron microscopy reveals that the surface architecture of chorion is different from that of other related species. The continuity between the adjacent chorionic plates established through rod-like structures, and nearly co-planar arrangement of the concavities & plate appears to be significant. These architectural features are likely to influence the sensitivity of chorion to abiotic factors, e. g. light, temperature, oxygen, humidity etc. Remarkable changes in the concentration of several elements constituting the chorion, along with its architectural changes during embryonic development suggest the importance of inorganic components in chorionic function.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Prof. B. Myrboh, Head, RSIC, North Eastern Hill University, Shillong and Prof. B. B. P Gupta, Head, Department of Zoology, North Eastern Hill University, Shillong, for encouragement and interest in the work.

REFERENCES

- DEY S., HOOROO R. N. K., BISWAS N. (1997): Dendritic organization of prominent sensory structures on the body of the first instar larva of the muga silk moth *Antheraea assamensis*. *Cytobois.*, 92, 99-100.
- DEY S., HOOROO R. N. K., BHATTACHARJEE C. R. (1998) Electron microscopic and Spectroscopical studies on the coloured patches on the wing of a butterfly, *Graphium sarpedon* (Lepidoptera: papilionidae) with reference to their photo-biological and electrical properties. *Pigment Cell Res.*, 11/1, 1-11.
- DEY S. (1999) Scanning electron microscopic detection of an unusual giant sensilla on the abdominal cuticle of the fifth instar larvae of the muga silk moth, *Antheraea assama*, Westwood, (Lepidoptera: saturniidae). *Micron*, 30/4, 339-348.
- DEY S., HOOROO R. N. K., BISWAS N., RAGHUVARMAN A., CHAUDHURY S. (1999) Cellular feature of muga silkworm (*Antheraea assama* Ww. Lepidoptera: saturniidae) midgut and its possible impact on indoor rearing, *Sericologia*, 39(4), 529-535.
- DEY S., SINGH S., DHAR N. J., CHAKRABORTY R., DAS P. K., RAGHUVARMAN A. & SHARMA D. K. (2002) Possible relationship between dorsal campaniform Sensilla in head surface and preferred feeding posture of Muga silkworms, *Antheraea assama* during indoor rearing. *Sericologia*. (In Press).
- FEHRENBACH H., DITTRICH V., ZISSLER D. (1987) Eggshell fine structure of three lepidopteran pests, *Cydia pomonella* (L) (Tortricidae), *Heliothis virescens* (Fabr) and *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Noctuidae). *J. Insect Morphol & Embryol.*, 16, 3/4, 201-219.
- HAMODRAKAS S. J., PAULSON J. R., RODAKIS G. C., KAFATOS F. C. (1983) X-ray diffraction studies in silk moth chorion. *Int. J. Biol. Macromol.*, 5, 149-153.
- HAMODRAKAS S. J. (1984) Twisted β -pleated sheet: the molecular conformation which possibly dictates the formation of the helicoidal architecture of several proteinaceous egg shells. *Int. J. Biol. Macromol.*, 6, 51-54.
- HAMODRAKAS S. J., KAMITSOS E. I., PAPANIKOLAOU A. (1984) Laser Raman Spectroscopic studies of the eggshell (chorion) of *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Macromol.*; 6; 333-336.
- HINTON H. E. (1981) *Biology of Insect Eggs Vol. I*, Pergamon Press. Oxford New York Toronto. Sydney. Paris. Frankfurt., p1-473.

- MARCHIONDO A. (1980) Scanning electron microscopy of the egg of *Cheyletiella yasgurismiley* (Acari: Cheyletiellidae) with a description of egg buster. J. Insect Morphol. Embryol., 10, 2, 167-171.
- MAZZINI M., GAINO E. (1985) Fine structure of the eggshell of *Habrophlebia fusca* (Curtis) and *H. consiglioi blancheri* (Ephemeroptera: Leptophlebbidae). J. Insect Morphol. & Embryol. 14, 6, 327-334.
- MORGAN A. J. (1980) Preparation of specimen in chemical integrity. In: X-ray microanalysis in Biology. pp 65-165, (M. A. hayat ed). University Park Press. Baltimore. Maryland.
- NEVILLE A. C. (1975) The structural macro molecules. In Biology of the Arthropod Cuticle. Springer-Verlag. Barlin. Heidelberg. New York., p 71-123.
- SEILER H. G., SIGEL H., SIGEL A. (1988) Nickel: In Handbook on Toxicity in Inorganic Compounds. Marcel Dekker Inc. New York, p 454-464.
- STROBEL H. A. (1973) Some spectrophotometric methods. In Chemical Instrumentation: A Systematic Approach. Addison-Wesley Publishing Company. London, p 353-416.
- WILLIAMS R. J. P. (1989) Calcium and Cell steady states. In Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells. (D. R. Pochet, Lawson and Claus W. Heizmann eds). Plenum Publishing Corporation., p 7-16.
- WILLIAMS R. J. P. (1990): Bio-Inorganic Chemistry: Its Conceptual Evolution, Co-ordinat. Cem. Rev. 100, 573-610.

CHANGEMENTS AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'ARCHITECTURE ET DES COMPOSANTS INORGANQUES DU CHORION DE L'ŒUF DU PAPILLON A SOIE MUGA (*ANTHERAEA ASSAMA*) Ww., LEPIDOPTERA : SATURNIDAE)

SUDIP DEY^{*1}, R. N. K. HOOROO², A. RAGHUVARMAN², N. BISWAS³ & P. S. DKHAR

1. Electron Microscope Laboratory, Regional Sophisticated Instrumentation Center, North Eastern Hill University, Shillong – 793 003, Inde.

2. Department of Zoology, North Eastern Hill University, Shillong 793 022, Inde.

3. Central Silk Board Research Extension Centre, Diphu – 782460, Inde.

4. Atomic Absorption Spectroscopy Laboratory, RSIC, North Eastern Hill University, Shillong – 793003, Inde.

*Nous décrivons les changements de l'architecture de la surface du chorion de l'œuf du papillon à soie muga (*Antheraea assama*) et la cinétique de certains composants inorganiques au cours du développement, c'est à dire de la ponte de l'œuf à la pré-éclosion. La microscopie électronique à balayage révèle l'alternance d'aménagements réguliers et de dérangements de l'espace pour l'air et de la plaque chorionique jusqu'à 120 heures après la ponte de l'œuf mais les dérangements seuls ne se produisent qu'au bout de 120 heures jusqu'à l'éclosion. Il est évident qu'il y a des changements significatifs de la concentration en plusieurs éléments, en l'occurrence en calcium, en zinc, en magnésium, en fer, en cuivre, en cobalt et en nickel dans le chorion au cours du développement de l'œuf, ce qui indique l'importance de ces éléments pour le fonctionnement du chorion et pour la physiologie du développement de la séreuse et du l'embryon sous-jacents.*

INTRODUCTION

Le papillon à soie, *Antheraea assama* est une espèce du genre *Antheraea*, dont la distribution se limite à l'Assam, une province du Nord-Est de l'Inde. En dehors de la nature unique de la soie produite par l'insecte, on sait que sa morphologie générale, les structures fines de ses tissus, son comportement et sa physiologie sont différents des autres espèces associées (Dey et coll., 1997 ; Hazarika et Bordoloi, 1998 ; Dey, 1999 ; Dey et coll., 1999). Bien qu'il existe quelques rapports sur la relation structure - fonction de certains organes vitaux du ver à soie, par exemple du système sensoriel (Dey et coll., 1997 ; Hazarika et Bordoloi, 1998 ; Dey et coll., 2000), du système digestif (Dey et coll., 1999) etc, il n'y en a pas de disponible sur la structure reproductive. Il existe des études approfondies sur la coque de l'œuf ou chorion, une formation protéique complexe d'un point de vue ultra-structural et morphogénétique chez de nombreuses espèces de papillon à soie, sauf chez le papillon à soie muga (Hamodrakas et coll., 1983 ; Hamodrakas, 1984 ; Hamodrakas et coll., 1984). De nombreuses études au microscope électronique à balayage ou à transmission des œufs d'insectes montrent des variations déroutantes de la structure de la surface externe du chorion qui s'avèrent utiles pour faire un diagnostic et pour évaluer la relation phylogénétique et nous ont aussi permis de comprendre précisément le

* Auteur auquel adresser la correspondance.

mécanisme de fécondation (Hinton, 1981 ; Mazzini et Gaiio, 1985 ; Fehrenbach et coll., 1987 ; Marchiondo, 1980).

Le chorion de l'œuf a une fonction protectrice et joue aussi un rôle important pour la respiration de l'embryon en développement.

Bien que des études approfondies aient été réalisées sur les composants protéiques de la coque soyeuse ou du chorion, on connaît très peu de choses sur les constituants chimiques de cette structure complexe (Hinton, 1981). En ce qui concerne les composants inorganiques, on a signalé que le chorion de certains Lépidoptères spécialisés (Saturniidae, Bombycidae) contient beaucoup de soufre et stabilise la protéine par des ponts disulfure. On a rapporté que certaines des protéines chorioniques sont stabilisées par des ponts de phosphate ester ou par des ponts de phosphate-calcium-phosphate en raison de la présence de phosphosérine (Hinton, 1981). Cependant, l'importance d'autres éléments dans la stabilisation structurale du chorion n'a pas été étudiée en détail. De plus, il n'existe pas dans la littérature d'études sur les possibilités d'implication des éléments dans le phénomène thermique, optique et électrique du chorion qui sont directement associés avec le fonctionnement de l'embryon en croissance.

Le but de cette étude, est (i) d'examiner l'architecture de la surface du chorion du papillon à soie muga pour comprendre son caractère unique, s'il existe, par rapport aux autres espèces associées (ii) de déterminer la dynamique des caractéristiques de surface et de certains composants inorganiques par rapport au développement embryonnaire pendant la période entre la ponte des œufs et l'éclosion.

MATERIAUX ET METHODES

Préparation des échantillons :

On obtient les papillons muga femelles, *Antheraea assama*, après l'accouplement, auprès d'une magnanerie commerciale à muga et on les amène au laboratoire pour la ponte. Les œufs sont recueillis entre 6 heures après la ponte et l'éclosion et sont préparés pour la Microscopie Electronique à Balayage et la spectroscopie atomique d'absorption.

Microscopie Electronique à Balayage :

Pour les études de microscopie électronique à balayage, les œufs sont lavés avec de l'eau distillée et séchés à l'air, d'après la description de Hinton (1981). Les échantillons sont montés sur un montant en cuivre (10 mm de diamètre × 30 mm de hauteur) en utilisant du ruban adhésif à double face, lié par une couche de peinture en argent pour assurer la conduction de la charge, en prenant soin de ne pas emprisonner de bulle d'air. On applique une fine couche d'or conductrice à l'échantillon en utilisant un pulvérisateur à ions JFC 1100 (Jeol) à un vide relativement faible de 10^{-3} torr dans la chambre à pulvérisation. On examine les échantillons à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage JSM-35 CF (Jeol) fonctionnant à 15 KV.

On fixe le contrôle à basecule à 0° pour placer le spécimen dans la position horizontale. le sélectionneur WD est utilisé pour fixer la distance de travail (WD) à 15 mm.

Spectroscopie d'Absorption Atomique :

Les échantillons de coque d'œufs (chorion) sont séparés des séreuses et de l'embryon sous-jacent pour la Spectroscopie d'Absorption Atomique en suivant la méthode suggérée par Hamodrakas et coll., (1984) pour les études spectroscopiques Laser-Raman. Les œufs sont coupés en deux avec des ciseaux fins et lavés plusieurs fois dans de l'eau distillée déionisée pour enlever l'embryon en développement et la séreuse sous-jacente. Les chorions insolubles sont lavés dans de l'éthanol à 95 % et 100 % puis dans de l'eau distillée dé-ionisée. On utilise des aldéhydes pour filtrer les éléments diffus (Morgan, 1980) de sorte que seuls les éléments qui forment les composants structurels du chorion sont retenus. Le traitement à l'aldéhyde est suivi par un lavage répété dans de l'eau déionisée et par un séchage à l'air. On traite 0,5 g des échantillons de chorion avec quelques gouttes de peroxyde

d'hydrogène, on les garde la nuit et on les laisse se dessécher par évaporation ; on y ajoute 0,5 ml d'acide perchlorique et on chauffe jusqu'à dessèchement. Le processus est répété 2 à 3 fois : on ajoute 2 à 3 ml d'HCl à l'échantillon et on dilue la solution avec de l'eau distillée à 25 ml. On réalise l'analyse élémentaire avec un Spectrophotomètre à Absorption Atomique, Perkin-Elmer, 2380.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristique générale de la surface chorionique :

Les aéroyles d'*Antheraea assama* sont constitués par un grand nombre d'espaces ronds ou ovales ou de concavités d'environ 35 μ de diamètre qui sont entourés par 5 à 6 plaques rondes (~ 15 μ), disposées d'une manière régulière. Les plaques chorioniques rondes présentent des crénelures sur le bord interne (Figs 1, 2). Les plaques chorioniques adjacentes orientées d'une manière circulaire qui entourent la cavité établissent un lien entre elles grâce à des structures en forme de bâtonnet, de 5 μ de longueur et de 1 μ de largeur. La disposition des plaques chorioniques qui entourent la concavité présente certaines similitudes avec celle d'autres espèces du genre *Antheraea*, en l'occurrence *Antheraea yamamai* Guer., d'après la description de Hinton (1981). Cependant, on trouve que chez *A. yamamai* la concavité est plus profonde par comparaison à celle du papillon à soie muga, *Antheraea assama* où les plaques rondes et la concavité sont plus ou moins sur le même plan. De plus, on n'observe pas la continuité entre les plaques adjacentes, établies par les structures en forme de bâtonnet de *A. assama*, chez *A. yamamai* d'après les descriptions de Hinton (1981). De même, bien qu'il y ait une ressemblance d'organisation des plaques chorioniques entre *A. assama* et *A. pernyi*, il y a aussi des différences de base aussi. Chez *A. pernyi*, les crénelures sur le bord interne des plaques sont beaucoup plus allongées et prononcées par comparaison à celles d'*A. assama*. De plus, les liaisons entre les plaques en forme de bâtonnets caractéristiques du chorion du papillon à soie muga sont absentes du chorion d'*Antheraea pernyi*. La concavité chez *A. pernyi*, comme chez *A. yamamai* est profonde et pas autant sur le même plan que chez *A. assama*. Bien que la nature exacte du rôle des caractéristiques du chorion de *A. assama* reste à élucider, les liaisons entre les plaques et la disposition des concavités et des plaques presque au même niveau semblent significatives. Ces caractéristiques architecturales de la surface chorionique de *A. assama* qui sont différentes de celles des autres espèces *Antheraea* sont susceptibles d'augmenter la sensibilité du chorion à l'air et aux autres facteurs abiotiques, parce que les plaques sont liées entre elles et elles sont situées plus ou moins au même plan que les concavités. Cela signifie que les changements de température, d'humidité et de conditions de lumière auront un plus grand impact sur le chorion du papillon à soie muga en raison des liaisons inter-plaques, par comparaison aux autres espèces où les plaques ne sont pas liées entre elles, ce qui diminue les effets. Cependant, il faudrait des preuves expérimentales pour corroborer cette supposition théorique, avant de tirer n'importe quelle conclusion à ce sujet.

2. Changements de l'architecture chorionique au cours du développement :

La microscopie à balayage électronique de la surface chorionique au cours du développement de l'œuf de la ponte à l'éclosion révèle une différence significative de l'architecture de la surface. Douze heures après la ponte, la plupart des parties de la surface chorionique présentent des changements radicaux de l'orientation des plaques, caractérisées par l'irrégularité de leur distribution, le rétrécissement et le léger dérangement des plaques et la disparition partielle ou totale des lignes de démarcation des concavités (Figs 3, 4 ; Tableau I). Cela continue jusqu'à 48 h de développement de l'œuf. Au bout de 48 heures, l'orientation change à nouveau, et la surface chorionique présente une disposition régulière des plaques chorioniques et des lignes de démarcation entre les concavités (Figs 5, 6 ; Tableau I). Au bout de 72 heures, il se produit une désorganisation des plaques chorioniques suivie par la disparition des lignes de démarcation (Figs. 7, 8 ; Tableau I). D'autre part, au bout de 96 h la surface chorionique présente des dispositions régulières des plaques et la réapparition des lignes de démarcation des concavités (Tableau I). A partir de 120 heures, cependant, les plaques sont à

nouveau disposées de manière irrégulière et on constate la disparition des lignes de démarcation des concavités. Ces traits se maintiennent jusqu'à l'éclosion bien qu'il continue de se produire des changements mineurs de la taille des concavités (Tableau I).

Cette étude indique que des changements de la caractéristique de la surface chorionique ont lieu au cours du développement de l'œuf. Bien qu'il y ait de nombreuses études sur l'ultra-structure de la surface et la morphogenèse du chorion de l'œuf chez plusieurs espèces de papillons à soie (Hamodrakas, 1984), il n'y en a pas chez le papillon à soie muga, *Antheraea assama*. De plus, il n'existe pas de rapports sur les études au microscope à balayage électronique des changements de l'architecture de la surface chorionique au cours du développement de l'œuf jusqu'à l'éclosion.

L'architecture de la coque protéique lamellaire de l'œuf du papillon à soie est hélicoïdale, comme un cristal liquide cholestérique (Hamodrakas et coll., 1984). On sait que la structure hélicoïdale est constituée de plans parallèles successifs ou de couches de fibres. On a rapporté que le chorion est constitué de fibrilles de 10 à 20 µm, qui augmentent en nombre au début et au milieu de la morphogenèse, tandis que durant la dernière période, elles épaississent jusqu'à ce qu'elles se rassemblent (Hamodrakas, 1984). La dynamique de sa formation et sa structure géométrique suggèrent que le chorion est un analogue biologique de cristal liquide (Hamodrakas, 1984) et il est caractérisé par une production séquentielle de composants protéiques au cours du développement (Hamodrakas et coll., 1983). Cependant, puisque le chorion se forme avant l'ovulation et la fécondation, les changements architecturaux de la surface du chorion au cours du développement de l'œuf ne peuvent pas être liés à sa nature cristalline liquide et à l'auto-assemblage des protéines, parce qu'au dernier stade de développement, le chorion se durcit par des ponts disulfure entre les protéines (Hamodrakas et coll., 1984). Ainsi, des composants chimiques du chorion autres que des protéines pourraient être importants comme cause des changements qu'on observe.

3. Composants inorganiques du chorion :

Le chorion de l'œuf de l'insecte ne contient pas de chitine (Neville, 1975) et un grand nombre de protéines domine sa composition. On a trouvé jusqu'à 186 composants protéiques grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide chorion d'œufs produits par le papillon *Antheraea polyphemus* (Hamodrakas et coll., 1983). Il y a eu des rapports sur la composition en acides aminés totaux des œufs chez de nombreux insectes (Neville, 1975). Cependant, malgré le fait que biochimiquement, on considère que le chorion est de manière surprenante complexe, très peu d'essais ont été faits pour comprendre l'implication des substances chimiques autres que les protéines pour définir la complexité de la structure. Cette étude décrit pour la première fois la composition de plusieurs éléments du chorion du papillon à soie muga, *Antheraea assama*, immédiatement après la ponte des œufs (Tableau II).

On trouve que la concentration en calcium du chorion est très élevée. On pouvait s'attendre à cela pour le chorion, puisqu'on considère que le calcium est le déclencheur principal d'activité à la fois dans le système extra-cellulaire et intra-cellulaire. De plus, on connaît bien l'effet du calcium sur l'organisation des composants protéiques (Williams, 1989).

De tous les éléments étudiés dans le chorion du papillon à soie muga, c'est le magnésium que l'on trouve à la concentration la plus élevée. En plus de son association connue avec les protéines, le magnésium pourrait aussi être un composant important des pigments du chorion, comme d'autres structures biologiques colorées (Dey et coll., 1998).

Il est fait référence dans la littérature à l'association intime entre le fer et les protéines (Williams, 1990) et sa présence dans une structure protéique, comme le chorion, n'est pas surprenante. On a aussi rapporté le rôle du fer dans la détermination des propriétés photobiologiques et électriques des structures biologiques (Dey et coll., 1998).

Le zinc et le cuivre détectés à concentrations élevées dans le chorion pourraient jouer un rôle important dans la fonction chorionique en raison de leur association avec les protéines, et aussi en raison de leurs propriétés optiques et thermiques importantes (Strobel, 1973).

La présence de nickel dans le chorion semble être très intéressante puisqu'il n'existe aucun rapport sur le rôle physiologique de ce métal chez l'insecte dans la littérature. Cependant, on a rapporté la résistance du nickel à la corrosion avec de nombreux acides, alcalis de sels, avec l'eau fraîche et salée et avec des gaz mouillés et secs (Seilker et coll., 1988).

On sait que le cobalt agit comme co-enzymes dans plusieurs processus biochimiques et sa présence dans une formation protéique comme le chorion n'est donc pas surprenante.

4. Dynamique de la concentration des éléments au cours du développement embryonnaire :

Il se produit non seulement des changements de l'architecture de la surface mais aussi un changement significatif de la concentration en plusieurs éléments dans le chorion au cours du développement embryonnaire, (Tableau III). Il est clair d'après le Tableau que les éléments présentent soit une augmentation soit une baisse de leur concentration au cours du développement, entre 12 heures après la ponte jusqu'à l'éclosion de l'œuf. Cela indique que l'arrivée ou la sortie des éléments chorioniques sont liées à l'augmentation ou à la diminution de l'espace pour l'air et aux dispositions régulières ou irrégulières des plaques entourant l'espace. Plusieurs auteurs ont rapporté un type similaire de changement de la structure biologique en liaison avec l'arrivée ou avec la sortie de certains éléments qui la traversent (Williams, 1990). Il apparaît donc que les changements des composants inorganiques chorioniques sont liés aux mouvements mécaniques (des structures de surface) au cours du développement.

CONCLUSION

La microscopie électronique à balayage révèle que l'architecture de la surface du chorion est différente de celle des autres espèces associées. La continuité entre les plaques chorioniques adjacentes établies par des structures en forme de bâtonnet et la disposition presque au même niveau des concavités et de la plaque semble être significatives. Il semble que ces caractéristiques architecturales puissent influencer la sensibilité du chorion aux facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, l'oxygène, l'humidité, etc. Les changements remarquables de la concentration en plusieurs éléments constitutifs du chorion ainsi que les changements architecturaux au cours du développement embryonnaire suggèrent l'importance des composants inorganiques dans la fonction du chorion.

CHANGES OF ESTERASE A4-ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH DIAPAUSE IN HOT WATER TREATED EGGS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI*

XU SHI-QING¹, HIDENORI KAI², XU JUN-LIANG³, SIMA YANG-HU¹, CHEN XI-LIN¹
& ZHENG BI-PING¹

1. School of Agriculture Science and Technology, Soochow University, Suzhou 215006, China.

2. Faculty of Agricultural, Tottori University, Koyama, Tottori 680, Japan.

3. Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

The hot water-treatment is an important method for artificial hatching in silkworm eggs. Time measurement by esterase A4 (EA4) purified from hot water-treated eggs of Bombyx C108 strain has been studied using ATP as a substrate. The ATPase activity-peak for EA4 purified from 15 hours old eggs appeared at hour 24 at 5° C or hour 1.5 at 25° C after the treatment, and the diapause of eggs was terminated rapidly. ATPase activity-peak for EA4 from 30 hours old eggs has appeared at an early time, the period of incubation shortens and the rate of head pigmentation of embryos enhances, by increasing the hot water stimulus (soaking duration). The changes of ATPase activity for EA4 in hot water treated eggs are highly correlated with eggs activation.

Keywords : *Bombyx mori*, diapause eggs, hot water-treatment, esterase A4 (EA4).

INTRODUCTION

Bombyx mori ceases its development and initiates diapause at egg stage. The diapause does not immediately stop in response to favourable changes in environment. In general, exposure to cold or treating with hydrochloric acid or treating with hot water is essential for the termination of diapause. The hot water-treatment is a practical method for breaking the diapause of *Bombyx* eggs. The treatment has a great effect for artificial hatching in sericultural industry. To reveal the hot water-mechanism is a way to discover a more useful method for the artificial hatching, too. However, the mechanism of the diapause break by hot water-treatment is still unproved. We have studied the mechanism of diapause termination by low temperature and hydrochloric acid (Kai and Nishi, 1976 ; Kai *et al.*, 1995a ; Xu, 1991, 1992, 1994) and our attention has been focused on esterase A4 (EA4) (Kai *et al.*, 1984, 1987, 1988, 1995b ; Xu *et al.*, 1998a, 1998b). EA4 appears to possess the capacity for measuring chilling duration and acid stimulative dose. So a question is whether the EA4 from hot water-treated eggs has the similarity to that from chilled or acid-treated eggs or not. In an attempt to solve the question, the following experiments were performed to describe the changes of EA4-activity and its relationship with diapause in hot water treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Hot water-treatment :

The diapausing eggs of the strain C108 of *B. mori* laid within 10 min were collected at 24° C to obtain synchronous eggs batches. The eggs were treated with hot water (53° C) for a period of 5

seconds over 40 seconds at 15 hours or at 30 hours after oviposition at 25° C. After the treatment, eggs were used to purify EA4 or kept at 25° C. (R. H. was 75%-85%) to see the head pigmentation. Non-fertilized or dead eggs were replaced with normal eggs from spare ones before the treatment.

Purification of EA4:

After hot-water treatment, 5g eggs were immersed in cold acetone overnight. After discarding the acetone, the eggs were crushed completely with another 30-vol. of cold acetone. The precipitate obtained by centrifugation at 10,000 g for 30 minutes was suspended in 15 ml of 25 mmol/l veronal buffer (pH 7.5; Barbitol-Na 5.155g, CH₃COONa 3.402g, 6 mol/l HCl about 2 ml to adjust pH in a final volume of 1000ml). The remaining powder was also suspended in a few millilitres of buffer. The combined suspension (approx. 20 ml) was heated at 85° C for 15 minutes. The heat-stable supernatant was obtained by centrifugation. The precipitate thus remaining was re-suspended in another 5 ml of 25 mmol/l veronal buffer (pH 7.5) and re-centrifuged. The supernatants were combined (c. 25 ml) and brought to 50% saturation with ammonium sulphate (adjusted exactly to pH 3.30 by HCl). After standing for more than 3 hours, the solution was centrifuged at 10,000 g for 30 minutes, and solid ammonium sulphate was added to the supernatant with gentle stirring to 80%

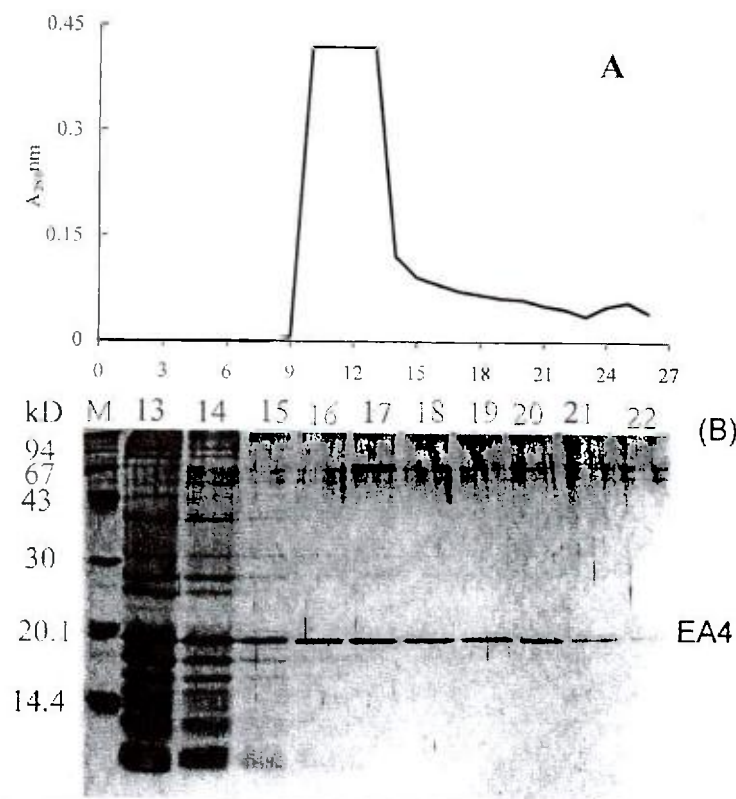


Fig. 1. Separation of EA4 by gel permeation chromatography through Sephadex G-25 column.

Panel A shows the elution profile of crude EA4 preparation through the Sephadex column. Panel B shows the SDS-PAGE separation of each effluent fraction through the column. The numbered lines are keyed to the fractions shown in panel A. Molecular weight markers are shown in lane M.

Fig. 1. Séparation d'EA4 par chromatographie sur colonne Sephadex G-25.

La partie A montre le profil d'éluion de la préparation EA4 brute par la colonne Sephadex. La partie B montre la séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl de sulfate de chaque fraction d'effluent. Les lignes numérotées correspondent aux fractions présentées dans le schéma A. Les marqueurs de poids moléculaires sont présentés dans le trajet M.

saturation. The purification was carried to the step of 80% saturated ammonium sulphate in 1 day and following step was completed in another day.

The precipitate from the 80% saturated ammonium sulphate was further washed with acetone and then 80% saturated ammonium sulphate. The washed precipitate was re-dissolved in 1ml of the 25 mmol/l equilibrating buffer (pH 5.25; piperazine hexahydrate 4.856g, 6 mol/l HCl 7.304 ml in a final volume of 1000 ml) and applied to a 1.5 m × 30 cm Sephadex G-25 (medium) column, which has been equilibrated in a cold room with the piperazine-HCl buffer. The flow rate of the buffer was adjusted to 0.4-0.5 ml/min. The EA4 was eluted later than the void volume and earlier than the ammonium sulphate (Fig. 1). The EA4 fractions were collected and concentrated to less than 10ml with Centricon-10™ (Amicon) and Sep-Pak C18. The Centricon-10™ was used at less than 2500 r/min in all experiments. The concentrated sample was further submitted to HPLC on an YMC-Pack protein-RP (Pharmacia). The chromatographic conditions was: 25% B for 5 minutes, 25-35% B linear gradient for 40 minutes at a flow rate (0.8 ml/min), where solvent A was aqueous containing, 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid and solvent B was 100% acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid. The final preparation displayed a single silver stained band on SDS-PAGE (Fig. 2).

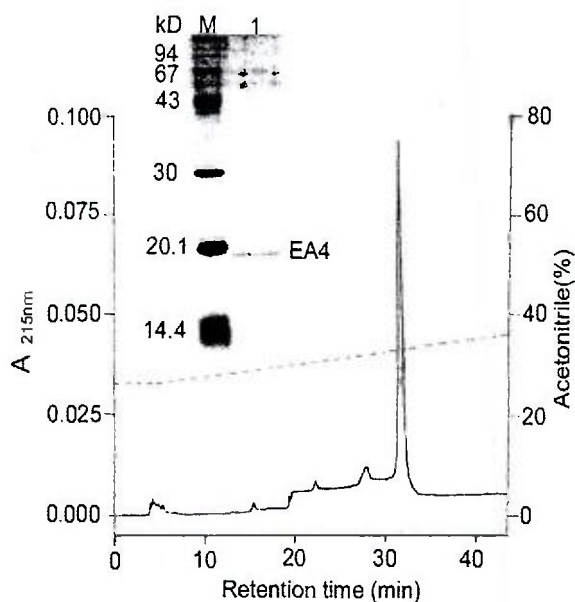


Fig. 2. Re-chromatography on YMC-Pack Protein-RP of EA4 fraction obtained by the 1st chromatography on YMC-Protein-RP reversed-phase on Sept-Pak C18.

Chromatographic conditions: 25% buffer B for 5 minutes, 25~35% buffer A linear gradient for 40 minutes at a flow rate (0.8 ml/min.), where buffer A was aqueous containing 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid and buffer B was 100% acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid. Lane 1: EA4 fraction from 2nd YMC-chromatography, Lane M: received molecular weight markers.

Fig. 2. Nouvelle chromatographie sur YMC-Protein-RP de la fraction EA4 obtenue par la première chromatographie YMC-Protein-RP en phase inversée sur le Sept-Pak C18.

Conditions chromatographiques : tampon B à 25 % pendant 5 minutes. Gradient linéaire du tampon A 25~35 % pendant 40 minutes à une vitesse d'élution de 0,8 ml/min où le tampon A est aqueux et contient 0,05 % (v/v) d'acide trifluoroacétique et le tampon B est 100 % d'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique à 0,05 %. Trajet 1 : Fraction EA4 à partir de la 2^{ème} chromatographie YMC. Trajet M : marqueurs de poids moléculaire.

ATPase assay:

3.5 ml (equivalent to about 4 µg protein) of the enzyme solution eluted with the poly-buffer (pH 3.85) was incubated at 5° C or 25° C in sterilized plastic tubes. At appropriate intervals, 40 µl aliquots were assayed for adenosine triphosphatase (ATPase). All incubation tubes were coated with silicon. The ATPase assay was a modification of Carter and Karl (1982). Mixing made A solution 4-vol. of 2 mol/l HCl and 3-vol. of 0.23 mol/l NaMoO₄. Solution B was 0.042% (w/v) malachite green oxalate in 1% (w/v) polyvinyl alcohol. Solution C was 8.0% (v/v) H₂SO₄. The adenosine 5'-triphosphate Tris (hydroxymethyl) aminomethane vanadium free salt (Sigma) was used as the substrate, and 50 mmol/l solution was made with the reaction buffer pH 7.4 [25 mmol/l 2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES); 12.5 mmol/l Trizma Base; 50 mmol/l NaCl; 20 mmol/l KCl; 1.0 mmol/l ethylene diamine tetra acetic acid disodium salt (EDTA, 2Na) and 100 µg/ml salmon test DNA]. The salmon test DNA had an effect on EA4 activation. A 20 µl sample of the 50 mmol/l substrate solution was added to 340 µl of the reaction buffer (pH 7.4) and then 40 µl of the enzyme solution was added to this reaction mixture (2.5 mmol/l ATP in final concentration). The reaction mixture was incubated at 25° C for 30 minutes and the liberated inorganic phosphate was determined as described below. The 400 µl reaction mixture was added with 280 µl of solution A and flowed immediately with 120 µl of solution B. It was mixed and allowed to stand for exactly 2 minutes at 25° C for colour development, then 800 µl of solution C was added and mixed thoroughly. This mixture was allowed to stand at room temperature for 1 hour to complete the colour development, after which the absorbencies were read at 625 nm.

RESULTS

The hot water-treated (53° C, 5 seconds) diapause eggs (15 hours old at 25° C) were kept at 25° C (R. H. was 75%-85%) to see the embryonic development. The rate of the eggs head pigmentation was 98.5% in the 9th day and the hatchability was 97.1% in the 11th day after the treatment. The hot water-treatment had an important effect on activation of diapausing eggs.

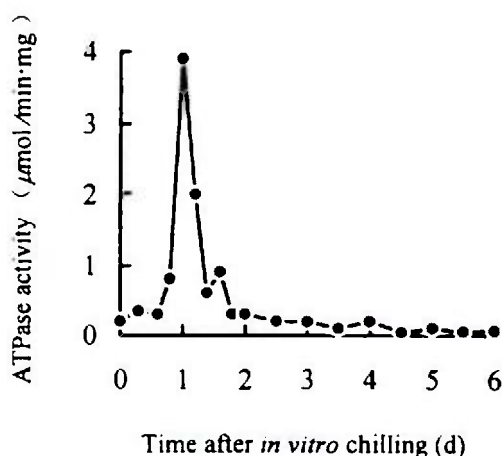


Fig. 3. Effect of *in vitro* chilling on the activities of EA4.

EA4 purified from C108 silkworm hot water-treated eggs (53° C, 5 seconds). The purified enzyme was incubated at 5° C in sterilized plastic tubes for 6 days. At appropriate intervals, aliquots were assayed for ATPase activity.

Fig. 3. Effet du refroidissement *in vitro* sur les activités d'EA4.

EA4 purifiée à partir des œufs du ver à soie C108 traités à l'eau chaude (53° C, 5 secondes). L'enzyme purifiée est incubée à 5° C dans des tubes en plastique stérilisés pendant 6 jours. Les aliquotes sont évaluées à des intervalles appropriés par rapport à l'activité ATPase.

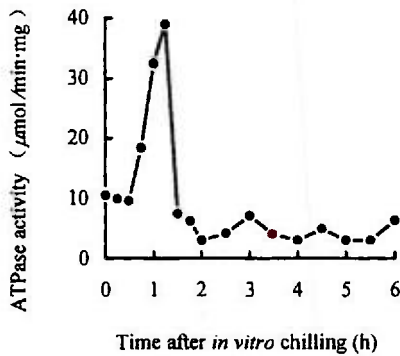


Fig 4. Effect of temperature *in vitro* on the activities of EA4.

EA4 purified from C108 silkworm hot water-treated eggs (53° C, 5 seconds). The purified enzyme was incubated at 25° C in sterilized plastic tubes for 6 hours. At appropriate intervals, aliquots were assayed for ATPase activity.

Fig. 4. Effet de la température *in vitro* sur les activités d'EA4.

EA4 purifiée à partir des œufs du ver à soie C108 traité à l'eau chaude (53° C, 5 secondes). L'enzyme purifiée est incubée à 25° C dans des tubes en plastique stérilisés pendant 6 heures. Les aliquotes sont évaluées à des intervalles appropriés par rapport à l'activité ATPase.

Table I. Effects of hot water-stimulative dose on the egg head pigmentation and the EA4 activity.

Tableau I. Effets de la dose stimulante d'eau chaude sur la pigmentation de la tête de l'œuf et sur l'activité EA4.

Stimulative dose of hot water (second) Dose d'eau chaude stimulante (secondes)	0	5	10	15	20	30	40
Rate of head pigmentation (%) Taux de pigmentation de la tête (%)	0	12.1	40.5	97.1	93.5	81.2	68.1
Time of head pigmentation (%) Durée de pigmentation de la tête (jours)		13.5	12.1	8.3	8.3	8.9	9.1
The largest EA4 activity (μmol / min mg) Activité EA4 la plus importante	33	22	35	38	39	33	29
The activity-peak appearing time (hour) Période d'apparition de l'activité pic (heure)	4	4	2	1	1	1	1

The diapause eggs of the strain C108 of *B. mori* laid within 10 minutes were collected at 24° C to obtain synchronous eggs batches. The eggs were treated with hot water (53° C) at 30 hours after oviposition. After the treatment, eggs were used to purify EA4 or kept at 25° C (R. H. was 75% - 85%) to see the head pigmentation. The purified enzyme was incubated at 25° C in sterilized plastic tubes for 6 hours. At appropriate intervals, aliquots were assayed for ATPase activity.

Les œufs à diapause de la souche C108 de *B. mori* ayant éclos au bout de 10 minutes sont recueillis à 24° C pour obtenir des lots d'œufs synchronisés. Les œufs sont traités avec de l'eau chaude (53° C) 30 heures après la ponte. Après le traitement, les œufs sont utilisés pour purifier EA4 ou conservés à 25° C (H. R. : 75 à 85 %) pour voir la pigmentation de la tête. L'enzyme purifiée est incubée à 25° C dans des tubes en plastique stérilisés pendant 6 heures. On analyse les aliquotes à des intervalles appropriés par rapport à l'activité ATPase.

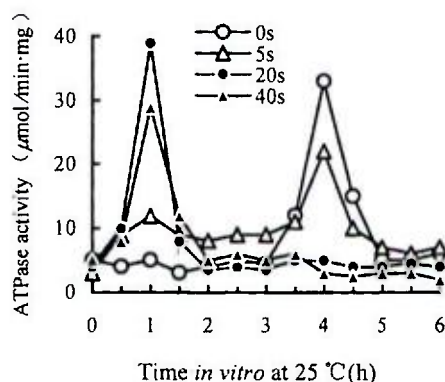


Fig. 5. Effects of hot water-stimulative dose on the ATPase activity for EA4.

EA4 purified from C108 silkworm hot water-treated eggs (53° C) 30 hours after oviposition at 25° C. The purified enzyme was incubated at 25° C in sterilized plastic tubes for 6 hours. At appropriate intervals, aliquots were assayed for ATPase activity.

Fig. 5. Effets de la dose d'eau chaude stimulante sur l'activité ATPase pour EA4.

EA4 purifiée à partir des œufs du ver à soie C108 traités à l'eau chaude (53° C) 30 heures après la ponte à 25° C. L'enzyme purifiée est incubée à 25° C dans des tubes en plastique stérilisés pendant 6 heures. Les aliquotes sont évaluées à des intervalles appropriés par rapport à l'activité ATPase.

To determine the ATPase activity of EA4 at short intervals, the inactive EA4 was first purified from the hot water-treated (53° C, 5 seconds) eggs (15 hours old at 25° C) and chilled at 5° C. A typical result is illustrated in Fig. 3. While the activity remained low for 12 hours, it suddenly increased reaching maximal activity at about hour 24 and then again dropped to its basal level. When incubated the purified EA4 at 25° C, the activity peak appeared at about hour 1 and then dropped to its basal level (Fig. 4). The assays were run at intervals of few hours, especially during the activity peak in Fig. 3 and Fig. 4.

The eggs of strain C108 (30 hours old at 25° C) were kept at 25° C (R. H. was 75% - 85%) after treatment with hot water (53° C). By increasing the stimulative dose (duration of soaking in hot water) in less than 20 seconds, the rate of eggs with head pigmentation has gone up and the period of incubation (from hot water-treatment to head pigmentation) tended to shorten. But the rate above has come down when the duration was over 20 seconds (Table I). The ATPase activity-peak for EA4 from 30 hours old eggs has appeared at an early time with the increase of the hot water stimulus (soaking duration) (Table I & Fig. 5).

The above results demonstrate that the activity change is such a rapid transition that enzyme activity could be detected only for a brief period.

DISCUSSION

EA4 is inactive in unchilled or acid-untreated diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. When the eggs are exposed to the cold (5° C) or treated with hydrochloric acid, the general esterase activity of EA4 suddenly increases at a certain time during the chilling period or after acid-treatment and then falls rapidly (Kai *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 1998a). This transitory burst in activity can also be observed *in vitro* (Kai *et al.*, 1987; 1988; Xu *et al.*, 1998b). The sudden elevation of EA4 activity *in vitro* was equivalent to that observed *in vivo* and was coincident with the chilling period that is known to be indispensable for diapause termination (Kai and Nishi, 1976; Kai *et al.*, 1984, 1995a), and that was also coincident with the activation of acid-treated eggs (Xu *et al.*, 1998a, 1998b). On this paper, the sudden elevation of ATPase activity for EA4 from hot water-treated eggs was coincident with activation of the eggs. The mechanism by which EA4 is activated still remains unknown, and the question of how ATPase activation is related to the resumption of embryogenesis is still unproved. The characterization of a time-zero setting mechanism, the mechanism of enzyme activation and the physiological function of the enzyme, are now under investigation.

REFERENCES

- CARTER S. G., KARL D. W. (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green and improvement and evaluation. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 7, 7-13.
- KAI H., NISHI K. (1976) Diapause development in *Bombyx* eggs in relation to esterase A activity. *J. Insect Physiol.* 22, 1315-1320.
- KAI H., KAWAI T., KANETO A., (1984) Esterase A4 elevation mechanism in relation to *Bombyx* (Lepidoptera: Bombycidae) egg diapause development. *Appl. Ent. Zool.* 19(1), 8-14.
- KAI H., KAWAI T., KAWAI Y. (1987) A time-interval activation of esterase A4 by cold relation to the termination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 17, 367-372.
- KAI H., MIAO Y., XU P. X., KAWAI T. (1988) Effective acid-treatment *in vitro* to elevate the time measuring esterase A4. *J. Seric. Sci. Jap.* 57(5), 313-317.
- KAI H., KAWASHIRI K., NAKASHIMA S., AZUMA M. (1995a) Fixed minimum duration of chilling critical to the termination of diapause and effects of longer chilling on hatching mode in *Bombyx* eggs. *J. Seric. Sci. Jan.* 64(2), 132-141.
- KAI H., KOTANI Y., MIAO Y., AZUMA M. (1995b) Time interval measuring enzyme for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 41(10), 905-910.
- XU S. Q. (1992) Studies on the mechanism and application of acid-treatment to activate diapause eggs of silkworm, *Bombyx mori*. China Science and Technology Publish House, 320-323.
- XU S. Q. (1994) Changes of nucleic acid and protein metabolism in acid-treated eggs. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 24(2), 95-99.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., SIMA Y. H., ZHU J., ZE Y. G., ZHANG Y. Q. (1998a) Changes of esterase A4-activity and its relationship with diapause in acid-treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 24(2), 95-99.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., CHEN X. L., SIMA Y. H., ZHENG B. P., YU X. H. (1998b) Effect of acid-treatment *in vitro* on ATPase activity of esterase A4. *China Sericulture*, (4), 13-16.

CHANGEMENTS DE L'ACTIVITE ESTERASE A4 AU COURS DE LA DIAPAUSE CHEZ LES OEUFs DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* TRAITEES A L'EAU CHAUDE

XU SHI-QING¹, HIDENORI KAI², XU JUN-LIANG³, SIMA YANG-HU¹, CHEN XI-LIN¹
& ZHENG BI-PING¹

1. Biotechnol. Lab. for Silkworm and Silk, School of Life Science, Soochow University, Suzhou 215006, Chine.

2. Faculty of Agricultural, Tottori University, Koyama, Tottori 680, Japon.

3. Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Chine.

Le traitement à l'eau chaude est une méthode importante pour l'éclosion artificielle des œufs de vers à soie. On a étudié au cours du temps l'estérase A4 (EA4) purifiée chez des œufs de la souche C108 de Bombyx traités à l'eau chaude en utilisant l'ATP comme substrat. Le pic d'activité ATPase de l'EA4 purifiée chez des œufs de 15 heures apparaît à l'heure 24 à 5° C ou 1 heure 30 après le traitement à 25° C et la diapause des œufs se termine rapidement. Le pic d'activité ATPase de l'EA4 chez les œufs de 30 heures apparaît plus tôt, la période d'incubation diminue et le taux de pigmentation de la tête des embryons se renforce, lorsqu'on augmente la stimulation à l'eau chaude (durée de trempage). Les changements de l'activité ATPase de l'EA4 chez les œufs traités à l'eau chaude sont fortement corrélés à l'activation des œufs.

INTRODUCTION

Bombyx mori cesse son développement et commence la diapause au stade de l'œuf. La diapause n'arrête pas immédiatement en réponse à des changements favorables de l'environnement. En général, l'exposition au froid ou le traitement avec de l'acide chlorhydrique ou le traitement avec de l'eau chaude sont essentiels pour achever la diapause. Le traitement à l'eau chaude est une méthode pratique de rupture de la diapause chez les œufs de *Bombyx*. Le traitement a un effet important sur l'éclosion artificielle dans l'industrie séricicole. Comprendre le mécanisme avec l'eau chaude est aussi une manière de découvrir une méthode d'éclosion artificielle plus utile. Cependant, on n'a pas encore prouvé le mécanisme de rupture de la diapause avec l'eau chaude. Nous avons étudié le mécanisme d'achèvement de la diapause à faible température et avec de l'acide chlorhydrique (Kai et Nishi, 1976 ; Kai et coll., 1995a ; Xu, 1991, 1992, 1994) et notre attention s'est concentrée sur l'estérase A4 (EA4) (Kai et coll., 1984, 1987, 1988, 1995b, Xu et coll., 1998a, 1998b). EA4 semble posséder la capacité de mesurer la durée de refroidissement et la dose stimulante d'acide. La question est donc de savoir si EA4 est similaire chez les œufs traités à l'eau chaude et chez les œufs refroidis ou traités à l'acide. En tentant de répondre à cette question, nous avons réalisé les expériences ci-dessous pour décrire les changements de l'activité EA4 en relation avec la diapause chez les œufs du ver à soie, *Bombyx mori* traités à l'eau chaude.

MATERIELS ET METHODES

Traitement à l'eau chaude :

Les œufs à diapause de la souche C108 de *B. mori* pondus en 10 min. sont recueillis à 24° C pour obtenir des lots d'œufs synchronisés. Les œufs sont traités avec de l'eau chaude (53° C) pendant 5

à 40 secondes, 15 heures ou 30 heures après la ponte à 25° C. Après le traitement, les œufs sont utilisés pour la purification d'EA4 ou sont conservés à 25° C (l'H. R. est de 75 à 85 %) pour observer la pigmentation de la tête. Les œufs non fécondés ou morts sont remplacés par des œufs normaux n'ayant pas été traités.

Purification de l'EA4 :

Après le traitement à l'eau chaude, 5g d'œufs sont immergés dans de l'acétone froide pendant la nuit. Après avoir jeté l'acétone, les œufs sont complètement broyés avec de nouveau de l'acétone froide à 30-vol. Le précipité obtenu par centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes est suspendu dans 15 ml de tampon véronal à 25 mmol / l (pH 7,5 ; 5,155 g de Barbitol-Na, 3,402g de CH₃COONa, environ 2ml de 6 mol. / l d'HCl pour ajuster le pH à un volume final de 1000 ml). La poudre restante est suspendue dans quelques millilitres de tampon. La suspension combinée (environ 20 ml.) est chauffée à 85° C pendant 15 minutes. On obtient le surnageant stable à la chaleur par centrifugation. Le précipité qui reste est à nouveau suspendu dans 5 autres ml de 25 mmol/l de tampon véronal (pH 7,5) et est à nouveau centrifugé. Les surnageants sont regroupés (c. 25ml) et amenés à 50 % de saturation avec du sulfate d'ammonium (ajusté exactement à un pH de 3,30 par HCl). Après avoir reposé pendant plus de 3 heures, la solution est centrifugée à 10 000 g pendant 30 minutes et on ajoute du sulfate d'ammonium solide au surnageant en tournant doucement jusqu'à 80 % de saturation. On réalise la purification jusqu'à une étape de saturation de sulfate d'ammonium à 80 % en 1 jour et l'étape suivante est également achevée en un jour.

Le précipité de sulfate d'ammonium saturé à 80 % est à nouveau lavé avec de l'acétone et puis du sulfate d'ammonium saturé à 80 %. Le précipité lavé est dissous dans 1 ml de tampon équilibrant à 25 mmol / l (pH 5,25 ; 4,856g de piperazine hexahydraté, 7,304 de 6 mol / l d'HCl dans un volume final de 1000 ml) et appliqué sur une colonne Sephadex G-25 (milieu), de 1,5 m × 30 cm qui a été équilibrée dans une chambre froide avec un tampon de piperazine-HCl. La vitesse d'élution du tampon est ajustée de 0,4 à 0,5 ml / min. EA4 est éluée après le volume mort et avant le sulfate d'ammonium (Fig. 1). Les fractions EA4 sont recueillies et concentrées à moins de 10 ml avec du Centricon-10TM (Amicon) et du C18 de Sep-Pak. Le Centricon-10TM est utilisé à moins de 2500 t/min dans toutes les expériences. L'échantillon concentré est à nouveau soumis à une chromatographie liquide sous haute pression sur un Pack-VMC de protéine-RP (Pharmacia). Les conditions chromatographiques sont : 25 % B pendant 5 minutes, gradient linéaire 25 à 35 % B pendant 40 minutes à une vitesse d'élution de 0,8 ml / min. où le solvant A est aqueux et contient 0,05 % (v / m) d'acide trifluoroacétique et le solvant B est 100 % d'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique. La préparation finale présente une bande unique colorée à l'argent après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium (Fig. 2).

Dosage de l'ATPase :

3,5 ml (équivalent à environ 4 µg de protéine) de la solution d'enzyme éluée avec le poly-tampon (pH 3,85) sont incubés à 5° C ou 25° C dans des tubes en plastique stérilisés. Des fractions de 40 µl sont dosées en adénosine triphosphatase (ATPase) à des intervalles appropriés. Tous les tubes d'incubation sont enduits de silicone. Le dosage de l'ATPase est une modification de la procédure de Carter et Karl (1982). Le mélange fait une solution A de 4-vol. à 2 mol / l d'HCL et de 3-vol. de NaMoO₄ à 0,23 mol. La solution B est 0,042 % (p/v) d'oxalate de vert de malachite dans 1 % (p/v) de polyvinyl alcool. La solution C est à 8 % (v/v) d'H₂SO₄. Le sel libre d'adénosine 5'-triphosphate Tris (hydroxyméthyl) aminométhane vanadium (Sigma) est utilisé comme substrat et on fait une solution à 50 mmol/l avec le tampon de réaction au pH de 7,4 [25 mmol/l 2-hydroxyethyl piperazine-N'-2- acide ethanesulfonique (HEPES) 12,5 mmol / l Trizma Base ; 50 mmol / l de NaCl ; 20 mmol / l de KCl ; 1,0 mmol / l d'éthylène diamine tetra acide acétique disodium (EDTA 2Na) et 100 µg / ml d'ADN de saumon]. L'ADN de saumon a un effet sur l'activation d'EA4. Un échantillon de 20 µl de la solution substrat à 50 mmol / l de solution substrat est ajouté à 340 µl du tampon de

réaction (pH de 7,4) et puis 40 μ l de solution d'enzyme sont ajoutés à ce mélange de réaction (2,5 mmol / l d'ATP à la concentration finale). Le mélange de réaction est incubé à 25° C pendant 30 minutes et le phosphate inorganique libéré est déterminé d'après la description ci-dessous. Les 400 μ l de mélange de réaction sont ajoutés à 280 μ l de solution A et mélangés immédiatement avec 120 μ l de solution B. Après mélange, on laisse reposer pendant exactement 2 minutes à 25° C pour le développement de la couleur, puis 800 μ l de solution C sont ajoutés et mélangés avec soin. On laisse ce mélange reposer à température ambiante pendant 1 heure pour terminer le développement de la couleur, après quoi on lit les absorptions à 625 nm.

RESULTATS

Les œufs à diapause traités à l'eau chaude (53° C, 5 secondes) (âgés de 15 h à 25° C) sont conservés à 25° C (H. R. de 75 à 85 %) pour observer le développement embryonnaire. Le taux de pigmentation de la tête des œufs est de 98,5 % le 9^{ème} jour et l'éclosion est de 97,1 % le 11^{ème} jour après le traitement. Le traitement à l'eau chaude a un effet important sur l'activation des œufs à diapause.

Pour déterminer l'activité ATPase d'EA4 à de courts intervalles, on purifie d'abord l'EA4 inactif chez des œufs (âgés de 15 heures à 25° C) traités à l'eau chaude (53° C, 5 secondes) et refroidis à 5° C. Un résultat typique est illustré dans la Fig. 3. Alors que l'activité demeure faible pendant 12 heures, elle augmente soudainement et atteint un maximum à la 24^{ème} heure environ et puis elle baisse à son niveau de base. Quand on incube, l'EA4 purifiée à 25° C, le pic d'activité apparaît à la première heure et puis baisse à son niveau de base (Fig. 4). Les dosages sont effectués à des intervalles de quelques heures, surtout pendant l'activité maximale de la Fig. 3 et de la Fig. 4.

Les œufs de la souche C108 (âgés de 30 heures à 25° C) sont conservés à 25° C (l'H. R. est de 75 à 85 %) après le traitement à l'eau chaude (53° C). En augmentant la dose de stimulation (durée de trempage dans l'eau chaude) sans dépasser 20 secondes, le taux d'œufs à la tête pigmentée augmente et la période d'incubation (du traitement à l'eau chaude à la pigmentation de la tête) tend à raccourcir. Mais ce taux diminue quand la durée dépasse 20 secondes (Tableau I). L'activité ATPase pic de l'EA4 chez les œufs âgés de 30 heures apparaît à un moment précoce avec l'augmentation de la stimulation par l'eau chaude (durée de trempage) (Tableau I & Fig. 5).

Les résultats ci-dessus montrent que le changement d'activité est une transition tellement rapide que l'activité de l'enzyme ne peut être détectée pendant une courte période.

DISCUSSION

EA4 est inactive chez les œufs à diapause du ver à soie, *Bombyx mori* non refroidis ou non traités à l'acide. Quand les œufs sont exposés au froid (5° C) ou traités avec de l'acide chlorhydrique, l'activité estérase générale d'EA4 augmente soudainement à un certain moment pendant la période de refroidissement ou après le traitement à l'acide et puis baisse rapidement (Kai et coll., 1984 ; Xu et coll., 1998a). Cette explosion transitoire d'activité peut aussi être observée *in vitro* (Kai et coll., 1987 ; 1988 ; Xu et coll., 1998b). L'élévation soudaine de l'activité EA4 *in vitro* est équivalente à celle observée *in vivo* et coïncide avec la période de refroidissement que l'on sait être indispensable pour l'achèvement de la diapause (Kai et Nishi, 1976 ; Kai et coll. 1984, 1995a), elle coïncide aussi avec l'activation des œufs traités à l'acide (Xu et coll., 1998a, 1998b). Dans cet article, la soudaine augmentation de l'activité ATPase d'EA4 chez les œufs traités à l'eau chaude coïncide avec l'activation des œufs. On ne connaît toujours pas le mécanisme d'activation d'EA4 et il n'a toujours pas été prouvé comment l'activation de l'ATPase est liée à la reprise de l'embryogénèse. On étudie maintenant les caractères du mécanisme de fixation du moment zéro, le mécanisme d'activation de l'enzyme et la fonction physiologique de l'enzyme.

EFFECTS OF VITAMIN C ON FEEDING HABIT AND GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

CUI W.-Z., SHANG J.-Y., WANG B. & CHENG A.-W.

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

Effects of vitamin C (VC) on feeding habit as well as a growth and development were investigated under the condition of dry pellet artificial diet in which water solution of additive VC was absorbed directly. The results suggested that low concentration of VC possessed no obvious effects on feeding habit of silkworms and could not decrease the adverse action of feeding deterrent. The feeding habit was restrained when VC levels were up to a certain concentration. VC showed no marked promotion effects on feeding at any concentration. A suitable amount of VC was necessary for growth and development of silkworms while when the amount was beyond a certain concentration the growth and development of young silkworms would be restrained and the survival rate would decrease. In view of feeding habit and growth and development of silkworms, the suitable amount of additive VC was about 0.2%-0.3% of dry matter weight of the pellet artificial diet.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., vitamin C, feeding habit, growth and development, pellet artificial diet.

INTRODUCTION

Ito reported that vitamin C was a necessary nutrient and an important phagostimulant of the silkworm and should be added to artificial diet as an essential component (Ito, 1961a, 1961b). We disclosed by electrophysiological method that the sensillum styloconicum SS-I and SS-II on maxillary tubercle of silkworm showed sensitively electrophysiological responses to VC and to sucrose and inositol (Cui *et al.*, 2001). However, these phenomena might not reflect the direct effects of VC on feeding habit and growth and development. In this paper, the effects of VC on feeding habit and growth and development were investigated by bio-assay method based on pellet artificial diet.

MATERIALS AND METHODS

1. Recipe and preparation of artificial diet:

Recipe of artificial diet:

There were four recipes of artificial diet used in the experiment. The compositions of these diets are presented in Table I. A represented the common recipe of pellet artificial diet, B the common recipe of pellet diet without additive VC, C and D represented the simplified recipe of pellet diet and cooking diet for studying feeding habit. When the substances for the test were added, the amounts of corn powder and corn amyllum were reduced correspondingly.

The analytical pure VC (L-ascorbic acid, purity 99.7%, Bio Life Science & Technology Co. Ltd. Shanghai, China) was used in this experiment.

Preparation of pellet diet:

All the raw materials were weighed out according to the recipes and after being mixed thoroughly they were made into dry pellet diet about 4 mm in diameter with extruding and bulging machine. When silkworms were reared, sterile water was added to the dry diet, with its volume 1.8 times of the dry diet weight and the time of absorption was about 1 hr. According to the design, the fixed amount of VC was dissolved in water and then entered into the dry diet when the experiment was carried out. We stated the additive amount of VC with the percentage occupied by the dry matter weight of diet and the percentage ranged from 0% ~ 4%.

Preparation of cooking diet:

The diet was produced according to recipe D in Table I. The proportion of dry matter to sterile water was 1:1.8. The raw materials were put in a petri dish and they were hydrated and mixed into a plate shape. The diet was heated at 100° C for 20 minutes and then cooled down and preserved.

2. Silkworms for the test:

The common silkworm variety Jingsong × Haoyue and the polyphagous variety Zazhong × 181 were used in the experiment. The newly-hatched larvae were collected and reared with the diet from Recipe A (see Table I) until the fourth moult. Uniformly developed female individuals were selected at random and used for the feeding test after being starved for about 10 hrs.

3. Investigation and calculation of feeding habit:

After the silkworms above took the diet for 8-10 hours at 29° C and relative humidity of 95% in the dark, the amount of faeces was investigated. Taking as 100% the amount of faeces of the silkworms that ate the diet without additive VC, we calculated the amount index of faeces of each plot. The indexes were considered as the indirect target for feeding habit (being called relative feeding habit index) (Ito, 1960). For each plot of tests, there were three replications and in each replication there were 10 female larvae. The mean numerical values of relative feeding habit of the three replications were calculated.

4. Rearing of young silkworms and investigation of growth and development:

The newly-hatched larvae were put on the diet from Recipe B (see Table I) which contained VC at various concentrations in the petri dish. Diet was replaced once in 1-2 instars. The 1-2 instars larvae were reared closely at 30° C, 95% R. H. in the dark. After rearing newly-hatched larvae for a certain time, the rate of setae dispersion (which refers to the ratio of setae-dispersed individuals to the total individuals investigated), the weight of moulted body, the rate of newly moulted larvae and the survival rate were investigated respectively. The treatments were replicated 3 times and 50 newly-hatched larvae were taken as one testing sample. The data were treated by Duncan's method.

RESULTS**1. Effect of additive amount of VC in pellet diet from common recipe on feeding habit of silkworms:**

The pellet diet was prepared according to Recipe B in Table I. As was shown in Fig. 1, in the range of 0.5% - 4%, VC showed no effect on stimulating feeding for both the common variety and the polyphagous variety, on the contrary it had an obvious inhibitory action. On the whole, Jingsong × Haoyue showed more sensitive than Zazhong × 181 did. This was completely different from the previous studies.

Table I. The basic recipe of artificial diet in the test.**Tableau I. Recette de base de l'aliment artificiel dans l'expérience.**

Number of Recipe	Mulberry powder	Soybean powder*	Corn powder	Corn amylum	Mixture**	VC
Recette	Poudre de mûrier	Poudre* de soja	Poudre de maïs	Amylum de maïs	Mélange **	
A	31.3	31.3	31.3		5.1	1.0
B	31.3	31.3	32.3		5.1	
C	15.0		85.0			
D	15.0			85.0		

* The soybean powder used in the experiment was defatted / La poudre de soja utilisée dans l'expérience est dégraissée.

** Mixture contained citric acid, gallic acid, sorbic acid, vitamin B mixture, emplastie, inorganic salt mixture, etc. / Le mélange contient de l'acide citrique, de l'acide gallique, de l'acide sorbique, un mélange de vitamine B, de l'emplastique, un mélange de sels, etc...

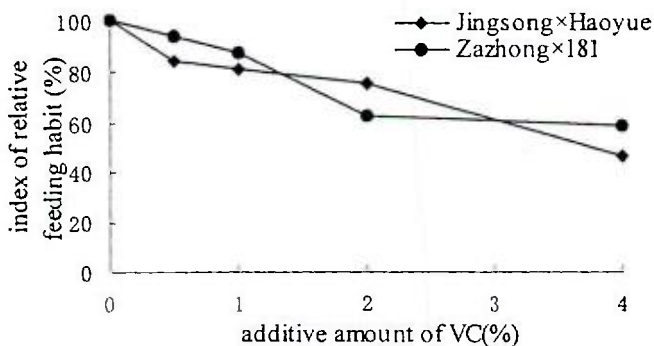


Fig. 1. Effects of additive amount of VC in pellet artificial diet on feeding habit of silkworms.

Fig. 1. Effets d'une quantité supplémentaire de Vitamine C dans l'aliment artificiel sous forme de pastille sur le nourrissage des vers à soie.

2. Effects of additive amount of VC in simplified diet on feeding habit of silkworms:

In order to reflect clearly the relationship between VC and feeding habit of silkworms, the experiment was carried out with the simplified Recipe C and Recipe D in Table I and we used pellet diet and cooking diet respectively. Jingsong × Haoyue was employed in the test. The results obtained in this test had the same trend as those mentioned above. With the amount of VC increasing, the relative feeding habit decreased both in the silkworms reared with the pellet diet and in those reared with the cooking diet, and the decreasing extent became more obvious than that of the silkworms reared with the common recipe diet (Recipe B). The results are shown in Fig. 2.

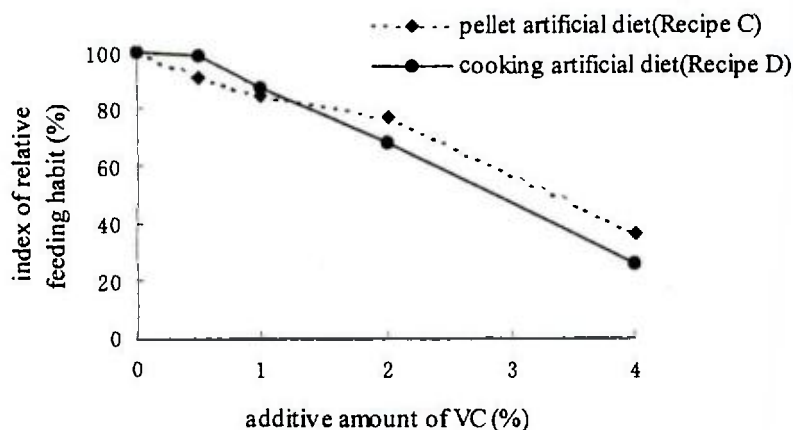


Fig. 2. Effects of additive amount of VC simplified recipe on feeding habit of silkworms.

Fig 2. Effet de quantités supplémentaires de Vitamine C avec la recette simplifiée sur le comportement alimentaire des vers à soie.

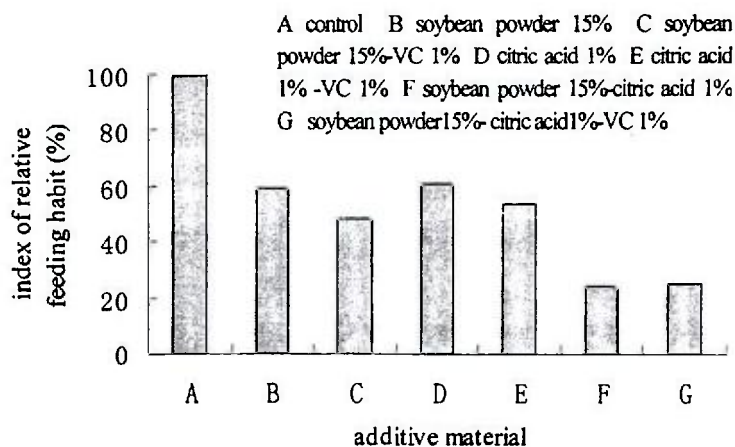


Fig. 3. Effects of mixed additions of VC, soybean powder and citric acid on feeding habit of silkworms.

Fig 3. Effet des ajouts de mélanges de Vitamine C, de poudre de soja et d'acide citrique sur le comportement alimentaire du ver à soie.

3. Effects of mixed additions of VC and inhibitor on feeding habit of silkworms:

It had been reported that soybean powder and citric acid in the common recipe of artificial diet showed an inhibitory effect on silkworm feeding (Ito *et al.*, 1975; Hirao, 1978; Cui *et al.*, 1998, 1999). We had found that feeding stimulus such as mulberry powder, sucrose, inositol could diminish the inhibitory effect (Cui *et al.*, 2002). In the experiment, we added VC, soybean powder and citric acid at the same time to the diet from Recipe D in Table I and investigated the effect of VC on inhibitory action. The results are shown in Fig. 3, which indicate that both single addition of soybean powder and of citric acid and mixed addition of them, resulted in a marked decrease of feeding habit. When VC was added further to the diet, the feeding habit showed a decreasing tendency rather than an increasing one. It meant that VC could not diminish the inhibitory action of soybean powder and citric acid.

4. Effects of additive amount of VC in pellet artificial diet on growth and development of young larvae:

Investigating the effect of the additive amount of VC on feeding habit as well as growth and development of young larvae reared with the pellet artificial diet from Recipe B in Table I, we obtained the results shown in Table II.

Table II. Effects of additive amount of VC in pellet artificial diet on growth and development of I-2 instars larvae.

Tableau II. Effets d'un ajout supplémentaire de VC dans l'aliment artificiel en pastille sur la croissance et le développement des larves des 1^{er} et 2^{ème} âges.

Additive amount of VC (%)	0	0.5	1.0	2.0	4.0
<i>Quantité supplémentaire de VC (%)</i>					
24 hour setae dispersion rate (%) <i>Taux de dispersion des soies à 24 h (%)</i>	90.0 ± 4.3 a	80.7 ± 5.2 b	75.1 ± 3.1 b	67.3 ± 4.9 bc	55.0 ± 3.8 d
Weight of moulted body of 1 st instar <i>Poids du corps en mue du 1^{er} âge (mg)</i>	5.4 ± 0.8 ab	6.0 ± 0.4 a	6.2 ± 0.6 a	5.2 ± 0.6 b	4.0 ± 0.4 c
120 hour newly moulted larva rate of 2 nd instar (%) <i>Taux de nouvelle mue des larves du 2^{ème} âge au bout de 120 heures (%)</i>	58.0 ± 9.3 a	57.3 ± 10.2 a	39.3 ± 5.5 b	13.3 ± 5.6 c	0.7 ± 0.3 d
120 hour survival rate (%) <i>Taux de survie au bout de 120 heures (%)</i>	94.7 ± 6.3 a	84.7 ± 7.9 b	75.3 ± 10.6 b	58.0 ± 7.8 c	20.7 ± 5.3 d
Weight of moulted body of 2 nd instar (mg) <i>Poids du corps en mue du 2^{ème} âge (mg)</i>	22.5 ± 2.2 ab	24.2 ± 3.1 a	24.8 ± 2.6 a	22.0 ± 2.5 b	-
192 hour newly moulted larva rate of 3 rd instar (%) <i>Taux de larves du 3^{ème} âge nouvellement mues au bout de 192 h (%)</i>	50.0 ± 6.8 a	34.0 ± 7.5 b	14.0 ± 3.2 c	0.7 ± 0.3 d	0.0 e
192 hour survival rate (%) <i>Taux de survie à 192 h (%)</i>	74.0 ± 9.9 a	42.7 ± 8.9 b	22.0 ± 7.4 c	7.3 ± 2.3 d	0.0 c

Data within the same line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test) / Les données sur la même ligne suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (niveau = $P < 0,05$ d'après le test de Duncan).

Table III. Effects of additive amount of VC in pellet artificial diet on growth and development of 1st instar larva.*Tableau III. Effets de la quantité supplémentaire de vitamine C dans l'aliment artificiel en pastille sur la croissance et le développement des larves du 1^{er} âge.*

Additive amount of VC (%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
<i>Quantité supplémentaire de VC (%)</i>						
24 hour setae dispersion rate (%) <i>Taux de dispersion des soies à 24 h (%)</i>	88.7 ± 10.2 a	88.0 ± 8.6 a	89.3 ± 8.6 a	89.3 ± 6.3 a	89.3 ± 9.5 a	86.0 ± 5.9 a
Weight of moulted body of 1st instar (mg) <i>Poids du corps en mue du 1^{er} âge (mg)</i>	5.1 ± 0.4 a	5.6 ± 0.4 a	5.9 ± 0.6 a	5.8 ± 0.5 a	6.0 ± 0.3 a	5.6 ± 0.5 a
120 hour newly moulted larva rate of 2 nd instar (%) <i>Taux de nouvelle mue au bout de 120 h du 2^{ème} âge (%)</i>	53.3 ± 11.3 a	51.3 ± 6.8 a	54.0 ± 8.8 a	55.3 ± 9.4 a	45.3 ± 7.3 b	44.0 ± 9.8 b
120 hour survival rate (%) <i>Taux de survie au bout de 120 heures (%)</i>	87.3 ± 6.1 a	83.3 ± 11.2 a	81.3 ± 8.5 a	86.0 ± 7.9 a	83.3 ± 9.0 a	84.7 ± 9.3 a

Data within the same line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$ level by Duncan's multiple range test) / Les données sur la même ligne suivies par des lettres différentes sont significativement différentes (seuil de $P < 0,05$ d'après le test de Duncan).

According to Table II, with the increase of the additive amount of VC, three indexes, namely setae dispersion rate of newly-hatched larvae, newly moulted larvae rate, survival rate were all reduced. Especially, when the additive amount reached 4.0%, all silkworms died at the second moult. As for the weight of moulted body, the heavier ones were located in the plots of VC additive amount of 0.5%-1.0%.

Next, cutting down the VC additive amount to 0.1%-0.5% and observing the results on 1st instar larvae growth and development (Table III), we found that there were no marked differences between six plots in setae dispersion rate and survival rate. While the silkworms' weight in treated plots were heavier at different levels than those in control plot. There were no obvious discrepancies for the newly moulted larva rate of 2nd instar in the plots when VC added amount ranged from 0% to 0.3% and if VC amount was beyond 0.3%, the newly moulted larvae rate dropped remarkably.

DISCUSSION

The fact that VC is an essential nutrient and a phagostimulant for the silkworm is accepted widely after the report on the need of VC in silkworms was given by Ito in 1960s (Ito, 1961a, 1961b).

However, the previous studies concerned were all based on the steam cooking artificial diet. We know in the process of steaming, the high temperature will degrade the major part of VC. Therefore, the accuracy of their results is open to question. In this experiment, we made use of dried pellet artificial diet into which water solution of VC was absorbed directly. Without the steaming and its high temperature, the physical and chemical properties as well as the organism activity were preserved, so the direct physiological effect of VC for silkworms were disclosed better.

Making a comprehensive survey of the results above, we had a completely different conclusion from Ito's. The feeding habit of silkworm was little affected by a low concentration of VC. And beyond a certain concentration, the inhibitory effect appeared notably. There was no feeding promotion with any concentration of VC. At the same time, VC could not decrease the feeding inhibitory effect of feeding inhibitors.

About the effect on growth and development of young larvae, the suitable concentration of VC increased the weight of silkworm body but did little with respect to development. On the contrary, when VC was beyond a certain dosage, the development of young larvae was restrained distinctly and the survival rate dropped seriously. Another finding in this experiment was that the stickiness rose and that the diet turned black for the sake of the oxidation of VC when its amount reached 0.5% in pellet artificial diet. Particularly, if the additive amount of VC was beyond 1%, the stickiness was very clear and this would have influenced the larval feeding notably. Maybe this was one of the key reasons for the reduction of feeding habit and survival rate. However, when VC amount in pellet diet was less than 0.5% or the steaming diet was used instead, the addition of VC did not result in the raise of diet stickiness but the setae dispersion rate of newly-hatched larvae did not increase, and the relative feeding habit of grown silkworm went down equally. This indicated VC had no effect on promoting feeding in silkworms. Meanwhile, the product of degradation of VC in cooking diet after steaming might inhibit the feeding habit.

We drew conclusions by electrophysiological method that not only the discharge pulse was produced by VC in SS-I and SS-II perceptive organ, but that there was also an inhibition or an interference between VC and the key factors which promoted feeding such as sucrose and inositol (Cui *et al.*, 2001). In addition, there was a restraint effect on silkworms by organic acids (citric acid, sorbic acid, acetic acid, phosphoric acid, etc) and inorganic acid (Cui *et al.*, 1998). The reason lies in that the sugar perceptive cells and inositol perceptive cells in silkworm SS-I receptors could be restrained by citric acid (Hirao, 1978). Because VC itself is a kind of acid material, it may do the same work just like citric acid. Therefore, as an essential nutrient and an acid material, VC affects the silkworm's feeding complicatedly.

We also found in this experiment that after the 3rd instar the growth and development were increasingly restrained, that the death rate raised promptly, that most of the silkworms could not spin and pupate, when pellet artificial diet without additive VC was used during all instars. If we added proper amounts of VC to pellet artificial diet in all instars, silkworms grew and developed normally and finished their cycle. We can conclude that VC is necessary for silkworm's growth and development. The reason why there is no obvious promotion effect of VC in young larval development lies in the fact that VC can be handed down from embryos to newly-hatched larvae; besides, there is a small amount of VC in diet material. This part of VC may meet the short-term need of young larvae but it cannot do it long enough. In general, according to feeding habit as well as growth and development of silkworms, the additive amount of VC is suitable when VC amounts to 0.2%-0.3% of the dry matter weight of the pellet artificial diet, which is less than that in steam cooking diet at the moment (1% or so).

REFERENCES

- CUI WEI-ZHENG, XU JUN-LIANG & WU XIAO-FENG (1998) Studies on individual difference of silkworm in feeding response. *Acta Sericologica Sinica*, 24(2), 75-80.

- CUI WEI-ZHENG, WANG YAN-WEN & LI WEI-GUO (1999) Inhibiting mechanism and physicochemical properties of eating repellent factor to silkworm in soybean meal. *Acta Sericologica Sinica*, 25(2), 102-107.
- CUI WEI-ZHENG, WANG YAN-WEN & MU ZHI-MEI (2001) Gustation electro-physiological response to vitamin C of silkworm. *Acta Sericologica Sinica*, 27(2), 92-95.
- CUI WEI-ZHENG, SHANG JIN-YAN & LIU XUN-LI (2002) Effect of mutual reaction between promoters and inhibitors on silkworm feeding habit. *Acta Sericologica Sinica*, 28(1), 35-38.
- HIRAO T. (1978) Gustatory and feeding responses to the artificial diet in the silkworm, *Bombyx mori* II. The effect of feeding deterrents. *J. Sericult. Sci. Japan*, 47(3), 186-192.
- ITO T. (1960) Effect of sugars on feeding of larva of the silkworm, *Bombyx mori* *J. Insect Physiol.* 5:95-101.
- ITO T. (1961a) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*. IV. Effect of ascorbic acid. *Bull Sericul. Exp. Sta.*, 17(1), 119-136.
- ITO T. (1961b) Effect of dietary ascorbic acid on the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 192(4906), 951-952.
- ITO T., HORIE Y. & NAKASONE S. (1975) Deterrent effect of soybean meal on feeding of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 21(5): 995-1006.

EFFETS DE LA VITAMINE C SUR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE, LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

CUI W.-Z., SHANG J.-Y., WANG B. & CHENG A.-W.

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

Nous avons étudié les effets de la vitamine C (VC) en ajoutant à l'aliment artificiel une solution aqueuse de vitamine C qui est absorbée directement sur le comportement alimentaire ainsi que sur la croissance et le développement. Les résultats suggèrent qu'une faible concentration en vitamine C n'a aucun effet évident sur l'habitude alimentaire des vers à soie et ne peut pas diminuer l'action des substances freinant l'alimentation. La prise alimentaire diminue quand les niveaux de VC atteignent une certaine concentration. La VC n'a pas d'effet promoteur marqué de l'alimentation à aucune concentration. Une quantité supplémentaire de VC est nécessaire pour la croissance et le développement des vers à soie tandis que quand la quantité atteint une certaine concentration, la croissance et le développement des jeunes vers à soie peuvent être restreints et le taux de survie peut baisser. La quantité supplémentaire adaptée de vitamine C par rapport à la prise alimentaire et à la croissance et au développement des vers à soie est d'environ 0,2 % à 0,3 % du poids de matière sèche de l'aliment artificiel.

INTRODUCTION

Ito a signalé que la vitamine C est un nutriment nécessaire et un phagostimulant important du ver à soie et qu'elle devrait être ajoutée comme un des composants essentiels de l'aliment artificiel (Ito, 1961a, 1961b). Nous avons révélé grâce à une méthode électrophysiologique que le sensillum styloconicum SS-I et SS-II sur le tubercule maxillaire du ver à soie présente des réponses électrophysiologiques qui montrent une sensibilité à la VC, au saccharose et à l'inositol (Cui et coll., 2001). Cependant, ces phénomènes pourraient ne pas refléter les effets directs de la VC sur l'habitude alimentaire et la croissance et le développement. Dans cet article, nous avons étudié les effets de la VC sur l'habitude alimentaire et la croissance et le développement grâce à une évaluation biologique sur milieu artificiel.

MATERIELS ET METHODES

1. Recette et préparation de l'aliment artificiel :

Recette du milieu artificiel :

Dans cette expérience, nous utilisons quatre recettes de milieu artificiel. Les compositions de ces milieux sont présentées dans le Tableau I. A représente la recette habituelle du milieu artificiel, B la recette habituelle du milieu sans ajout de VC, C et D représentent la recette simplifiée du milieu artificiel et de cuisson de l'aliment pour étudier l'habitude alimentaire. Quand on ajoute les substances pour le test, on réduit les quantités de poudre de maïs, et d'amylum de maïs de manière correspondante.

Nous utilisons de la VC analytique pure (acide ascorbique L, pureté 99,7 %, Bio Life Science & Technology Co. Ltd, Shanghai, Chine).

Préparation de l'aliment artificiel :

Tous les matériaux bruts sont pesés en fonction des recettes et après avoir été soigneusement mélangés ils sont transformés en pastilles d'environ 4 mm de diamètre avec une machine à extruder et à bomber. Lors de l'élevage des vers à soie, on ajoute de l'eau stérile au milieu artificiel, à raison de 1,8 fois le volume du poids du milieu artificiel et la durée d'absorption est d'environ 1h. Lors de l'expérience, la quantité fixe de VC est dissoute dans l'eau et intégrée au milieu artificiel sec selon la recette. Nous avons évalué la quantité de VC supplémentaire, qui est comprise entre 0 et 4 % du poids de matière sèche.

Préparation de la cuisson du milieu :

Le milieu est produit selon la recette D du Tableau I. La proportion de matière sèche par rapport à l'eau stérile est de 1 : 1,8. Les matières premières sont placées dans une boîte de Petri et sont hydratées et mélangées en les aplatissant. L'aliment est chauffé à 100° C pendant 20 minutes et puis refroidi et conservé.

2. Vers à soie utilisés pour l'essai :

La variété de vers à soie courante Jingsong × Haoye et la variété polyphage Zazhong × 181 sont utilisées dans l'expérience. Les larves nouvellement écloses sont recueillies et élevées avec l'aliment de la Recette A (voir Tableau I) jusqu'à la quatrième mue. Les individus femelles uniformément développés sont sélectionnés au hasard et utilisés pour le test alimentaire après avoir été affamés pendant environ 10 heures.

3. Etude et calcul de l'alimentation :

Nous étudions la quantité d'excréments après que les vers à soie ci-dessus aient ingurgité le milieu pendant 8 à 10 heures à 29° C et avec une humidité relative de 95 % dans l'obscurité. Nous considérons que 100 % représente la quantité d'excréments des vers à soie qui ont mangé le milieu sans VC supplémentaire et nous calculons l'indice de quantité d'excréments pour chaque lot. Les indices sont considérés comme l'indice indirect de la consommation alimentaire (et sont appelés indice de consommation alimentaire relatif) (Ito, 1960). Pour chaque lot d'essais, il y a trois répétitions et dans chaque répétition, il y a 10 larves femelles. On calcule les valeurs numériques moyennes pour la consommation alimentaire relative des trois répétitions.

4. Elevage des jeunes vers à soie et étude de la croissance et du développement :

Les larves nouvellement écloses sont mises sur l'aliment de la Recette B (voir Tableau I) qui contient de la VC à des concentrations variées dans la boîte de Pétri. Le milieu est remplacé une fois pendant les 1^{er} et 2^{ème} âges. Les larves des 1^{er} et 2^{ème} âge sont élevées attentivement à 30° C, et avec 95 % d'H. R. dans l'obscurité. Après avoir élevé les larves nouvellement écloses pendant un certain temps, nous avons étudié respectivement le taux de dispersion des soies (qui se réfère au taux d'individus aux soies dispersées par rapport à la totalité des individus étudiés), le poids du corps en mue, le taux de larves venant de muer, et le taux de survie. Les traitements sont répétés 3 fois et 50 larves venant d'éclore sont prises comme échantillon test. Les données sont traitées d'après la méthode de Duncan.

RESULTATS

1. Effet de la quantité supplémentaire de VC dans la recette courante de l'aliment en pastille sur la consommation alimentaire des vers à soie :

L'aliment artificiel est préparé selon la recette B dans le Tableau I. Comme le montre la Fig. 1, entre 0,5 % et 4 %, la VC ne présente pas d'effet sur la stimulation de l'alimentation à la fois pour la variété courante et la variété polyphage, au contraire elle a une action inhibitrice évidente. Dans

l'ensemble, Jingsong × Haoyue est plus sensible que Zazhong × 181. Ceci est complètement différent des études précédentes.

2. Effets de la quantité supplémentaire de VC dans le milieu simplifié sur l'habitude alimentaire des vers à soie :

Pour éclairer la relation entre la VC et l'habitude alimentaire des vers à soie, nous avons réalisé l'expérience avec la recette simplifiée C et la recette D dans le Tableau I et nous avons utilisé respectivement le milieu en pastille et le milieu cuit. Jingsong × Haoyue est employé dans le test. Les résultats obtenus dans le test présentent la même tendance que ceux présentés ci-dessus. Quand la quantité de VC augmente, la consommation alimentaire relative baisse à la fois chez les vers à soie élevés avec l'aliment en pastille et chez ceux élevés avec l'aliment cuit et le degré de baisse est plus évident que celui pour les vers à soie élevés avec la recette courante du milieu (Recette B). Les résultats sont présentés sur la Fig. 2.

3. Effet d'ajouts de mélanges de VC et inhibition de la consommation alimentaire des vers à soie :

On a rapporté que la poudre de soja et l'acide citrique inhibent l'alimentation du ver à soie avec la recette courante du milieu artificiel (Ito et coll., 1975 ; Hirao, 1978 ; Cui et coll., 1998, 1999). Nous avons trouvé que les stimulants de l'alimentation tels que la poudre de mûrier, le saccharose, l'inositol pouvaient diminuer l'effet inhibiteur (Cui et coll., 2002). Dans l'expérience, nous avons ajouté de la VC, de la poudre de soja, et de l'acide citrique au même moment à l'aliment de la recette D et étudié l'effet de la VC sur l'action inhibitrice. Les résultats sont présentés sur la Fig. 3 : ils indiquent que l'addition unique de poudre de soja et d'acide citrique et leur ajout mélangé, entraînent une baisse marquée de la consommation alimentaire. Quand on ajoute plus de VC à l'aliment, la consommation alimentaire présente une tendance à la baisse plus qu'une tendance à la hausse. Cela signifie que la VC ne peut pas diminuer l'action inhibitrice de la poudre de soja et de l'acide citrique.

4. Effets de l'ajout supplémentaire de VC dans l'aliment artificiel sur la croissance et le développement des jeunes larves :

L'étude de l'effet de l'ajout supplémentaire de VC sur l'habitude alimentaire ainsi que sur la croissance et le développement des jeunes larves élevées avec l'aliment artificiel en pastille de la Recette B nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le Tableau II.

Selon le Tableau II, avec l'augmentation de la quantité de VC, trois indices à savoir, le taux de dispersion des soies des larves néonates, le taux de larves venant de muer, le taux de survie diminuent tous. Surtout quand la quantité supplémentaire atteint 4 %, puisque tous les vers à soie meurent à la deuxième mue. En ce qui concerne le poids du corps en mue, les plus lourds se situent dans les lots comprenant un ajout de VC de l'ordre de 0,5 % à 1 %.

En réduisant la quantité supplémentaire de VC de 0,1 à 0,5 % et en observant les résultats sur la croissance et sur le développement des larves du 1^{er} âge (Tableau III), nous avons trouvé qu'il n'y avait pas de différence marquée entre les six lots pour le taux de dispersion des soies et le taux de survie. Tandis que le poids des vers à soie des lots traités est plus élevé avec les différents niveaux que celui des lots témoins. Il n'y a pas de différence évidente pour le taux de larves nouvellement muées du 2^{ème} âge chez les lots où l'ajout de VC est compris entre 0 % et 0,3 % mais lorsque la quantité de VC dépasse 0,3 % le taux de larves venant de muer baisse considérablement.

DISCUSSION

Depuis le rapport de Ito dans les années 60 sur le besoin des vers à soie en VC, il est couramment accepté que la VC est un nutriment essentiel et un phagostimulant du ver à soie (Ito, 1961a, 1961b). Cependant, les études précédentes à ce sujet étaient toutes basées sur le milieu artificiel cuit à la

vapeur. Nous savons que pendant le processus de cuisson à la vapeur, la température élevée dégrade la plupart de la VC. La véracité de ces résultats est donc sujette à questionnement. Dans cette expérience, nous avons utilisé le milieu artificiel séché en pastille dans lequel la solution aqueuse de VC est directement absorbée. Sans la cuisson à la vapeur et la température élevée, les propriétés chimiques et physiques ainsi que l'activité de l'organisme sont préservées on a donc un meilleur aperçu de l'effet physiologique direct de la VC chez les vers à soie.

En analysant les résultats ci-dessus, nous avons abouti à une conclusion complètement différente de celle de Ito. L'habitude alimentaire du ver à soie est peu affectée par une faible concentration en VC. Et au-delà d'une certaine concentration, l'effet inhibiteur est notoire. Il n'y a pas de promotion de l'alimentation avec aucune des concentrations en VC. Au même moment, la VC ne peut pas diminuer l'effet d'inhibition de l'alimentation des inhibiteurs alimentaires.

En ce qui concerne l'effet de la concentration adaptée en VC sur la croissance et le développement des jeunes larves, on constate qu'elle augmente le poids du corps du ver à soie mais a peu d'influence sur le développement. Au contraire, quand la VC atteint une certaine dose, le développement des jeunes larves diminue distinctement et le taux de survie baisse sérieusement. On a aussi trouvé dans cette expérience que la viscosité augmente et que l'aliment devient noir en raison de l'oxydation de la VC quand sa quantité atteint 0,5 % dans l'aliment artificiel en pastille. Plus particulièrement, si la quantité de VC atteint plus de 1 %, la viscosité est très forte et elle influence considérablement le nourrissage larvaire. Peut-être, que c'est l'une des raisons clés de la diminution de la consommation alimentaire et du taux de survie. Cependant, quand la quantité de VC dans l'aliment artificiel est inférieure à 0,5 % ou qu'on utilise l'aliment cuit à la vapeur à la place, l'ajout de la VC n'entraîne pas d'augmentation de la viscosité de l'aliment mais le taux de dispersion des soies des larves nouvellement écloses n'augmente pas et la consommation alimentaire relative du ver à soie adulte baisse également. Cela indique que la VC n'a pas d'effet de promotion de l'alimentation chez les vers à soie. Parallèlement, le produit de la dégradation de la VC dans l'aliment artificiel après la cuisson à la vapeur pourrait inhiber la prise de nourriture.

Nous avons trouvé avec la méthode électrophysiologique que non seulement la VC induit une impulsion de décharge dans l'organe perceptif de SS-I et de SS-II mais qu'il y a aussi une inhibition ou une interférence entre la VC et les facteurs clés qui promeuvent l'alimentation tels que le saccharose et l'inositol (Cui et coll., 2001). De plus, il y a un effet restreint des acides organiques (acide citrique, acide sorbique, acide acétique, acide phosphorique, etc ...) et de l'acide inorganique (Cui et coll., 1998) sur les vers à soie. La raison tient à ce que les cellules perceptives du sucre et les cellules perceptives de l'inositol dans les récepteurs SS-I du ver à soie pourraient être inhibées par l'acide citrique (Hirao, 1978). Comme la VC elle-même est un acide, elle pourrait faire le même travail que l'acide citrique. Donc, la VC en tant que nutriment essentiel et matériel acide, affecte le nourrissage du ver à soie d'une manière compliquée.

Nous avons aussi trouvé dans cette expérience qu'après le 3^{ème} âge, la croissance et le développement diminuent de plus en plus, que le taux de mortalité augmente rapidement, que la plupart des vers à soie ne peuvent pas filer et former de nymphes, quand on utilise un aliment artificiel sans ajout de VC à tous les âges. Si nous ajoutons, des quantités adaptées de VC au milieu artificiel en pastille à tous les âges, les vers à soie grandissent et se développent normalement et terminent leur cycle. Nous pouvons donc conclure que la VC est nécessaire à la croissance et au développement du ver à soie. La VC n'a pas d'effet promoteur évident pendant le développement larvaire précoce parce que la VC peut être transmise des embryons aux larves venant d'éclore ; de plus, il y a une petite quantité de VC dans l'aliment. Cette partie de VC pourrait répondre aux besoins à court terme des jeunes larves mais elle ne peut pas le faire assez longtemps. En général, suivant l'habitude alimentaire et la croissance et le développement des vers à soie, l'ajout de VC supplémentaire est adapté quand il est compris entre 0,2 et 0,3 % du poids sec de l'aliment artificiel en pastille, ce qui est moins qu'avec l'aliment cuit à la vapeur (1 % environ).

PHYSIO-BIOCHEMICAL CHANGES DURING PLANT AGEING IN MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

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

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

For quality leaf production, the plant age is one of the important factors in mulberry. An attempt was made to investigate the change of leaf quality as affected by plant age. S1 variety with different plant age (5, 10, 15 and 20 years) was taken for different physio-biochemical and yield studies. The study indicates that the quality and quantity of mulberry leaves deteriorate after attaining ten years of plant age.

Keywords : Mulberry, plant age, physio-biochemical, leaf yield.

INTRODUCTION

The requirement of good quality mulberry leaves for better growth and development of silkworm leading to quality cocoon production is well established (Krishnaswami *et al.*, 1971). The production of mulberry leaves follows a particular yield pattern over its life span which consists of three stages i.e. firstly, an increasing trend, next is the vigorous growing stage and at last the declining stage (Kumaresan *et al.*, 1994). Singh (1988) observed that the tea bushes which are 50 years old have come to the end of their production life. It has been observed that mulberry plants cultivated in the tropical climate of West Bengal as low bushes are efficient for leaf production up to a certain age after which the leaves' productivity falls. Obviously, this low leaf production will affect the cocoon yield which ultimately results in low returns. Thus, it is imperative to find out the most economical period of plant growth that would ensure quality and quantity leaf production in order to have a successful cocoon production. Hence, a comparative study among the different plant ages was undertaken to determine the appropriate plant age suitable for silkworm rearing.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the mulberry farm of Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, West Bengal. Four age groups i.e., 5 years, 10 years, 15 years and 20 years of S1 variety of mulberry were selected for the study.

Three replications were considered and a similar type of package of practices was provided for all the age groups. Leaf moisture percent was estimated on oven dry weight basis. The biochemical parameters i. e., chlorophyll (Arnon, 1949), total soluble protein (Lowry *et al.*, 1951), total soluble sugar (Morris, 1948) and phenol content (Bray & Thorpe, 1954) of different age groups were estimated using UV – Vis spectrophotometer. With the help of photosynthesis system (Licor – 6200) leaf gas exchange parameters like photosynthesis and transpiration were measured. Leaf expansion rate was calculated from the leaf area recorded at one day interval up to 15 days from the date of unfolding of leaves. Crop wise leaf yield was recorded in accordance with the age group.

The data of the parameters which were found significant and to have the expected maximum point within the range of age considered were subjected to a regression analysis to find out the projected age maximum value.

RESULTS AND DISCUSSION

From the results presented in Table I, it appears that the difference among the age group of plants in respect of total chlorophyll content is significant since young age group i.e. 5 years old plants obtained higher chlorophyll. This observation indicates that the chlorophyll reduction rate is greater than that of synthesis with the gradual ageing of mulberry. Total soluble protein content was observed higher in 10 years old plants ($27.12 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw.}$). But there was no significant difference among the age group. However, the total soluble sugar content steeply declined with the age of plants and 5 years old plants showed a higher sugar content 13.09% over 20 years old plant. Phenol content was observed to be higher in 15 years aged plants while lowest phenol content was recorded in 20 years old plants which showed a declining tendency in disease resistance capacity in old aged plants.

Table I. Effect of plant age on biochemical components of mulberry.

Tableau I. Effet de l'âge de la plante sur les composants biochimiques du mûrier.

Age group (Years)	Total chlorophyll ($\text{mg g}^{-1} \text{ fw}$)	Protein ($\text{mg g}^{-1} \text{ fw}$)	Sugar ($\text{mg g}^{-1} \text{ fw}$)	Phenol ($\text{mg g}^{-1} \text{ fw}$)
<i>Groupe d'âge (Années)</i>	<i>Chlorophylle totale ($\text{mg g}^{-1} \text{ pf}$)</i>	<i>Protéines ($\text{mg g}^{-1} \text{ pf}$)</i>	<i>Sucres ($\text{mg g}^{-1} \text{ pf}$)</i>	<i>Phénol ($\text{mg g}^{-1} \text{ pf}$)</i>
5	2.18	27.09	30.65	7.64
10	2.06	27.12	30.48	8.18
15	1.98	26.99	29.23	8.65
20	1.62	25.34	27.10	7.51
CD at 5%	0.49	NS	1.66	0.83

Leaf moisture content in three age group plants were at par where less moisture (70.12%) was obtained by 20 years old plants. The physiological activity like photosynthesis, transpiration and physiological water use efficiency (PWUE) was found higher in case of young aged plants while reduction of these three gas exchange parameters took place in 20 years old plants, which shows the indication of a slowing down of the physiological functions with the acceleration of ageing (Table II). Similar observations have been reported from China (Chengfu Lou, 1994). However, no significant difference among the plant ages was observed for transpiration. While observing the effect of plant age on leaf growth (Figure 1), it was observed that at initial stage the rate of leaf expansion ($\text{cm}^2 \text{ day}^{-1}$) was more or less identical in three age groups except in 20 year aged plants which showed comparatively a slow rate of expansion. The maximum expansion rate was recorded within 9 to 11 days in 5, 10, 15 years aged plants after unfolding of leaf where the rate of leaf expansion was noticed

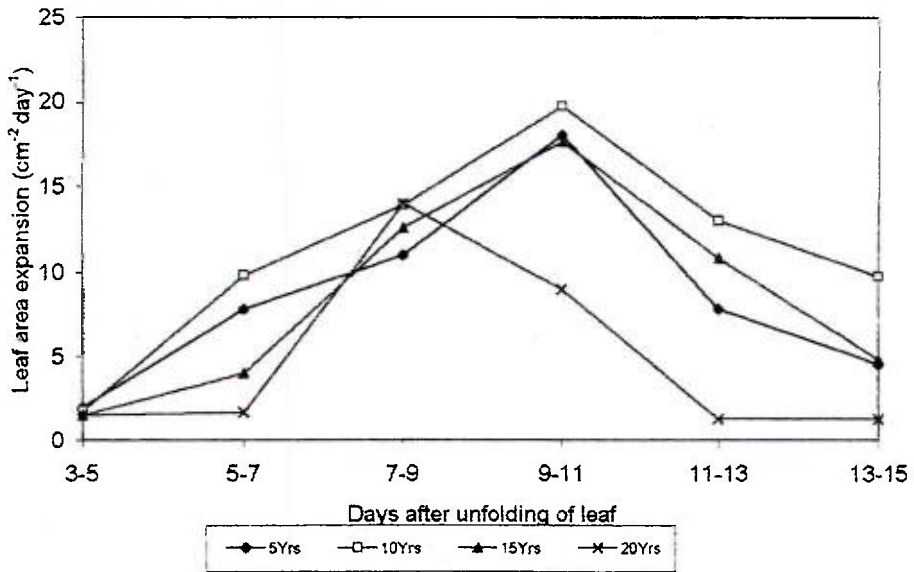


Fig. 1. Rate of leaf area expansion of different age group of mulberry.

Fig. 1. Taux d'expansion de la surface foliaire de mûriers de groupes d'âges différents.

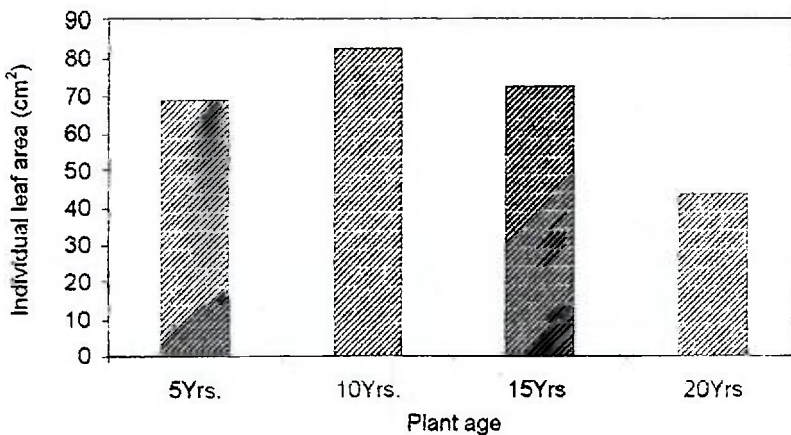


Fig. 2. Area of individual leaf of mulberry under different age group.

Fig 2. Surface foliaire individuelle de mûriers de différents groupes d'âge.

to be maximum within 7 to 9 days, in 20 years old plants. However, the expansion was observed remarkably slower in 20 years old plants than that of other age groups during maximum expansion period (Figure 1). Further, the leaf size of 5, 10, 15 years old plant was bigger than that of 20 years old plant indicating the better leaf area index (LAI) which is favourable for synthesis of photosynthates (Figure 2).

Table II. Effect of plant age on the physiological characters and leaf yield of mulberry.

Tableau II. Effet de l'âge de la plante sur les caractères physiologiques et le rendement foliaire du mûrier.

Age group (Years)	Leaf moisture (%)	Photosynthesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Transpiration ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Physiological water use efficiency (PWUE)	Leaf yield (kg ha^{-1} crop $^{-1}$)
<i>Groupe d'âge (Années)</i>	<i>Humidité de la feuille (%)</i>	<i>Photosynthèse ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)</i>		<i>Efficacité physiologique d'utilisation de l'eau (PWUE)</i>	<i>Rendement en feuilles (kg ha^{-1} récolte^{-1})</i>
5	72.01	13.59	0.0384	353.90	7477.13
10	71.27	15.18	0.0396	383.33	7908.71 (+ 5.77)
15	71.79	11.28	0.0380	296.84	7030.75 (- 12.50)
20	70.12	11.34	0.0392	289.28	6094.98 (- 29.75)
CD at 5%	1.40	0.96	NS	19.16	501.84

Figures in parentheses showing percent increase (+) decrease (-) over 5 years old plant. / Les chiffres entre parenthèses présentent le pourcentage d'augmentation (+) de baisse (-) par rapport aux plants âgés de 5 ans.

The leaf yield was marginally increased (5.77%) in 10 years old plant over young (5 years) plants and a sharp decline was recorded in 15 years (12.5%) and 20 years (29.75%) respectively. However, a significant difference among the age groups was observed for leaf production where 10 years age group exhibited maximum leaf yield (Table II). Maximum parameters showed a significant difference among age groups and were also maximum within the range of 5 to 10 years age. Regression analysis revealed that the three essential parameters i.e. photosynthesis, physiological water use efficiency and leaf yield showed best performance at 7.74, 7.38 and 8.85 years respectively. Hence, it indicates that 10 years old plant possess the abundant production stage with luxuriant foliage and high leaf yield. Thereafter, the gradual decline of growth and physiological functions due to acceleration of ageing causes some branches or lateral shoots to die and produce small shoots and leaves.

CONCLUSION

It has been observed from the results that the plant age up to 10 years is capable of producing leaf production both of quality and in quantity. But, beyond 10 years, the gradual deterioration of physiological activity of plant reduces the leaf quality and yield potentiality. Thus, it is suggested that the mulberry plants beyond 10 years old may be replaced with new plants.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Mr Nirvan Das Assistant, Director, Statistics and Computer Section of this Institute for carrying out the statistical analysis.

REFERENCES

- ARNON D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 : 1-15.
- BRAY H. G., THORPE W. V. (1954) Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Meth. Biochem. Anal. 1 : 27-54.
- CHENG FU LOU (1994) Mulberry Physiology and Ecology. Sericultural Department. Zhejiang Agricultural University. Hangzhou, P. R., China.
- KRISHNASWAMI S., KUMARARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilization. Indian J. Seri. 9(1): 79-89.
- KUMARESAN P. G., SRINIVASA, ARUN KUMAR K. S. (1994) Optimum age of replacement of mulberry garden in Karnataka. Indian J. Seri. 33(1): 56-58.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. K., RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MORRIS D. L. (1948) Quantitative determination of carbohydrate with Drey wood anthrone reagent. Science. 107: 254-255.
- SINGH R. (1988) Tea Technology – Today & Tomorrow. Proc 30th Tocklai conf. 14th to 12th March, 3-6.

CHANGEMENTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES AU COURS DU VIEILLISSEMENT DU MÛRIER (*MORUS ALBA* L.)

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

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

Chez le mûrier, l'âge de la plante est l'un des facteurs importants pour une production de feuilles de qualité. Nous avons essayé d'étudier le changement de la qualité de la feuille en fonction de l'âge de la plante. Les différentes études physiologiques et biochimiques et de rendement ont été réalisées sur la variété S1 à des âges différents (5, 10, 15 et 20 ans). L'étude montre que la qualité et la quantité de feuilles de mûrier se détériorent après dix ans.

INTRODUCTION

Il est bien connu qu'il faut des feuilles de mûrier de bonne qualité pour obtenir une croissance et un développement du ver à soie meilleurs qui donneront une production de cocons de qualité (Krishnaswami et coll., 1971). Tout au long de sa vie, le mûrier suit un modèle de rendement particulier en ce qui concerne la production de feuilles, qui se divise en trois étapes, d'abord, une tendance à l'augmentation, puis un stade de croissance vigoureuse et enfin un stade de déclin (Kumaresan et coll., 1994). Singh (1988) a observé qu'au bout de 50 ans les buissons de thé ont atteint la fin de leur vie productive. On a rapporté que les plants de mûrier cultivés en buisson bas sous le climat tropical du Bengal Ouest produisent des feuilles avec efficacité jusqu'à un certain âge après lequel la productivité foliaire diminue. Evidemment, cette faible production de feuilles a un effet sur le rendement en cocons qui génère de faibles profits. Il est donc impératif, de trouver la période de croissance de la plante la plus économique, qui donnerait une production foliaire de qualité et permettrait d'obtenir une production de cocons réussie. Nous avons donc entrepris une étude comparative entre les différents âges des plants pour déterminer l'âge approprié du plant pour l'élevage du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été réalisée dans la mûraie du *Central Sericultural Research & Training Institute* de Berhampore, dans le Bengal Ouest. Quatre groupes d'âge, c'est à dire 5 ans, 10 ans, 15 ans et 20 ans de la variété de mûrier S1 sont sélectionnés pour l'étude.

Trois répétitions ont été considérées et on adopte un type similaire de pratiques pour tous les groupes d'âge. On estime le pourcentage d'humidité de la feuille sur la base du poids séché au four. Les paramètres biochimiques, c'est à dire la chlorophylle (Arnon, 1949), les protéines solubles totales (Lowry et coll., 1951), le sucre soluble total (Morris, 1948) et la teneur en phénol (Bray & Thorpe, 1954) des différents groupes d'âge sont estimés en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis. On mesure les paramètres d'échange de gaz de la feuille comme la photosynthèse et la transpiration à l'aide d'un système de photosynthèse (Lowry – 6200). On calcule le taux d'expansion foliaire à partir de la surface

foliaire à un jour d'intervalle pendant 15 jours à partir de la date du déroulement des feuilles. On enregistre le rendement foliaire des cultures en fonction des groupes d'âge.

Les données pour les paramètres qui s'avèrent significatifs et obtiennent les points maximums à l'intérieur de la tranche d'âge considérée sont soumises à une analyse de régression pour trouver la valeur maximum de l'âge projeté.

RESULTATS ET DISCUSSION

D'après les résultats présentés dans le Tableau I, il apparaît que la différence pour la teneur en chlorophylle totale entre les groupes d'âge des plants est significative, le groupe d'âge jeune, c'est à dire les plants de 5 ans contiennent plus de chlorophylle. Cette observation montre que le taux de diminution de la chlorophylle est beaucoup plus important que celui de la synthèse avec le vieillissement progressif du murier. On observe que la teneur en protéines solubles totales est plus élevée chez les plants de 10 ans ($27,12 \text{ mg g}^{-1} \text{ pf}$). Mais il n'y a pas de différence significative entre les groupes d'âge. Cependant, la teneur en sucres solubles totaux baisse rapidement avec l'âge des plants et les plants de 5 ans présentent une teneur en sucre plus élevée de 13,09 % que les plants de 20 ans. La teneur en phénol est beaucoup plus élevée chez les plants de 15 ans tandis qu'on enregistre la teneur la plus basse en phénol chez les plants de 20 ans qui présentent par ailleurs une tendance au déclin en ce qui concerne leur capacité de résistance à la maladie.

La teneur en humidité de la feuille chez les plants des trois groupes d'âge suit la même tendance et on obtient moins d'humidité (70,12 %) chez les plants de 20 ans. Les activités physiologiques comme la photosynthèse, la transpiration et l'efficacité d'utilisation de l'eau physiologique (PWUE) s'avèrent plus élevées chez les jeunes plants tandis que ces trois paramètres d'échange de gaz diminuent chez les plants âgés de 20 ans, ce qui est une indication d'un ralentissement des fonctions physiologiques avec l'accélération du vieillissement (Tableau II). On a rapporté des observations similaires de Chine (Chengfu Lou, 1994). Cependant, on n'observe pas de différence significative entre les âges pour la transpiration. Quand on étudie l'effet de l'âge du plant sur la croissance de la feuille (Figure 1), on observe qu'au stade initial le taux d'expansion de la feuille ($\text{cm}^2 \text{ jour}^{-1}$) est plus ou moins identique chez les trois groupes d'âges sauf chez les plants âgés de 20 ans qui présentent un taux d'expansion comparativement lent. Le taux d'expansion maximum est enregistré entre 9 et 11 jours après le déroulement de la feuille, chez les plants âgés de 5, 10, 15 ans et on remarque que chez les plants de 20 ans, le taux d'expansion de la feuille est maximum entre 7 à 9 jours. Cependant, on observe une expansion remarquablement plus lente chez les plants de 20 ans que chez les autres groupes d'âge pendant la période d'expansion maximum (Figure 1). De plus, la feuille des plants de 5, 10, 15 ans est plus grosse que celle des plants de 20 ans, ce qui indique un meilleur indice de surface foliaire (LAI) qui est favorable à la photo-synthèse (Figure 2).

Le rendement foliaire augmente de manière marginale (5,77 %) chez les plants âgés de 10 ans par rapport aux jeunes plants (5 ans) et on enregistre un déclin brutal respectivement chez les plants de 15 ans (12,5 %) et de 20 ans (29,75 %). Cependant, on observe une différence significative de production foliaire entre les groupes d'âge et on obtient le rendement foliaire maximum avec le groupe d'âge de 10 ans (Tableau II). Les paramètres maximum présentent une différence significative entre les groupes d'âge et sont aussi maximum pour la tranche de 5 à 10 ans. L'analyse de régression révèle que les trois paramètres essentiels, c'est à dire la photosynthèse, l'efficacité d'utilisation de l'eau physiologique et le rendement foliaire présentent la meilleure performance respectivement aux âges de 7,74 ; 7,38 et 8,85 ans. Cela indique donc que les plants âgés de 10 ans arrivent à un stade de production abondant avec un feuillage luxuriant et un rendement foliaire élevé. Après, le déclin progressif de la croissance et des fonctions physiologiques dû à l'accélération du vieillissement, entraîne la mort de certaines branches ou de pousses latérales et la production de petites pousses et de feuilles.

CONCLUSION

On observe d'après les résultats que jusqu'à 10 ans le plant est capable d'une production de feuilles de qualité et en quantité. Mais, au-delà de 10 ans, la détérioration progressive de l'activité physiologique du plant diminue la qualité de la feuille et la potentialité de rendement. Nous suggérons donc que les plants de mûrier de plus de 10 ans soient remplacés par de nouveaux plants.

ISOLATION AND CULTURE OF LEAF PROTOPLASTS OF INDIAN MULBERRY (*MORUS INDICA* VAR. K-2)

ANITA KAPUR, SOMIKA BHATNAGAR & PARAMJIT KHURANA*

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road,
New Delhi, India. Tel: 91-11-24675096, Fax: 91-11-24109450, E-mail:
Paramjitkhurana@hotmail.com

*Leaf mesophyll protoplasts of Indian mulberry (*Morus indica* var. K2) were enzymatically isolated from in vitro grown shoot cultures using an enzyme mixture of 2% Onozuka Cellulase RS, 0.1% Pectolyase and 1% Macerozyme in 0.6 M mannitol for 14-16 hrs. This enzyme mixture also supported release of protoplasts from mature leaf tissues. Cell wall regeneration was observed regularly from both sources of protoplasts but divisions were rare. Protoplasts cultured in liquid media regenerated a cell wall (60%) but failed to divide and grow. The protoplasts cultured in agarose beads/Ca-alginate layers showed first division between 7-10 days of culture when cultured at a plating density of 5×10^3 / ml. Up to 4-celled structures were visible in 5-7% of the cultures on MS medium supplemented with 0.6 M glucose, 1 mg/l TDZ/BAP, 1 mg/l 2,4-D and 15 % coconut milk. Use of glucose was found to be essential and microcolonies were formed by a month of culture*

Keywords: *Morus indica*, mesophyll protoplasts, mulberry, protoplast culture, protoplast isolation, regeneration, woody plant.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* sp.) is an important tree of the sericulture industry as the foliage constitutes the chief feed for the silkworm, *Bombyx mori*. Additionally, some species of mulberry are valued for edible fruits and also good quality timber. The characters for mulberry breeding programmes include superior leaf yield and leaf succulence, high moisture, carbohydrate and protein content, disease resistance, drought tolerance and rooting ability of elite indigenous cultivars. Improvement of mulberry by conventional breeding is difficult because of heterozygosity. Ample scope thus exists for the genetic improvement of mulberry. Although micropagation as a means of regeneration is quite popular in mulberry, varietal variations are immense. Thus establishment of protoplast regeneration system using protoplast fusion and gene transfer would contribute to the improvement of mulberry varieties.

However, prior understanding of isolation, purification and culture of protoplasts is a prerequisite. Although considerable progress have been made in recent years in cultivating protoplasts from an increasing number of species, information about woody perennials is conspicuously scant. With the growing knowledge of the usefulness of protoplast system and economic importance of woody plants more intensive efforts are required in this lesser-explored area. With respect to mulberry also the scenario is rather dismal. Although protocols are available for isolation of protoplasts from callus and seedling tissues (Tewary and Lakshmisita, 1992, Tewary *et al.* 1995, Chand *et al.* 1996, Tohjima *et*

* Corresponding author

al. 1996, Pavan *et al.* 2000 a,b), leaves have either not been utilized or reported to be not so promising (Tewari and Lakshmisita, 1992). Due to tremendous heterozygosity in mulberry, seedling material is often considered unreliable with respect to the genotype. Hence, vegetatively propagated germplasm is the safest for hybridization efforts. This, nonetheless, needs the development of protocols from mature, field grown germplasm. Our earlier work demonstrated the stimulatory role of TDZ in causing bud induction in tropical and temperate mulberry cultivars (Tewari *et al.* 1999, Bhatnagar *et al.* 2001, 2002, Kapur *et al.* 2001, Khurana *et al.*, 2002). The present paper reports isolation of viable protoplasts from leaf tissues of an elite cultivar of mulberry, K-2, and their subsequent extension to mature leaf tissues as well as formation of microcallus in this important Indian mulberry genotype.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material:

An elite cultivar of *Morus indica*, K-2 was used for the present investigation. Leaves as explants were taken from two different sources: A. *In vivo* or field-grown material; young leaves were excised from 3-4 years old mature trees grown in the Departmental garden. Leaves were excised and used for protoplast isolation after sterilization with 0.15% HgCl₂. B. *In vitro* raised seedling; seeds collected from the mature fruits and stored at 28-30°C, were germinated on MS (Murashige and Skoog, 1962) basal medium. Leaf, cotyledon and root explants were taken from 20-25 day-old seedlings.

Protoplast Isolation:

Leaves from different sources were incubated in cell wall degrading enzymes solutions prepared in CPW salts (Frearson *et al.*, 1973). Each leaf was cut into small parts in the enzyme solution in 55 mm diameter Petridish (ca.1 g tissue in 10 ml enzyme solution) prior to incubation in filter-sterilized enzyme solution. Incubation was done overnight (approx. 14-16 h) at 26-28° C in dark.

Purification of Protoplasts:

The enzyme mixture containing the protoplasts was passed through a steel mesh (40 µ) to remove the coarse debris. The resulting filtrate which contains protoplasts, isolated cells and organelles from the damaged protoplasts was centrifuged at 100 g for 3 min. The pellet was suspended in 6 ml washing solution (15 mM MgCl₂, 0.6 M mannitol, 5 mM MES, pH 5.7) with the help of a wide bore, rounded Pasteur pipette, the sample centrifuged for 3 min at 100 g, and the supernatant discarded. The pellet was resuspended in 2 ml of washing solution which was then loaded on to 6-7 ml sucrose solution (21% sucrose, 15 mM MgCl₂, 5 mM MES at pH 5.7, prepared in CPW salts) and centrifuged at 100g for 3 min. The ring of floating intact protoplasts at the sucrose junction was carefully collected with the help of a Pasteur pipette and transferred to a fresh centrifuge tube. To this 4 ml of washing solution was added and centrifuged at 100 g for another 2 min. The pellet was resuspended in 2 ml of washing solution and density adjusted by counting an aliquot of protoplasts by haemocytometer.

Viability Test for Protoplasts:

Viability of protoplasts was tested by fluorescein diacetate (FDA) staining (Widholm, 1972). The protoplasts were examined with a fluorescence microscope (Leitz, Germany) using BP 450-490 excitation filter and LP515 suppression filter. Viable protoplasts fluoresced bright green.

Culture of Protoplasts :

Liquid culture - Protoplasts were pelleted from the washing solution at 100 g for 2 min, and resuspended in filter-sterilized culture medium (MS medium containing 0.6 M glucose, 1 mg/l 2,4-D,

0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA, pH 5.8). The density of the protoplasts was adjusted to 2.5×10^5 /ml and 1.5 ml of suspension was cultured in 35 mm Petridishes (Nunc, Denmark), in dark at $25 \pm 0^\circ\text{C}$.

Agarose bead culture-Protoplasts (5×10^5 /ml) suspended in the culture medium were mixed with equal volume of 1.2% low melting point cell culture tested Agarose (Sigma, USA) prepared in culture medium and cultured as agarose beads in 35 mm Petridishes. After they solidified, liquid culture medium was poured over them and the Petridishes sealed with parafilm. These Petridishes were placed in perspex boxes and incubated in dark at $25 \pm 0^\circ\text{C}$.

Calcium alginate layers- Protoplasts at a density of 5×10^5 cells/ml were mixed with equal volume of 1.2% sodium alginate prepared in the washing solution and 1 ml of this mixture was poured over 3 ml solidified medium (30 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 M mannitol, 0.8% agarose, 5mM MES; pH 7.0) in 35 mm Petridishes. Gradual uptake of calcium from the lower layer results in the formation of calcium alginate which solidifies and thereby immobilizes the protoplasts.

After one hour, 1 ml of washing solution was added (15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 M mannitol, 5mM MES; pH 5.7) and incubated at 4°C in cold room for 1hr. After an hour, the calcium alginate layer was removed with the help of a spatula and transferred to a 55 mm Petridish containing 2 ml culture medium. The alginate layer was washed with the culture medium which was then replaced with fresh medium. Four parts of this round disc were made with the help of a spatula and floated in 2-3 ml culture medium. All cultures were incubated in dark and periodically observed under the microscope. The division frequency was assessed after 15 days of culture.

RESULTS AND DISCUSSION

Protoplast Isolation

With advancements in plant tissue culture technology, plant regeneration systems from protoplasts have been developed for many plant species. Although there are two reports of regeneration from protoplasts of paper mulberry, *Broussonetia kazinoki* (Oka and Ohyama, 1985; Katagiri, 1991), also belonging to the family Moraceae. The species *Morus* is still recalcitrant with respect to regeneration from isolated protoplasts. The present investigation was thus initiated for efficient protoplast isolation from the leaf mesophyll tissues of both *in vitro* grown seedlings as well as from field grown mature tissues (*in vivo*). Although the data presented is essentially from the seedling tissues, it is also applicable to mature tissues as is depicted in the subsequent sections on protoplast culture. In the initial experiments different physical and chemical parameters were tested for obtaining highest yield of protoplasts and the results are as follows:

Enzymes for isolation:

While standardizing an enzyme solution it was observed that 1% macerozyme, 0.1% pectolyase and 2% cellulase in CPW salts solution gives maximum yield of protoplasts 2×10^6 /g fresh wt (Table I). Viability test with FDA also indicated maximum (upto 90%) viability with the same enzyme solution (Table I).

Influence of osmoticum and pH:

The presence of osmoticum is vital for integrity of protoplasts. Different sugars were thus employed at 0.6 M in the enzyme solution. Mannitol was invariably found to be the best and was employed as an osmoticum for further experimentation (Table II) at a concentration of 0.6 M. Since protoplast isolation is an enzymatic process, the pH of the enzyme solution was varied from 4.8 to 6.2. As expected the optimal protoplast release was at pH 5.6 while more acidic and more basic pH adversely affected protoplast yield (Table II).

Table I. Leaf protoplast yield and viability by different enzymes treatments from *in vitro* raised seedlings of *Morus indica* var. K-2.*Tableau I. Rendement en protoplastes foliaires et viabilité avec divers traitements enzymatiques à partir de plantules de Morus indica var. K-2 cultivées in vitro.*

Enzyme composition	Yield of protoplast ($\times 10^6$ / g fresh wt.)	% Viability of protoplast
<i>Composition enzymatique</i>	<i>Rendement en protoplasme ($\times 10^6$ / g poids frais)</i>	<i>% de viabilité des protoplastes</i>
2% Cellulase + 1% Macerozyme	1.5	78
2% Cellulase + 1% Macerozyme + 0.1% Pectolyase	2.0	89
2% Cellulase + 1% Macerozyme + 0.25% Pectolyase	0.9	50
2% Cellulase + 1% Macerozyme + 0.5% Pectolyase	0.6	48
2% Cellulase + 1% Macerozyme + 1% Pectolyase	0.0	00

Table II. Influence of various physical / chemical parameters on leaf protoplast isolation in *M. indica* var. K-2.*Tableau II. Influence de divers paramètres physiques et chimiques sur l'isolement de protoplastes de la feuille chez M. indica var. K-2.*

Osmoticum		pH		Shaking		Temp.	
Sugar (0.6 M)	Protoplast yield	pH	Protoplast yield ($\times 10^6$ g fr. wt.)	Shaking speed	Protoplast yield ($\times 10^6$ g fr. wt.)	Temperature	Protoplast yield ($\times 10^6$ g fr. wt.)
<i>Osmoticum</i>		<i>pH</i>		<i>Agitation</i>		<i>Temp.</i>	
<i>Sucre (0,6 M)</i>	<i>Rendement en protoplastes ($\times 10^6$ g pds. fr.)</i>	<i>pH</i>	<i>Rendement en protoplastes ($\times 10^6$ g pds. fr.)</i>	<i>Vitesse d'agitation</i>	<i>Rendement en protoplastes ($\times 10^6$ g pds. fr.)</i>	<i>Temp.</i>	<i>Rendement en protoplastes ($\times 10^6$ g pds. fr.)</i>
Mannitol	1.63	5.0	0.45	20	1.58	22	1.70
Sorbitol	1.30	5.4	1.12	40	1.35	26	1.82
Sucrose	1.35	5.6	1.64	60	0.91	28	1.14
Glucose	1.33	5.8	1.04	80	0.66	30	1.06
Fructose	1.17	6.0	0.66	100	0.41	32	0.64

Influence of temperature and period of incubation:

Incubation were carried out over a wide range of temperature varying from 4^o to 40^oC to find the optimal incubation temperature and also the time period of incubation was closely monitored. Protoplast yield was highest at 26^oC (Table II) and the optimal period for incubation was 14 to 16 h (Table II) similar to that reported by earlier workers.

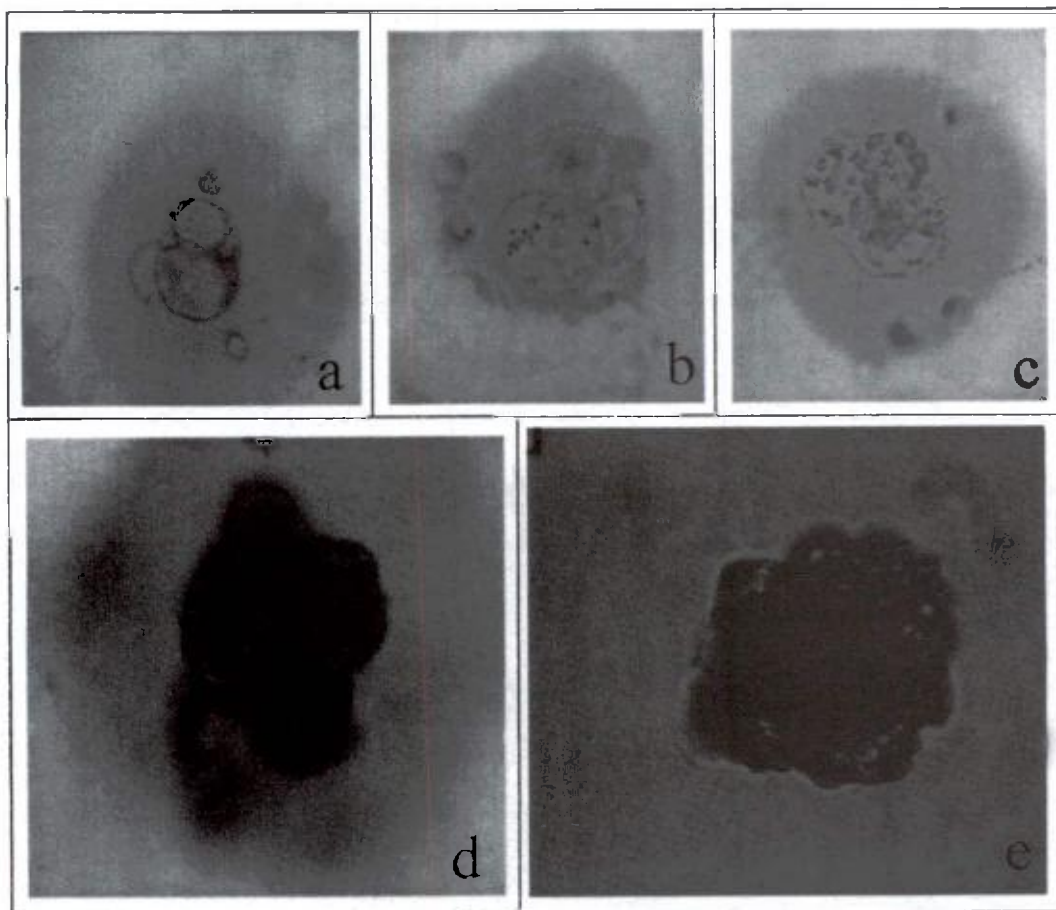


Fig. 1. Divisions in cultured protoplasts of *Morus indica* var. K2. a. A bicelled structure after 2 weeks of culture from *in vitro* leaf. b & c. Multicelled structures in 21-day old cultures, from protoplasts isolated from *in vitro* and *in vivo* leaves, respectively. d & e. Microcalli formation in 30 day-old cultures, from protoplasts isolated from *in vitro* and *in vivo* leaf tissue, respectively.

Fig. 1. Divisions des protoplastes de *Morus indica* var. K2. a. Une structure bicellulaire après 2 semaines de culture à partir d'une feuille *in vitro*. b & c. Structures multicellulaires chez des cultures de 21 jours, à partir de protoplastes isolés respectivement sur des feuilles *in vitro* et *in vivo*. d & e. Formation de microcales chez des cultures de 30 jours, à partir de protoplastes isolés respectivement sur du tissu *in vitro* et *in vivo*.

Effect of shaking:

The Petriplates containing the leaf tissue and the enzyme mixture were kept stationary as well as on a rotatory shaker at various speeds (20-100 rpm) for protoplast isolation. The yield was almost similar in stationary as well as at 20 or 40 rpm (Table II) but the quality of the preparation appeared more uniform and robust when kept on a shaker. In subsequent experiments the materials were thus kept at 20-40 rpm during the time of incubation.

In the present study, we observed that as in other dicots *Morus* leaves are a good source of protoplasts too. We have also standardized conditions which give us the maximum yield of protoplasts of up to 2×10^6 /g fresh weight from *in vitro* raised seedlings and approx. $1.5-2 \times 10^6$ /g fresh weight from mature leaf material obtained from field grown plants (*in vivo*). For efficient isolation of protoplasts in mulberry, incubation of leaf explants should be done in enzyme solution of 1% macerozyme, 0.1% pectolyase and 2% cellulase prepared in CPW salts solution (0.6M mannitol, 5mM MES), pH 5.6, with shaking at 26°C for 14 to 16 h.

Protoplast Viability:

Protoplasts could be isolated in higher numbers (2×10^6 to 10^7) from leaves of 3-4 week-old aseptically grown plants as well as from other explants like callus, cotyledons and roots (data not shown). Nonetheless, only protoplasts isolated from leaf tissue were obtained in sufficient numbers and found suitable for further experimentation. The leaf protoplasts showed 90% viability as compared to a lower value from the other materials.

Protoplast Culture:

Protoplasts isolated from leaves (*in vitro* and *in vivo*) when cultured in a liquid medium displayed cell wall formation (60%). However, it did not sustain any divisions and only cell aggregates were visible. Leaf protoplasts, when embedded in agarose beads floating in liquid medium or in calcium alginate beads/layers, started dividing after a week of culture (Fig. 1a-c) at a culture density of 0.5×10^6 /ml, while no division occurred when protoplasts were cultured at a low density.

Protoplasts were cultured in B5 or MS basal media supplemented with various hormones at a plating density of 0.5×10^5 /ml and embedded in agarose beads or calcium alginate layers. However, for protoplast culture, glucose was found to be best at 0.6 M concentration. Up to 4 celled stage (5-7% of cultured protoplasts) were observed in the following media formulations:

- i. MS + 0.6 M glucose, 1mg/l TDZ, 15% coconut milk.
- ii. MS + 0.6 M glucose, 1mg/l TDZ, 1mg/l 2,4,D, 15% coconut milk.
- iii. MS + 0.6 M glucose, 1mg/l BAP, 1mg/l 2,4,D, 15% coconut milk.
- iv. MS + 0.6 M glucose, 1mg/l TDZ, 1mg/l 2,4,D, 5mg/l casein hydrolysate.

After 30 days, 8-12 celled microcolonies formed (Fig.1d,e) in MS basal culture medium supplemented with 0.6M glucose, 1mg/l 2,4,D, 0.5mg/l BAP, 0.1mg/l NAA and 2mg/l AgNO₃. Protoplasts showed the highest frequency of division (13-15%). Microcolonies, however, did not proliferate further despite regular subculture and replenishing the culture medium with fresh medium. These results indicate that regeneration of plants from protoplasts require at least three media with changes in levels of auxin, cytokinin, and osmoticum: a regeneration medium suitable for cell wall formation and initiation of cell divisions leading up to visible colonies, a shoot differentiation medium containing a lowered osmoticum and other addenda, and finally a root differentiation media (see also Maheshwari *et al.* 1986). Although this procedure was standardized for mesophyll protoplast isolation from *in vitro* raised seedlings, it is also applicable to mature tissues obtained from field grown plants (*in vivo*) not only in terms of protoplast isolation, but also for protoplast culture. Nonetheless, more efforts are needed to uncover the essential requirements of the dividing *Morus* leaf

mesophyll protoplasts for regeneration of complete plantlets and their effective utilization in mulberry improvement programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- BHATNAGAR S., KAPUR A., KHURANA P. (2001) TDZ mediated differentiation in commercially valuable Indian mulberry cultivars K2 and DD. *Plant Biotech.* 18: 61-65.
- BHATNAGAR S., DAS M., KHURANA P. (2002) TDZ mediated micropropagation of temperate cultivars of Indian mulberry C176 and C776. *Ind. J. Sericulture* 41: 82-83.
- CHAND, P.K., SAHOO Y., PATTNAIK S.K., PATTNAIK S.N. (1996) Evolution of procedure for interspecific protoplast fusion in mulberry. *Ind. J. Sericulture* 35: 46-49.
- FREARSON E.M., POWER J.B., COCKING E.C., (1973) The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplast. *Develop. Biol.* 33: 111-116.
- KAPUR A., BHATNAGAR S., KHURANA P. (2001) Efficient regeneration from mature leaf explants of Indian mulberry via organogenesis. *Sericologia* 41: 207-214.
- KATAGIRI K. (1991) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Broussonetia papyrifera* Vent. *J. Seric. Sci. Jpn.* 60: 407-409.
- KHURANA P., KAPUR A., BHATNAGAR S. (2002) Studies on morphogenesis and genetic manipulation of Indian mulberry. *Ind. J. Sericulture*. In *Advances in Indian Sericulture Research* (Ed. Dandin S. B, Gupta U. P.), CSRTI, Central Silk Board, Mysore, India, pp. 14-18.
- MAHESHWARI S.C., GILL R., MAHESHWARI N., GHARYAL P.K. (1986) Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. In: *results and Problems in Cell Differentiation* 12. *Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells* (Ed. REINERT J. and BINDING H), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1986, pp3-36.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- OKA S., OHYAMA K. (1985) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia kazinoki* Sieb (paper mulberry). *J. Pl. Physiol.* 119: 455-460.
- PAVAN U., RAO A.V., RAMASWAMY N., SADANANDAM A. (2000a) Evaluation of specific parameters in the isolation of protoplasts from mesophyll cells of three mulberry cultivars. *Sericologia* 40: 469-474.
- PAVAN U., RAO A.V., RAMASWAMY N., SADANANDAM A. (2000b) A simple protocol for rapid and efficient isolation of protoplasts from callus cultures of mulberry (*Morus indica* L.) cv. S13. *Sericologia* 40: 647-651.
- TEWARI A., BHATNAGAR S., KHURANA P. (1999) *In vitro* response of commercially valuable varieties of *Morus* sp. to thidiazuron and activated charcoal. *Plant Biotech.* 16: 413-417.
- TEWARY P.K., LAKSHMISITA G. (1992) Protoplast isolation, purification and culture in mulberry (*Morus* spp). *Sericologia* 32: 651-657.
- TEWARY P.K., MOHANRAM H.Y., RANGASWAMY N.S. (1995) Isolation and culture of mulberry (*Morus alba* L.) protoplasts from callus tissues. *Ind. J. Plant Physiol.* 37: 114-117.
- TOHJIMA F., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H. (1996) Effects of various enzymes on the efficiency of protoplast isolation from mulberry mesophylls. *J. Seric. Sci. Jpn.* 65: 485-489.
- WIDHOLM J.M., (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology.* 47: 189-194.

ISOLEMENT ET CULTURE DES PROTOPLASTES DE LA FEUILLE DU MURIER INDIEN (*MORUS INDICA* VAR. K-2)

ANITA KAPUR, SOMIKA BHATNAGAR & PARAMJIT KHURANA

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road,
New Delhi, Inde. Tel : 91-11-24675096, Fax : 91-11-24109450, Email :
Paramjitkhurana@hotmail.com

*Les protoplastes du mésophylle de la feuille du mûrier indien (*Morus indica* var. K2) sont isolés de manière enzymatique à partir de pousses obtenues *in vitro* dans un mélange d'enzyme de Cellulase Onozuka RS à 2 %, de Pectolyase à 0,1 % et de Macerozyme à 1 % dans du mannitol 0,6 M pendant 14 à 16 heures. Ce mélange d'enzymes a aussi permis la libération de protoplastes à partir de tissus foliaires matures. On observe régulièrement une régénération de la paroi cellulaire pour les deux sources de protoplastes mais les divisions sont rares. Les protoplastes cultivés dans un milieu liquide régénèrent une paroi cellulaire (60 %) mais ne réussissent pas à se diviser et à croître. Les protoplastes cultivés dans des billes d'agarose / couches de Ca-alginate présentent les premières divisions au bout de 7 à 10 jours de culture quand on les cultive à une densité de plaques de 5×10^5 / ml. Des structures allant jusqu'à 4 cellules sont visibles dans 5 à 7 % des cultures sur du milieu MS additionné avec du glucose à 0,6 M, 1 mg / l de TDZ / BAP, 1 mg/l de 2,4-D et 15 % de lait de noix de coco. L'utilisation de glucose est essentielle et on obtient une formation de micro-colonies au bout d'un mois de culture.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* sp.) est un arbre important pour l'industrie séricicole puisque son feuillage constitue la nourriture principale du ver à soie, *Bombyx mori*. De plus, certaines espèces de mûrier sont appréciées pour leurs fruits comestibles et aussi pour leur bois de bonne qualité. Les programmes de lignage du mûrier incluent les caractéristiques suivantes : rendement en feuilles supérieur, saveur des feuilles, humidité élevée, hydrates de carbone, teneur en protéines, résistance à la maladie, tolérance à la sécheresse et capacité de racinement de cultivars indigènes supérieurs. L'amélioration du mûrier par le lignage conventionnel est difficile en raison de son hétérozygotie. Il existe donc de grandes possibilités d'amélioration génétique du mûrier. Bien que la micro multiplication soit un moyen de régénération assez populaire chez le mûrier, les variations variétales sont énormes. La mise au point d'un système de régénération en utilisant la fusion de protoplastes et le transfert des gènes contribuerait donc à l'amélioration des variétés de mûrier.

Cependant, il faut d'abord comprendre comment isoler, purifier et cultiver les protoplastes. Bien que des progrès considérables aient été faits récemment sur la culture des protoplastes à partir d'un nombre croissant d'espèces, l'information sur les vivaces ligneuses est manifestement insuffisante. Avec l'accroissement des connaissances sur l'utilité d'un système de protoplastes et sur l'importance économique des plantes ligneuses, il faudrait entreprendre des efforts plus importants dans ce domaine moins connu. Le panorama pour le mûrier est plutôt désolant. Bien que des protocoles soient disponibles pour l'isolement des protoplastes à partir des tissus de cals et de plantules (Tewary et Lakshmisita, 1992, Tewary et coll., 1995, Chand et coll., 1996, Tohjima et coll., 1996, Pavan et coll., 2000a, b), les feuilles n'ont soit pas été utilisées ou bien on a rapporté qu'elles n'étaient pas

prometteuses (Tewary et Lakshmisita, 1992). En raison de l'hétérozygotie énorme du mûrier, on considère souvent que les plantules ne sont pas fiables par rapport au génotype. La multiplication végétative du germoplasme est donc la plus sûre pour les efforts d'hybridation. Néanmoins, cela nécessite la mise au point de protocoles à partir de germoplasmes matures et cultivés sur le terrain. Nos travaux précédents ont montré le rôle stimulant du TDZ pour générer une induction de bourgeons chez des cultivars de mûrier tropicaux et tempérés (Tewari et coll., 1999, Bhatnagar et coll., 2001, 2002, Kapur et coll., 2001, Khurana et coll., 2002). Cet article rapporte l'isolement de protoplastes viables à partir des tissus foliaires d'un cultivar supérieur du mûrier, K-2, et l'extension ultérieure aux tissus foliaires matures ainsi que la formation de microcals chez ce génotype de mûrier indien important.

MATERIELS ET METHODES

Matériau végétal :

Un cultivar supérieur de *Morus indica*, K-2 est utilisé dans cette étude. Les feuilles utilisées comme explants sont prises sur deux sources différentes. A. Matériel *in vivo* ou cultivé sur le terrain : les jeunes feuilles sont excisées sur des arbres matures de 3 à 4 ans cultivés sur le terrain départemental. Les feuilles sont excisées et utilisées pour l'isolement des protoplastes après stérilisation avec 0,15 % d'HgCl₂. B. Plantules cultivées *in vitro* : les graines sont recueillies sur des fruits matures et stockées à 28 à 30° C, puis elles sont mises à germer sur du milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962). La feuille, le cotylédon et les explants de racines sont pris sur des plantules de 20 à 25 jours.

Isolement des protoplastes :

Les feuilles des différentes sources sont incubées dans des solutions d'enzymes dégradant les parois cellulaires préparées dans des sels CPW (Frearson et coll., 1973). Chaque feuille est coupée en petits bouts dans la solution d'enzymes dans une boîte de Petri de 55 mm de diamètre (ca. 1 g tissu dans 10 ml de solution d'enzyme) avant l'incubation dans une solution d'enzyme filtrée stérile. L'incubation a lieu pendant la nuit (approx. 14 à 16 h.) à 26-28° C dans l'obscurité.

Purification des protoplastes :

Le mélange d'enzymes contenant les protoplastes est passé au travers d'un tamis en acier (40 µ) pour enlever les débris bruts. Le filtrat qui en résulte contenant les protoplastes, les cellules isolées et les organelles des protoplastes abimés est centrifugé à 100 g pendant 3 mn. Le culot est suspendu dans 6 ml de solution de lavage (15 mM MgCl₂, 0,6 M mannitol, 5 mM MES, pH 5,7) à l'aide d'une pipette Pasteur arrondie et centrifugé pendant 3 min. à 100 g et le surnageant est jeté. Le culot est resuspendu dans 2 ml de solution de lavage qui est ensuite chargée sur 6 à 7 ml de solution de saccharose (21 % de saccharose, 15 mM MgCl₂, 5 mM de MES au pH de 5,7, préparé dans des sels de CPW) et centrifugé à 100 g pendant 3 mn. L'anneau de protoplastes intacts qui flottent à la jonction du saccharose est recueilli soigneusement à l'aide d'une pipette Pasteur et transféré dans un nouveau tube à centrifugeuse. On ajoute à cela 4 ml de solution de lavage qu'on centrifuge à 100 g pendant 2 autres minutes. Le culot est à nouveau suspendu dans 2 ml de solution de lavage et la densité est ajustée en comptant une portion de protoplastes dans un hémocytomètre.

Test de viabilité des protoplastes :

On teste la viabilité des protoplastes par la coloration au diacétate de fluorescéine (FDA) (Widholm, 1972). Les protoplastes sont examinés avec un microscope à fluorescence (Leitz, Allemagne) en utilisant un filtre d'excitation BP 450-490 et un filtre de suppression LP515. Les protoplastes viables sont d'un vert brillant fluorescent.

Culture des protoplastes :

Culture liquide :

Les protoplastes sont transformés en boulettes à partir de la solution de lavage à 100 g pendant 2 min et resuspendus dans un milieu de culture stérilisé par filtration (milieu MS contenant 0,6 M de glucose, 1 mg/l de 2,4-D, 0,5 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, pH 5,8). La densité des protoplastes est ajustée à $2,5 \times 10^5$ / ml et 1,5 ml de suspension est cultivé dans des boîtes de petri de 35 mm (Nune, Danemark) à l'obscurité à $25 \pm ^\circ \text{C}$.

Culture sur billes d'agarose :

Les protoplastes (5×10^5 / ml) suspendus dans le milieu de culture sont mélangés avec un volume égale d'Agarose testé sur culture de cellule à 1,2 % à point de fusion faible (Sigma, USA) préparé dans un milieu de culture et cultivé sur des billes d'agarose dans des boîtes de Petri de 35 mm. Après leur solidification, on leur verse dessus le milieu de culture liquide et les boîtes de petri sont scellées avec un film. Ces boîtes de Petri sont placées dans des boîtes en Plexiglas et sont incubées à l'obscurité à $25 \pm ^\circ \text{C}$.

Couches d'alginate de calcium :

Les protoplastes à une densité de 5×10^5 / ml sont mélangés avec un volume égal d'alginate de sodium à 1,2 % préparé dans la solution de lavage et on verse 1 ml de ce mélange sur 3 ml de milieu solidifié (30 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6 M de mannitol, 0,8 % d'agarose, 5mM MES ; pH 7,0) dans des boîtes de petri de 35 mm. L'absorption progressive du calcium par la couche intérieure entraîne la formation d'alginate de calcium qui se solidifie et donc immobilise les protoplastes.

Après une heure, on ajoute 1 ml de solution de lavage (15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 M de mannitol, 5 mM de MES ; pH 5,7) et on l'incube à 4°C dans une chambre froide pendant 1 hr. La couche d'alginate de calcium est retirée à l'aide d'une spatule et transférée sur une boîte de Petri de 55 mm contenant 2 ml de milieu de culture. On lave la couche d'alginate avec le milieu de culture qui est ensuite remplacé par du milieu frais.

On constitue quatre parties à partir de ce disque rond à l'aide d'une spatule et on les fait flotter dans 2 à 3 ml de milieu de culture. Toutes les cultures sont incubées dans l'obscurité et on les observe périodiquement sous le microscope. On estime la fréquence de division après 15 jours de culture.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolement des protoplastes :

Avec l'avancée de la technologie de culture des tissus de plantes, on a mis au point des systèmes de régénération des plantes à partir de protoplastes chez de nombreuses espèces de plantes. Bien qu'il existe deux rapports sur la régénération à partir de protoplastes du mûrier papier *Broussonetia kazinoki* (Oka et Ohyama, 1985 ; Katagiri, 1991) qui appartient aussi à la famille des Moraceae, l'espèce *Morus* est toujours récalcitrante pour la régénération à partir de protoplastes isolés. Cette étude a donc été initiée pour un isolement efficace des protoplastes à partir des tissus du mésophylle de plantules cultivées *in vitro* ainsi qu'à partir de tissus matures cultivés sur le terrain (*in vivo*). Bien que les données présentées concernent essentiellement les tissus de plantules, elles concernent aussi les tissus matures dont la description apparaît dans les paragraphes suivants sur la culture des protoplastes. Dans les expériences initiales, des paramètres physiques et chimiques différents sont testés pour obtenir le rendement le plus élevé en protoplastes et les résultats sont les suivants :

Enzymes pour l'isolement :

Pendant la standardisation de la solution d'enzyme, on observe que la macérozyme à 1 %, la pectyolase à 0,1 % et la cellulase à 2 % dans la solution de sels CPW donne le rendement maximum

en protoplastes de 2×10^6 / g poids frais (Tableau I). Le test de viabilité avec le FDA indique aussi une viabilité maximum (jusqu'à 90 %) avec la même solution d'enzyme (Tableau I).

Influence de l'osmoticum et du pH :

La présence d'osmoticum est vitale pour l'intégrité des protoplastes. On a ainsi employé des sucres différents à 0,6 M dans la solution d'enzymes. On trouve que le mannitol est invariablement le meilleur et il est employé comme osmoticum pour une expérimentation ultérieure (Tableau II) à une concentration de 0,6 M. Puisque l'isolement des protoplastes est un processus enzymatique, on a fait varier le pH de la solution d'enzyme de 4,8 à 6,2. Comme on pouvait s'y attendre la libération optimale de protoplastes a lieu avec un pH de 5,6 tandis qu'un pH plus acide et plus basique a un effet néfaste sur le rendement en protoplastes (Tableau II).

Influence de la température et de la durée d'incubation :

L'incubation est réalisée à des températures variées entre 4° à 40° C pour trouver la température d'incubation optimale et on contrôle étroitement la durée d'incubation. Le rendement en protoplastes est le plus élevée à 26° C (Tableau II) et la durée optimale pour l'incubation est de 14 à 16 h (Tableau II), comme l'ont déjà signalé des chercheurs précédemment.

Effet de l'agitation :

Les boîtes de petri contenant le tissu foliaire et le mélange d'enzymes sont conservées de manière stationnaire ainsi que sur une secoueuse rotative à des vitesses variées (20 à 100 rpm) pour l'isolement du protoplaste. Le rendement est presque le même à l'état stationnaire ou à 20 ou 40 rpm (Tableau II) mais la qualité de la préparation apparaît plus uniforme et robuste quand on les garde sur une secoueuse. Avec les expériences suivantes, les matériaux sont donc maintenus à 20-40 rpm pendant la période d'incubation.

Dans cette étude, nous avons observé que comme avec d'autres dicotylédones, les feuilles de *Morus* sont aussi une bonne source de protoplastes. Nous avons aussi des conditions standardisées qui nous donnent le rendement maximum en protoplastes jusqu'à 2×10^6 / g poids frais à partir de plantules cultivées *in vitro* et approximativement $1,5-2 \times 10^6$ / g poids frais à partir du matériel foliaire mature obtenu provenant de plantes cultivées sur le terrain (*in vivo*). Pour un isolement efficace des protoplastes chez le mûrier, il faut incuber les explants de feuilles dans une solution de macérozyme à 1 %, de Pectolyase à 0,1 % et de cellulase à 2 % préparée dans une solution de sels de CPW (0,6M mannitol, 5mM de MES), pH 5,6, avec une agitation à 26° C pendant 14 à 16h.

Viabilité des protoplastes :

Les protoplastes ont pu être isolés en nombre élevé (2×10^6 à 10^7) à partir des feuilles de plants de 3 à 4 semaines cultivés de manière antiseptique ainsi qu'à partir d'autres explants comme le cal, les cotylédons et les racines (les données ne sont pas montrées). Néanmoins, seuls les protoplastes isolés à partir du tissu foliaire sont obtenus en nombre suffisant et ils s'avèrent adaptés pour des expérimentations ultérieures. Les protoplastes de la feuille sont viables à 90 %.

Culture de protoplastes :

Les protoplastes isolés à partir des feuilles (*in vitro* et *in vivo*) quand on les cultive dans un milieu liquide présentent une formation de paroi (60 %). Cependant, ils ne montrent aucune division et seuls les agrégats sont visibles. Les protoplastes de la feuille, quand ils sont incorporés dans des billes d'agarose flottant dans un milieu liquide ou dans des billes / des couches d'alginate de calcium commencent à se diviser après une semaine de culture (Fig. 1a-c) à une densité de culture de $0,5 \times 10^6$ / ml, tandis qu'il ne se produit aucune division quand les protoplastes sont cultivés à une faible densité.

Les protoplastes sont cultivés dans du milieu de base MS ou B5 additionné avec des hormones variées à une densité de $0,5 \times 10^5$ /ml et disposés dans des billes d'agarose ou des couches d'alginate de calcium. Pour la culture des protoplastes, on trouve que le glucose est le meilleur à une concentration de 0,6 M. On observe des formations jusqu'à 4 cellules (5 à 7 % de protoplastes cultivés) dans les formulations de milieux suivantes :

- i. MS + 0,6 M glucose, 1 mg/l TDZ, 15 % de lait de noix de coco
- ii. MS + 0,6 M glucose, 1 mg/l TDZ, 1 mg/l 2,4 D, 15 % de lait de noix de coco
- iii. MS + 0,6 M glucose, 1 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4 D, 15 % lait de noix de coco
- iv. MS + 0,6 M glucose, 1 mg/l TDZ, 1 mg/l 2,4 D, 5 mg/l d'hydrolysate de caséine

Après 30 jours, des microcolonies de 8 à 12 cellules se forment (Fig. 1 d, e) dans le milieu de culture de base MS additionné avec 0,6 M de glucose, 1 mg/l de 2,4 D ; 0,5 mg/l de BAP ; 0,1 mg/l de NAA et 2mg/l d'AgNO₃. Les protoplastes présentent ici la fréquence de division la plus élevée (13 à 15 %). Les microcolonies, cependant, ne prolifèrent pas plus malgré une sous-culture régulière et le renouvellement du milieu de culture avec du milieu frais. Ces résultats indiquent que la régénération des plants à partir de protoplastes demande au moins trois milieux avec des changements des niveaux d'auxine, de cytokinine et d'osmoticum : un milieu de régénération adapté pour la formation de la paroi cellulaire et le commencement des divisions cellulaires entraînant des colonies visibles, un milieu de différenciation de la pousse contenant un osmoticum diminué et d'autres ajouts et finalement un milieu de différenciation de la racine (voir aussi Maheshwari et coll., 1986). Bien que cette procédure ait été standardisée pour l'isolement du protoplaste du mésophylle à partir de plantules cultivées *in vitro*, elle peut aussi être appliquée à des tissus matures obtenus à partir de plants cultivés sur le terrain (*in vivo*) non seulement en terme d'isolement de protoplastes mais aussi pour la culture de protoplastes. Néanmoins, il faudrait entreprendre plus d'efforts pour découvrir les besoins essentiels des protoplastes du mésophylle de la feuille de *Morus* en division pour la régénération de plants complets et leur utilisation efficace dans des programmes d'amélioration du mûrier.

A PROTOCOL TO REDUCE THE COST OF *IN VITRO* PROPAGATED PLANTS OF MULBERRY

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

Tissue Culture and Cytogenetics Laboratory, Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056.

*In the present investigation, the cost of the Murashige and Skoog's Basal Medium (MSBM) is found to be Rs. 21.628304 (0.4378 US \$) per litre based on the quality of ingredients used for micropropagation of mulberry **Morus indica** L. Cv. S54. It was observed that the sucrose accounts for 24.97% and agar for 68.06% of the basal medium cost. Therefore, in order to reduce the cost of basal medium, cheaper and suitable alternatives like sugar crystals, double refined sugar, eating sugar, sugarcane juice in place of sucrose and white flour, wheat flour, laundry starch, rice powder, potato powder, semolina and sago in place of gelling agent agar at different concentrations and in combination were tried for *in vitro* multiplication of mulberry. It was found in the present study that eating sugar (3%) plus laundry starch:potato powder:semolina (50:25:25 – 3%) in MSBM are best alternative source to replace sucrose and agar respectively for 1:8 multiplication rate of mulberry. Further, the analysis of the results clearly indicates that the cost of the *in vitro* plant can be reduced by adopting this technology.*

Keywords: Murashige and Skoog's Basal Medium, alternative source, sucrose, agar, multiplication, cost reduction, *in vitro* plant.

INTRODUCTION

Since three decades, the technology of commercial micropropagation has not altered in any major way (George, 1996). Although, much work has been done on large scale production of plants involving techniques such as automation of existing procedures (Levin, 1988) and the production of somatic embryos (Arima *et al.*, 1989; Stuart *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 1990; Zimmerman, 1993; Dave and Batra, 1995; Tomar *et al.*, 1999), the use of these technologies for commercial *in vitro* plant propagation is not wide spread and so far they have not had any impact on large scale multiplication of many commercially important plant systems.

However, the tissue culture technology is used as a valuable and viable tool for large scale *in vitro* multiplication of commercial crops (George, 1996). In this direction, varieties of plants were tried based on the existing production parameters in the commercial laboratories. It is necessary to know the production cost per plant and various strategies to lower the production cost per plant basis (Prakash and Pierik, 1993). Further, the input per litre of the medium generally reflects on the cost of the plant produced such as the price of sucrose and agar. Keeping this in view, in the present investigation cheaper and suitable alternatives were tried in place of sucrose and agar with the main aim of reducing the cost of multiplication medium for *in vitro* micropropagation of mulberry.

* Silkworm Genetics and Breeding Laboratory, Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore - 560 056, India.

MATERIAL AND METHODS

The non-embryogenic propagules of *Morus indica* L. Cv. S₅₄, a popular beneficial mutant, were used as the source material on Murashige and Skoog's Basal Medium (MSBM). The cost of MSBM (Table I) per litre was calculated by obtaining the cost of its various ingredients from SD Fine, Qualigens, Ranbaxy and Labo Chemicals. Based on the lowest cost of the ingredients, sucrose accounted for 24.97% and agar for 68.06% of the basal media cost.

In order to reduce the cost of multiplication medium, in the present study cheaper and suitable alternatives like sugar crystals, double refined sugar, eating sugar, sugarcane juice in place of sucrose (Table II) and white flour, wheat flour, laundry starch, rice powder, potato powder, semolina and sago in place of agar (Table III) at different concentrations and in combination were tried to analyse the multiplication rate of mulberry per plant basis.

RESULTS AND DISCUSSION

It was interesting to note that the eating sugar and sugar crystals can safely replace the carbon source sucrose for *in vitro* micropropagation of mulberry. The cost of the sucrose per litre of media based on the suppliers of ingredients ranges from Rs. 5.4 - 6.36 (0.11 - 0.13 US \$) and accounts for 23.52% - 27.14% of the total media cost. It was estimated that the cost of carbon source per litre basal media will be Re. 0.50 (0.01 US \$) and Rs. 1.80 (0.04 US \$) when eating sugar (3%) and sugar crystals (3%) is used thereby reducing the cost of carbon source substantially by 90.74% - 92.13% and 66.66% - 71.69% respectively in the multiplication media (Table I).

Similarly, the cost of the gelling agent agar per litre of the basal media ranges from Rs. 14.72 - 16.00 (0.30 - 0.32 US \$) and accounts for 64.87% - 69.70% of the total media cost. In the present investigation, the combination of laundry starch, potato powder and semolina (50:25:25 - 3%) is found to be the best gelling agent when compared to other gelling agents tried. Further, the cost of the combination used as gelling agents in the present study is Rs. 1.18 (0.02 US \$) per litre media thereby reducing the cost of gelling agent by 91.98% - 92.62% (Table I). This coincides with the findings of Prakash and Picrik (1993) and Strode and Abner (1986).

It was observed in the present study that eating sugar (3%) plus laundry starch:potato powder:semolina (50:25:25 - 3%) in MSBM are best alternative source to replace sucrose and agar respectively for 1:8 multiplication rate of mulberry (Table II & III). Further, the analysis of the results clearly indicates that the cost of the *in vitro* propagated plant by using alternative source will be Re. 0.003 (0.00007 US \$) when compared to Re. 0.02 (0.0004 US \$) using agar and sucrose. This agrees with the findings of Soczek and Hempel (1988). They have reported that simplified media does contribute towards reduction of plant production cost. Further, de Fossard (1976) reported that media cost can also be reduced by culturing more shoots per culture vessels.

Perusal of earlier literature reveals alternative starch based gelling agents tried by Sorvari (1986), Henderson and Kinnersley (1988) and Ichi *et al.*, (1986) without any success. The use of eating sugar as carbon source and laundry starch, potato powder and semolina as an alternative and cost-effective gelling agent is reported for the first time.

From the present investigation, it is clear that even if the profit margins, capital expenditure and overheads are not reduced, it is possible to reduce the cost of multiplication media by 75%, taking advantage of the methods adopted in the present study.

Table I. Comparative costs of the basal media used for mulberry tissue culture.

Tableau I. Coûts comparatifs des milieux de base utilisés pour la culture de tissus de mûrier.

Ingredients of basal media	Quantity (mg/l)	S.D.Fine (Re)	Qualigens (Re)	Ranbaxy (Re)	Labo -chemicals Produits chimiques de labo (Re)	Minimum priced Chemicals used Prix minimum des produits chimiques utilisés	
<i>Ingrédients des milieux de base</i>	<i>Quantité (mg / l)</i>						
KNO ₃	1900	0.357200	0.372400	0.342000	0.349600	0.342000	R **
NH ₄ NO ₃	1650	0.280500	0.346500	0.273900	0.297000	0.273900	R
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	0.077440	0.088000	0.072160	0.083600	0.072160	R
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	0.056980	0.059200	0.050320	0.055500	0.050320	R
KH ₂ PO ₄	170	0.056620	0.065280	0.062900	0.063920	0.056620	SDF
Na ₂ .EDTA	37.3	0.027975	0.029840	0.027602	0.028721	0.027602	R
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	0.003669	0.006950	0.003892	0.004448	0.003669	SDF
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	0.005173	0.005352	0.004549	0.004906	0.004549	R
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	0.002752	0.001857	0.001634	0.001720	0.001634	R
H ₃ BO ₃	6.2	0.001574	0.001674	0.001636	0.001612	0.001574	SDF
KI	0.83	0.002436	0.002207	0.002191	0.002241	0.002191	R
NaMO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.000394	0.000392	0.000400	0.000400	0.000392	Q
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.000006	0.000007	0.000007	0.000006	0.000006	SDF
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.000083	0.000084	0.000084	0.000083	0.000083	SDF
Myo-inositol	100	0.663000	0.880000	0.940000	0.800000	0.663000	SDF
Nicotinic acid	0.5	0.000795	0.001100	0.001150	0.001000	0.000795	SDF
Pyridoxine HCl	0.5	0.005385	0.006050	0.006120	0.006000	0.005385	SDF
Thiamine HCl	0.1	0.000949	0.000900	0.000930	0.000960	0.000900	Q
Glycine	2.0	0.001524	0.001560	0.001600	0.001540	0.001524	SDF
SUCROSE	30000	5.40	6.36	5.7	5.7	5.4	SDF
AGAR	8000	16.00	15.2	14.72	14.88	14.72	R
Total cost of the medium / Coût total du milieu	(Rs)	22.953455	23.429353	22.213075	22.283257	21.628304	
Total cost of the medium / Coût total du milieu	(US\$) ***	0.4646	0.4742	0.4496	0.4510	0.4378	
Sucrose % in the medium / % de Saccharose dans le milieu		23.52%	27.14%	25.66%	25.57%	24.97%	
Agar % in the medium / % d'agar dans le milieu		69.70%	64.87%	66.26%	66.77%	68.06%	
Cost per plant in Rupee / Coût par plant en Roupies		1 : 0.02	1 : 0.02	1 : 0.02	1 : 0.02	1 : 0.02	
Cost per plant in US \$ / Coût par plant en US \$		1 : 0.0004	1 : 0.0004	1 : 0.0004	1 : 0.0004	1 : 0.0004	

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

Ingredients of basal media	Quantity (mg/lit.)	S.D.Fine (Re)	Qualigens (Re)	Ranbaxy (Re)	Labo -chemicals (Re)	Minimum priced Chemicals used
<i>Ingrédients des milieux de base</i>	<i>Quantité (mg / l)</i>				<i>Produits chimiques de labo (Re)</i>	<i>Prix minimum des produits chimiques utilisés</i>
ALTERNATIVE SOURCE / SOURCES ALTERNATIVES						
EATING SUGAR (3%) + LS:PP:S* (50:25:25-3%) / SUCRES COMESTIBLES + LS:PP:S* (50:25:25-3%)						
Reduction in agar cost (%) / Réduction du coût de l'agar (%)		92.62	92.23	91.98	92.06	91.98
Reduction in sucrose cost (%) / Réduction du coût du saccharose (%)		90.74	92.13	91.23	91.23	90.74
Reduction in total cost of media (%)		85.93	84.85	84.36	84.83	85.26
<i>Réduction du coût total du milieu (%)</i>						
Cost per plant in Rupee / Coût par plant en Roupies		1:0.003	1:0.004	1 : 0.003	1 : 0.003	1 : 0.003
Cost per plant in US \$ / Coût par plant en US \$		1:0.00007	1:0.00007	1:0.00007	1:0.00007	1:0.00007
SUGAR CRYSTALS (3%) + LS:PP:S* (50 : 25 : 25-3%) / SUCRE CRISTAL (3 %) + LS : PP : S* (50:25:25-3%)						
Reduction in agar cost (%) / Réduction du coût de l'agar (%)		92.62	92.23	91.98	92.06	91.98
Reduction in sucrose cost (%) / Réduction du coût du saccharose (%)		66.66	71.69	68.42	68.42	66.66
Reduction in total cost of media (%)		80.26	79.30	78.52	78.99	79.25
<i>Réduction du coût total du milieu (%)</i>						
Cost per plant in Rupee / Coût par plant en Roupies		1 : 0.005	1 : 0.005	1 : 0.005	1 : 0.005	1 : 0.004
Cost per plant in US \$ / Coût par plant en US \$		1:0.00009	1:0.00009	1:0.00009	1:0.00009	1:0.00009

* LS:PP:S - Laundry Starch : Potato powder : Semolina / Amidon de blanchisserie : Poudre de pomme de terre : Semoule.

** Q : Qualigens ; SDF : S.D.Fine ; LC : Labo-chemicals / Produits chimiques de laboratoire ; R : Ranbaxy.

*** 1 US \$ = Rs. 49.40

Table III. Different agar alternatives used in the multiplication medium of mulberry tissue culture.**Tableau III. Différentes alternatives à l'agar utilisées dans le milieu de multiplication pour la culture de tissus de mûrier.**

Agar alternatives	Multiplication ratio	Culture duration	Nature of medium	Remarks
<i>Alternatives à l'agar (%)</i>	<i>Taux de multiplication</i>	<i>Durée de culture</i>	<i>Nature du milieu</i>	<i>Remarques</i>
White flour (8 %) <i>Farine blanche (8 %)</i>	1 : 1	3 weeks <i>3 semaines</i>	Proper solidification <i>Solidification correcte</i>	Below average growth of cultures <i>Croissance des cultures au-dessous de la moyenne</i>
Wheat flour (10 %) <i>Farine de blé (10 %)</i>	1 : 0	3 weeks <i>3 semaines</i>	Sloppy medium <i>Milieu trop liquide</i>	Poor growth of cultures <i>Mauvaise croissance des cultures</i>
Laundry starch (6 %) <i>Amidon de blanchisserie (6 %)</i>	1 : 1	3 weeks <i>3 semaines</i>	Proper solidification <i>Solidification correcte</i>	Poor growth of cultures <i>Mauvaise croissance des cultures</i>
Potato powder (7 %) <i>Poudre de pomme de terre (7 %)</i>	1 : 4	3 weeks <i>3 semaines</i>	Sloppy medium <i>Milieu trop liquide</i>	Below average growth of cultures <i>Croissance des cultures au-dessous de la moyenne</i>
Rice powder (11 %) <i>Poudre de riz (11 %)</i>	1 : 0	3 weeks <i>3 semaines</i>	Sloppy medium <i>Milieu trop liquide</i>	Poor growth of cultures <i>Mauvaise croissance des cultures</i>
Semolina (5%) <i>Semoule (5 %)</i>	1 : 3	3 weeks <i>3 semaines</i>	Sloppy medium <i>Milieu trop liquide</i>	Below average growth of cultures <i>Croissance des cultures au-dessous de la moyenne</i>
Sago (7 %) <i>Sagou (7 %)</i>	1 : 5	3 weeks <i>3 semaines</i>	Proper solidification <i>Solidification correcte</i>	Normal growth of cultures <i>Croissance normale des cultures</i>
Laundry starch + Potato Powder + semolina (50 : 25 : 25-3 %) <i>Amidon de blanchisserie + poudre de pomme de terre + semoule</i>	1 : 8	3 weeks <i>3 semaines</i>	Solidification as good as agar based medium <i>Solidification aussi bonne qu'avec un milieu à base d'agar</i>	Good growth of cultures <i>Bonne croissance des cultures</i>

Table II. Different carbon sources used in the multiplication medium of mulberry tissue culture.

Tableau II. Différentes sources de carbone utilisées dans le milieu de multiplication pour la culture de tissus de mûrier.

Carbon sources	Multiplication ratio	Culture duration	Remarks
<i>Sources de carbone</i>	<i>Taux de multiplication</i>	<i>Durée de la culture</i>	<i>Remarques</i>
Sugar crystals (3%) <i>Sucre cristallisé (3 %)</i>	1 : 8	3 weeks <i>3 semaines</i>	Healthy cultures <i>Culture saine</i>
Double refined sugar (3%) <i>Sucre raffiné deux fois (3 %)</i>	1 : 4	3 weeks <i>3 semaines</i>	Healthy cultures <i>Culture saine</i>
Eating sugar (3%) <i>Sucre alimentaire (3 %)</i>	1 : 8	3 weeks <i>3 semaines</i>	Healthy cultures <i>Culture saine</i>
Sugarcane juice (10% v/v) <i>Jus de canne à sucre</i>	1 : 3	3 weeks <i>3 semaines</i>	Drying of leaf tips <i>Dessèchement des extrémités de feuilles</i>
Sucrose (3%) <i>Saccharose (3 %)</i>	1 : 8	3 weeks <i>3 semaines</i>	Healthy cultures <i>Culture saine</i>

This will have a far-reaching implication on commercial tissue culture laboratories for large-scale production of any plant system. The whole experimental analysis calculated is confined to Indian context.

REFERENCES

- ARIMA Y., OKII M. & KAI M. 1989. Propagation of somatic plant embryos – with production of embryogenic tissue in presence of ancymidol. European Patent Applic. No. 328424.
- DAVE A. & BATRA A. 1995. Somatic tissues leading to embryogenesis in cumin. *Curr. Sci.* 68(7) : 754-755.
- DE FOSSARD R.A. 1976. Tissue culture for plant propagation. Dept. continuing education, Univ. of New England, NSW 2341, Australia.
- FUJII J.A., SLADE D. & REDENBAUGH M.K. 1990. Method of plant somatic embryo production in tissue culture for planting in growth chamber, greenhouse or as a true seed. World Patent Applic. No. 9000002.
- GEORGE E.F. 1996. In: George, E.F. (Ed.), Plant propagation by tissue culture. Part 2: In Practice, Exegetics Ltd., Edington, England.
- HENDERSON W.E. & KINNERSLEY A.M. 1988. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 15 : 17 - 22.
- ICHI T, KODA T, ASAI I, HATANAKA A. & SEKIY J. 1986. Effect of gelling agent on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric. Biol. Chem.* 50 : 2397 – 2399.

- LEVIN R. 1988. Plant tissue cell cultivation containing meristematic areas aseptically transported to sieve, then propagules transferred to culture vessel. European Patent No. 132414.
- PRAKASH, J. & PIERIK, R.L.M. 1993. In: Prakash, J. and Pierik, R.L.M. (Eds.), Plant Biotechnology-Commercial prospects and problems, Oxford and IBH Publishing Co., Pvt., Ltd., New Delhi : 1.
- SOCZEK U. & HEMPEL M. 1988. The influence of some organic medium compounds on multiplication of gerbera *in vitro*. Acta Hort., 226 : 643-646.
- SORVARI S. 1986. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. Ann. Agric. Fenn. 25 : 135 - 138.
- STRODE R.A. & ABNER G. 1986. Large scale tissue culture production for horticultural crops. In : Zimmerman *et al.*, (Eds.) 1986 (q.v.), pp. 367-371.
- STUART D.A., MCCALL C.M. & SLADE D. 1990. Improved somatic embryogenesis – using induction medium containing synthetic auxin analogues. World Patent Applic. No. 9001058.
- TOMAR A., RATHORE R.S., CHAND L. & GARG G.K. 1999. Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures of chickpea (*Cicer arietinum*). In : Abst. Vol. of Natl. Symp. on role of plant tissue culture in biodiversity, conservation and economic development. G. B. Pant Institute of Himalayan Environment and Development, Almora, pp. 16.
- ZIMMERMAN J.L. 1993. Somatic embryogenesis : a model for early development in higher plant. The Plant Cell, 5 : 1411-1423.

PROTOCOLE POUR REDUIRE LE COUT DE LA MULTIPLICATION DE PLANTS DE MURIER *IN VITRO*

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

Tissue Culture and Cytogenetics Laboratory, Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056.

Dans cette étude, le coût du milieu de base de Murashige et Skoog (MSBM) s'avère être de 21,628304 Rs (0,4378 US \$) par litre en fonction de la qualité des ingrédients utilisés pour la micro-multiplication du Cv. S54 du mûrier *Morus indica* L. On observe que le saccharose représente 24,97 % et l'agar 68,06 % du coût du milieu de base. Pour réduire le coût du milieu de base, nous avons donc essayé des alternatives meilleur marché et adaptées comme le sucre cristallisé, le sucre doublement raffiné, le sucre alimentaire, le jus de canne à sucre à la place du saccharose et comme la farine blanche, la farine de blé, l'amidon de blanchisserie, la poudre de riz, la poudre de pomme de terre, la semoule et le sagou à la place de l'agent de gélification (agar) à différentes concentrations et en combinaison pour la multiplication du mûrier *in vitro*. Nous avons trouvé dans cette étude que le sucre alimentaire (3 %) plus amidon de blanchisserie : poudre de pomme de terre : semoule (50 : 25 : 25 – 3 %) dans du MSBM est la meilleure alternative pour remplacer respectivement le saccharose et l'agar avec un taux de multiplication du mûrier de 1 – 8. L'analyse des résultats indique clairement qu'on peut diminuer le coût du plant *in vitro* en adoptant cette technologie.

INTRODUCTION

Depuis trois décennies, la technologie de micro-multiplication commerciale n'a pas beaucoup changé (George, 1996). Bien que beaucoup de travaux aient été entrepris sur la production de plants à grande échelle avec des techniques d'automatisation des procédures existantes (Levin, 1988) et sur la production d'embryons somatiques (Azima et coll., 1989 ; Stuart et coll., 1990 ; Fujii et coll., 1990 ; Zimmerman, 1993 ; Dave et Batra, 1995 ; Tomar et coll., 1999), l'utilisation de ces technologies pour la multiplication commerciale de plants *in vitro* n'est pas répandue et jusqu'à présent elles n'ont pas eu d'impact sur la multiplication à grande échelle de nombreux plants commercialement importants. Cependant, la technologie de la culture des tissus est utilisée comme un outil précieux et viable pour la multiplication *in vitro* à grande échelle des cultures commerciales (George, 1966). Aussi, avons nous fait des essais avec des variétés de plantes en nous basant sur les paramètres de production des laboratoires commerciaux. Il est nécessaire de connaître le coût de production par plant et les diverses stratégies de diminution du coût de production par plant (Prakash et Pierik, 1993). De plus, l'apport par litre de milieu de saccharose et d'agar se répercute en général sur le coût du plant produit. Compte tenu de cela, nous avons essayé dans cette étude, des alternatives meilleur marché et adaptées à la place du saccharose et de l'agar dans le but principal de réduire le coût du milieu de multiplication pour la micro-multiplication du mûrier *in vitro*.

MATERIELS ET METHODES

Les propagules non-embryogéniques du Cv. S54 de *Morus indica* L., un mutant bénéfique populaire, sont utilisées comme matériau source avec du Milieu de Murashige et Skoog de Base

* Silkworm Genetics and Breeding Laboratory, Department of Zoology.

(MSBM). Le coût du MSBM (Tableau I) par litre est calculé en obtenant le coût le moins cher des ingrédients de SD Fine, Qualigens, Ranbaxy et Labo Chemicals. D'après le coût le moins cher des ingrédients, le saccharose représente 24,97 % et l'agar 68,06 % du coût du milieu de base.

Pour réduire le coût du milieu de multiplication, nous avons essayé dans cette étude des alternatives meilleur marché et adaptées comme les cristaux de sucre, le sucre doublement raffiné, le sucre alimentaire, le jus de canne à sucre à la place du saccharose (Tableau II) et la farine blanche, la farine de blé, l'amidon de blanchisserie, la poudre de riz, la poudre de pomme de terre, la semoule et le sagou à la place de l'agar (Tableau III) à différentes concentrations et en combinaison pour analyser le taux de multiplication du mûrier par plant.

RESULTATS ET DISCUSSION

Il est intéressant de noter que le sucre alimentaire et le sucre cristallisé peuvent remplacer sans risque le saccharose comme source de carbone pour la micro-multiplication du mûrier *in vitro*. Le coût du saccharose par litre de milieu d'après les fournisseurs des ingrédients est compris entre 5,4 et 6,36 Rs (0,11 à 0,13 US \$) et représente entre 23,52 % et 27,14 % du coût total du milieu. On estime que le coût de la source de carbone par litre de milieu de base est de 0,50 Re. (0,01 US \$) et de 1,80 Rs. (0,04 US \$) quand le sucre alimentaire (3 %) et les sucres cristallisés (3 %) sont utilisés, ce qui réduit considérablement le coût de la source de carbone de 90,74 %-92,13 % et de 66,66-71,69 % respectivement pour le milieu de multiplication (Tableau I).

De même, le coût de l'agent de gélification par litre de milieu de base est compris entre 14,72 et 16,00 Rs (0,30 à 0,32 US\$) et représente 64,87 % à 69,70 % du coût total du milieu. Dans cette étude, la combinaison d'amidon de blanchisserie, de poudre de pomme de terre et de semoule (50 : 25 : 25 - 3 %) s'avère le meilleur agent de gélification par comparaison aux autres agents de gélification essayés. Le coût de la combinaison utilisée comme agent de gélification est de 1,18 Rs (0,02 US \$) par litre de milieu, ce qui réduit le coût de l'agent de gélification de 91,98 %-92,62 % (Tableau I). Cela confirme les observations de Prakash et Pierik (1993) et de Strode et Abner (1986).

On observe dans cette étude que le sucre comestible (3 %) plus amidon de blanchisserie : poudre de pomme de terre : semoule (50 : 25 : 25 - 3 %) dans du MSBM est la meilleure alternative de remplacement du saccharose et de l'agar pour un taux de multiplication du mûrier de 1 : 8 (Tableau II & III). De plus, l'analyse des résultats indique clairement que le coût de multiplication du plant *in vitro* en utilisant une source alternative sera de 0,003 Re (0,00007 US \$) par comparaison à 0,02 Re. (0,0004 US \$) en utilisant de l'agar et du saccharose. Cela confirme les observations de Soczek et Hempel (1988) qui ont rapporté que la simplification du milieu contribue à la réduction du coût de production du plant. De plus, de Fossard (1976) a signalé qu'on peut aussi diminuer le coût du milieu en cultivant plus de pousses par récipient de culture.

L'étude de la littérature révèle l'utilisation d'alternatives à base d'amidon comme agent de gélification par Sorvari (1986), Henderson et Kinnersley (1988) et Ichi et coll., (1986) mais sans aucun succès. C'est la première fois que l'on rapporte l'utilisation de sucres comestibles comme source de carbone et d'amidon de blanchisserie, poudre de pomme de terre et semoule comme agent de gélification rentable.

D'après notre étude, il est clair que même si les marges de profit, la dépense en capital et les frais généraux ne baissent pas, il est possible de réduire le coût du milieu de multiplication de 75 % en utilisant les méthodes adoptées dans cette étude.

Cela sera d'une portée considérable pour la culture commerciale de tissus en laboratoire de n'importe quelle plante pour une production à grande échelle. Tout le calcul de l'analyse expérimentale se limite au contexte indien.

ASCORBIC ACID, AN INDEX OF FUNGAL INFECTION OF MULBERRY LEAF

S.K.MAJUMDER, P.C.BOSE, N.D.BANERJEE & P. M. PRATHEESH KUMAR

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

*The study was undertaken to find out the concentration of ascorbic acid in healthy and diseased mulberry leaf infected with *Phyllactinia corylea*, *Chaetothyrium* sp. (commonly known as sooty mould), *Aecidium mori* and *Cercospora moricola*. Significant reduction in ascorbic acid content is observed in all the varieties while *Phyllactinia corylea* and *Chaetothyrium* sp. caused more reduction in ascorbic acid content than *Aecidium mori* and *Cercospora moricola* infected leaves. Interactions between parasite and host genotype were also studied.*

Keywords: Ascorbic acid, fungal infection, index.

INTRODUCTION

Mulberry foliage is the sole food of the silkworm, *Bombyx mori* L. Hence, the foliar diseases of mulberry are to be considered seriously as they cause direct damage to the foliage resulting in considerable loss of leaf yield and also its quality.

Many diseases of mulberry are known to alter the biochemical composition and physiological processes in the host (Shree and Nataraja, 1993). A survey of literature (Shree *et al.*, 1986; Shree and Sullia, 1988; Umesh Kumar and Shree, 1990; Umesh Kumar, 1991; Sundareswaran *et al.*, 1988) reveals that ascorbic acid content of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in healthy and diseased state induced by pathogenesis has not been worked out. Realizing the importance of ascorbic acid in the metabolism (Sreeramulu *et al.*, 1971; Jain and Arya, 1978) and in order to find out the role of ascorbic acid in the altered physiology of host during pathogenesis (Joshi *et al.*, 1977), quantitative estimation of ascorbic acid was undertaken in the healthy and diseased parts of mulberry foliage infected with *Phyllactinia corylea*, *Chaetothyrium* sp. (commonly known as sooty mould), *Aecidium mori* and *Cercospora moricola*.

MATERIALS AND METHODS

Healthy and *Phyllactinia corylea*, *Chaetothyrium* sp., *Aecidium mori* and *Cercospora moricola* infected mulberry leaves (2 months' old) of the popular varieties of Northern India, i. e., S-1 and S-1635 alongwith local, were collected from the experimental field of Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, West Bengal. The plucked leaves were homogenized in a mortar with 5% (W/V) metaphosphoric acid and 10% (V/V) glacial acetic acid mixture and centrifuged. The process was repeated three times. The pooled extract was used for ascorbic acid determination following the method of Roe and Kuether (1943).

RESULTS AND DISCUSSION

Healthy leaves of all the mulberry varieties showed higher concentration of ascorbic acid in comparison to the diseased leaves (Table I). This is in agreement with the findings of Mapson (1964). Earlier workers (Aberg, 1958; Barker and Mapson, 1952; Franke, 1959) also reported that the synthesis of ascorbic acid is dependent on the quantity of sugar precursors and the intensity of respiratory activity.

Table I. Effect of fungal pathogens on the ascorbic acid content (mg/g fresh tissue) of mulberry leaf.

Tableau I. Effet des pathogènes fongiques sur la teneur en acide ascorbique (mg / g tissu frais) de la feuille de mûrier.

Variety	Healthy leaf	<i>Phyllactinia corylea</i> infected leaf	<i>Chaetothyrium</i> sp. infected leaf	<i>Aecidium mori</i> infected leaf	<i>Cercospora moricola</i> infected leaf
Variété	Feuille saine	Feuille infestée par <i>Phyllactinia corylea</i>	Feuille infestée par <i>Chaetothyrium</i>	Feuille infestée par <i>Aecidium mori</i>	Feuille infestée par <i>Cercospora moricola</i>
Local	2.169	1.966 (9.36)	1.909 (11.99)	2.107 (2.86)	2.123 (2.12)
S1635	2.274	1.884 (17.15)	1.553 (31.70)	2.130 (6.33)	2.145 (5.67)
S1	2.173	1.440 (33.73)	1.766 (18.73)	2.072 (4.65)	2.015 (7.27)
Source	CD (P = 0.05)				
Disease (D) <i>Maladie (D)</i>	0.12				
Variety (V) <i>Variété (V)</i>	0.09				
Interaction (D × V)	0.21				

Figures in parenthesis are the percent decrease over control, i.e., healthy leaf / Les chiffres entre parenthèses représentent la baisse en pourcentage par rapport au témoin, c'est à dire par rapport à la feuille saine.

The results also indicate that significant reduction is observed in ascorbic acid content even in local variety (Table I). In case of *P. corylea* infected leaves, reduction in ascorbic acid (RAA) content is 9.36% in local variety while the highest is 33.73% in S-1 variety. In case of *Chaetothyrium* sp. infected leaves, it is 11.99% in local variety while the highest found is 31.70% in S-1635 variety. On

the other hand, RAA content varies from 2.86-6.33% and 2.12-7.27% in *A. mori* and *C. moricola* infected leaves respectively. *P. corylea* and *Chaetothyrium* sp. caused more reduction in ascorbic acid content than *A. mori* and *C. moricola*. This difference in the reduction of ascorbic acid content might be due to higher damaging potential of *P. corylea* and *Chaetothyrium* sp. which spread throughout the leaf causing more reduction in photosynthetic activity coupled with higher rate of respiration and, thus, leading to the oxidation of ascorbic acid at a higher rate (Diener, 1963) than *A. mori* and *C. moricola*. Similar observations were made in the fruits of different crops under pathogenesis (Sartaj *et al.*, 1994; Singh and Tandon, 1971; Prasad, 1977; Kalyansundaram, 1955).

The occurrence of lower concentration of ascorbic acid (Table I) in infected leaves seems to be due to the production of ascorbic acid degrading enzymes either by the fungus itself or by the host parasite interaction as postulated by Ghosh *et al.* (1970).

Thus, it prompts the authors to conclude that changes in ascorbic acid concentration are related to the nature of infection and the host genotype.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Dr. J.K. Ghosh, Deputy Director, Central Sericultural Research & Training institute, Berhampore, for his kind encouragement in carrying out this work.

REFERENCES

- ABERG B. (1958) A parallelism between ascorbic acid and reducing sugars content in tomato leaves. Encyclopedia of Plant Physiology, Springer- Verlag, Berlin. 6, 479-499
- BARKER J. & MAPSON L.W. (1952) The ascorbic acid content of potato tubers. II. The influence of the temperature of storage. New Phytologist, 51, 90.
- DIENER T.O. (1963) Physiology of virus-infected plants. Ann. Rev. Phytopathol., 1, 197-218.
- FRANKE W. (1959) Die wirkung des Vitamins C auf die Atmung Von Keimlingen. Planta, 53, 551.
- GHOSH A.K., SINGH R.N. & TANDON R.N. (1970) Post infection changes in the sugar content of papaya fruits incited by *Anthracoise* fungi. Proc. Nat. Acad. Sci. India. Section B, Biol. Sci., 39 (1/2), 1-6.
- JAIN H.C. & ARYA H.C. (1978) Free ascorbic acid content of healthy and diseased parts of Bajra (*Pennisetum typhoides* Stapf. & Hubb.) infected with *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Sehroet. Science & Culture, 44, 335-336
- JOSHI R.D., DUBEY L.N. & GUPTA A.K. (1977) Changes in ascorbic acid, carbohydrate and nitrogen contents of Cape gooseberry fruits infected with cucumber mosaic virus. Science & Culture, 43(1), 40-41.
- KALYANSUNDARAM R. (1955) Bioassay of fusarium toxin. Agar-cup method for quantitative evaluation. J.Ind. Bot. Soc. 34 (1), 43-46.
- MAPSON L.W. (1964) The ascorbic acid system in leaves: Further observations on photooxidation and photoreduction. Phytochem., 3 (3), 429-445.
- PRASAD M.M. (1977) Post-infection changes in vitamin C contents of Banana fruits. Curr. Sci., 46, 197-198.
- ROE J.H. & KUETHER C.A. (1943) Determination of ascorbic acid in plant tissues. J. Biol. Chem., 147, 339
- SARTAJ A., TIYAGI & RISHIKUMAR. (1994) Changes in ascorbic acid content in tomato fruit due to infection by *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reinformis*. Ind. Phytopath., 47 (2), 179-180.
- SHREE M.P., BORAIHAH G. & NARAYANA GOWDA S.N. (1986) Preliminary studies in protein content of healthy and powdery mildewed leaves of mulberry using Comassie brilliant blue R-250 assay. J.Plant Sci. Res., 2, 129-132.

- SHREE M.P. & SULLIA S.B. (1988) Effect of mildew and mosaic infection on the chlorophyll content of mulberry. Proceedings of International Congress on Plant Physiology, Vol.I, pp., 459-462.
- SHREE M.P. & NATARAJA S. (1993) Post-infectional biochemical and physiological changes in mulberry. Curr. Sci., 64, 337-341.
- SINGH R.H. & TANDON R.N. (1971) The utilisation of monosaccharides by *Aspergillus niger*. Ind Phytopath., 24(2), 266-269.
- SREERAMULU N., RAJAGOPAL V., RAO M.R.K. & RAO I. M. (1971) Diurnal rhythm in the contents of ascorbic acid and carbohydrate fractions in the leaves of groundnut. Science & Culture. 37 (4), 99-100.
- SUNDARESWARAN P., GOVINDAIAH, SREENIVASAN E.B. & JOLLY M.S. (1988) Effect of leaf rust disease on the nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.) Ind. J. Seric., 27, 159-160.
- UMESH KUMAR N.N. & SHREE M. P. (1990) Some physiological changes in leaves of *Morus alba* L. under pathogenesis. Geobios 17, 140-141.
- UMESHKUMAR N.N. (1991) Physiological studies of mulberry varieties infected by foliar pathogens. Ph. D Thesis. Bangalore Univ., pp. 110-111.

L'ACIDE ASCORBIQUE, INDICE D'INFECTION FONGIQUE DE LA FEUILLE DE MURIER

S. K. MAJUMDER, P. C. BOSE, N. D. BANERJEE & P. PRATHEESH KUMAR

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore – 742 101, Inde.

*L'étude a été entreprise pour déterminer la concentration en acide ascorbique de la feuille de mûrier saine et malade infectée par **Phyllactinia corylea**, **Chaetothyrium** sp. (couramment connue sous le nom de moisissure fuligineuse), **Aecidium mori** et **Cercospora moricola**. On observe une réduction significative de la teneur en acide ascorbique chez toutes les variétés mais **Phyllactinia corylea** et **Chaetothyrium** sp. entraînent une réduction plus importante de la teneur en acide ascorbique des feuilles infestées qu'**Aecidium mori** et **Cercospora moricola**. Nous avons aussi étudié les interactions entre le parasite et le génotype hôte.*

INTRODUCTION

Le feuillage de mûrier est la seule nourriture du ver à soie, *Bombyx mori* L. Ainsi, les maladies foliaires du mûrier sont à considérer sérieusement parce qu'elles entraînent des dégâts directs sur le feuillage, ce qui entraîne des pertes considérables de rendement foliaire et la dégradation de sa qualité.

On sait que de nombreuses maladies du mûrier altèrent sa composition biochimique et les processus physiologiques de l'hôte (Shree et Nataraja, 1993). D'après la littérature (Shree et coll., 1986 ; Shree et Sullia, 1988 ; Umesh Kumar et Shree, 1990 ; Umesh Kumar, 1991 ; Sundareswaran et coll., 1988) il n'y a pas eu d'analyse de la teneur en acide ascorbique des feuilles de mûrier (*Morus alba* L.) saines et malades à la suite d'une pathogénèse. Nous avons entrepris une estimation quantitative des parties saines et malades du feuillage de mûrier infesté par *Phyllactinia corylea*, *Chaetothyrium* sp. (couramment connus sous le nom de moisissure fuligineuse) et par *Aecidium mori* et *Cercospora moricola* en raison de l'importance de l'acide ascorbique dans le métabolisme (Sreeramulu et coll., 1971 ; Jain et Arya, 1978) et pour déterminer le rôle de l'acide ascorbique dans l'altération de la physiologie de l'hôte pendant la pathogénèse (Joshi et coll., 1977).

MATERIELS ET METHODES

Des feuilles de mûrier (de 2 mois) de variétés populaires du nord de l'Inde, c'est à dire S-1 et S-1635 et de variétés locales, saines et infestées par *Phyllactinia corylea*, *Chaetothyrium* sp., *Aecidium mori* et *Cercospora moricola* sont recueillies sur le terrain expérimental du Central Sericultural Research & Training Institute, à Berhampore, à l'ouest du Bengale. Les feuilles recueillies sont homogénéisées dans un mortier avec un mélange d'acide métaphosphorique à 5 % (P/V) et d'acide acétique glaciaire (V/V) à 10 % et centrifugées. Le processus est répété trois fois. L'extrait regroupé est utilisé pour la détermination de l'acide ascorbique en suivant la méthode de Roe et Kuether (1943).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les feuilles saines de toutes les variétés de mûrier présentent une concentration plus élevée en acide ascorbique par comparaison aux feuilles malades (Tableau I). Cela confirme les observations de Mapson (1964). Des chercheurs (Aberg, 1958 ; Barker et Mapson, 1952 ; Franke, 1959) ont déjà rapporté que la synthèse de l'acide ascorbique est dépendante de la quantité en sucres précurseurs et de l'intensité de l'activité respiratoire.

Les résultats indiquent aussi que l'on observe une réduction significative de la teneur en acide ascorbique même chez la variété locale (Tableau I). Quand les feuilles sont infestées par *P. corylea*, la réduction de la teneur en acide ascorbique (RAA) est de 9,36 % chez la variété locale tandis que la réduction la plus élevée est de 33,73 % chez la variété S-1. Chez les feuilles infestées par *Chaetothyrium* sp., elle est de 11,99 % pour la variété locale tandis que la réduction est la plus élevée (31,70 %) chez la variété S-1635. D'autre part, la RAA varie respectivement de 2,86 à 6,33 % et entre 2,12 et 7,27 % chez les feuilles infestées par *A. mori* et *C. moricola*. Cette différence de réduction de la teneur en acide ascorbique pourrait être due au potentiel de dégradation beaucoup plus élevé de *P. corylea* et *Chaetothyrium* sp. qui se répandent sur toute la feuille et entraînent une réduction plus importante de l'activité photosynthétique associée à un taux de respiration plus élevé, ce qui entraîne une oxydation de l'acide ascorbique à un taux plus élevé (Diener, 1963) qu'avec *A. mori* et *C. moricola*. Des observations similaires ont été faites sur les fruits de différentes récoltes ayant subi une pathogénese (Sartaj et coll., 1994 ; Singh et Tandon, 1971 ; Prasad, 1977 ; Kalyansudaram, 1955). La présence d'une concentration plus faible en acide ascorbique (Tableau I) dans les feuilles infestées semble être due à la production d'enzymes qui dégradent l'acide ascorbique soit par le champignon lui-même ou par l'interaction hôte/parasite comme l'ont suggéré Ghosh et coll., (1970).

Cela amène donc les auteurs à conclure que les changements de la concentration en acide ascorbique sont liés à la nature de l'infestation et au génotype de l'hôte.

PHENOTYPIC STABILITY ANALYSES FOR LEAF YIELD PARAMETERS ACROSS THREE-YEAR ENVIRONMENTS IN IMPROVED GENOTYPES OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

SANTOSHAGOUDA V. PATIL, S. B. DANDIN¹ & R. S. MALLIKARJUNAPPA²

French Institute, Saint Louis Street, P.B.33, Pondicherry - 6050 01, India.

c-mail santosh.vp@ifpindia.org

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

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

Six mulberry genotypes were evaluated for three successive years in order to determine their relative leaf yield parameters stability and response to the environmental fluctuations. Both, the genotypes and environmental fluctuations of experimental years were highly variable among themselves. Linear and non-linear components of $G \times E$ interactions were found important. The genotype Viswa was found to be highly sensitive to environmental fluctuations in a year (b_i more than one) indicating its better performance only in highly favourable environments. Regression coefficient (b_i) was found to be less than unity for genotypes S799, M5 and S36 indicating that, their performances are slightly predictable when grown in varying environmental conditions. Genotype S1635 had higher leaf yield and is relatively stable in all environmental conditions.

Key words: Genotype $\times$ environment, stability parameters and leaf yield

INTRODUCTION

Normally genotypes exhibit a wide range of variations within and between environments because of the genotype and environmental interactions. This may cause differences in the relative ranking of genotypes when they are compared over different environmental years for their productivity. As a result, establishing significant superiority of one genotype over another becomes difficult due to the different environmental influences on the genotypes. Although, stratification of environments has been used effectively to reduce the genotype to its response to the environment, it might not be pragmatic because fluctuations in the environments over the years may be of varying magnitude. Therefore, accurate estimation of the environmental contribution is not always possible, but some methods have been developed to provide reliable estimate of phenotypic stability of a genotype under diverse environments (Eberhart and Russell, 1966 and Perkins and Jinks, 1968).

Since mulberry is a perennial tree, leaf is harvested for silkworm feeding throughout the year for many years in tropical countries. The fluctuation of natural environment plays an important role in the leaf yield of mulberry genotypes, apart from the irrigation and fertiliser applications according to the recommended package of practices (Patil *et al.*, 2002). Attempts have been made to identify suitable improved genotype exhibiting uniform leaf yield in successive years.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at the main campus of the KSSRD1, Bangalore, during 1994-97. Six improved mulberry genotypes S36, Viswa (DD), S1, S1635, S799 and M5, were used in a

completely randomized block design with four replicates on one-year-old garden. The number of plants per replicate was 260, with a plot size of 12.2 m x 7.9 m. The saplings with 60 x 60-cm spacing are grown according to the package of practices followed in pit system of mulberry cultivation under irrigated conditions with individual leaf picking method (Krishnaswami, 1986). Data on total number of leaves and leaf yield per plant and total leaf yield per replicate were collected from six harvests in a year, for three years.

Stability parameters were worked out following the methods given by Eberhart and Russell (1966). Values of different years (E1, E2 & E3) in Table II are values expressed in percentage of individual year contribution to the total.

RESULTS AND DISCUSSION

It is evident from the analysis of variance (Table I) that there was a significant difference among genotypes. The genotype $\times$ environmental year interactions were pooled and partitioned into linear component representing mean squares due to regression pooled over all the genotypes and the remainder representing mean square around the regression line for each genotype and pooled error. The mean differences among genotype were highly significant when tested against pooled error, pooled deviation and genotype $\times$ environment mean squares indicating the presence of variability among the improved genotypes as well as environmental years. The mean square for pooled deviation was highly significant indicating that the linear regression and the deviation from linearity were the major components for differences in leaf yield parameters among the improved genotypes studied.

Table I. Pooled analysis of variances of six improved genotypes of mulberry under three successive year environments for leaf yield parameters.

Tableau I. Analyse de variances regroupée des paramètres de rendement foliaire chez six génotypes de mûrier améliorés pendant trois années successives.

Source of variance	df	Number of leaves / plant	Leaf yield / plant	Leaf yield / replicate
<i>Source de variance</i>		<i>Nombre de feuilles / plant</i>	<i>Rendement en feuilles / plant</i>	<i>Rendement en feuilles / répétition</i>
Genotypes (G)	5	9098.55**	9635.4**	682.19**
Environments (E)	2	2681.61**	1594.77**	842.41**
Genotypes $\times$ Environments	10	57.713**	330.05**	30.91**
E + (G $\times$ E)	12	495.2**	541.29*	149.49**
Environment linear	1	5363.22*	3189.54**	1684.83**
<i>Environnement linéaire</i>				
(G $\times$ E) linear / G $\times$ E (linéaire)	5	55.83*	311.58*	22.52*
Pooled deviation / <i>Déviatiion regroupée</i>	6	59.6**	349.42*	19.3*
Pooled error / <i>Ecart regroupé</i>	54	18.45	0.039	9.3

*, ** Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. / *Significatif respectivement aux seuils de probabilité de 0,05 et 0,01. df: Degree of freedom / Degré de liberté.*

Table II. Stability parameters for six improved genotypes of mulberry for leaf yield parameters.**Tableau II. Paramètres de stabilité de six génotypes de mûrier améliorés pour les paramètres de rendement en feuilles.**

Genotypes / Parameters Génotypes / Paramètres	E1	E2	E3	xi	bi	s ² di
Number of leaves / plant. Nombre de feuilles / plant						
S36	32.89	30.27	36.84	228.0	0.95	117.39*
Viswa	33.91	30.50	35.59	218.25	0.8	4.26
S1	32.91	30.46	36.63	288.92	1.24	72.08*
S1635	34.27	30.33	35.4	171.17	0.63	15.44
S799	34.22	30.29	35.49	324.42	1.23	44.00*
M5	34.53	29.39	36.08	235.33	1.15	44.82*
Mean / Moyenne	33.77	30.21	36.02	244.35		
LSD (0.05)				8.33		
LSD (0.01)				11.52		
Leaf yield / plant (g). Rendement en feuilles / plant (g)						
S36	35.12	30.09	34.79	655.42	0.71	1108.17
Viswa	35.87	31.35	32.78	841.67	1.5	9427.19*
S1	36.39	31.12	32.49	726.08	0.89	1008.59
S1635	34.86	31.46	33.68	1001.58	0.39	857.97
S799	35.15	31.35	33.5	849.58	1.6	3267.81*
M5	34.59	32.37	33.11	725	0.9	5727.83*
Mean / Moyenne	34.45	31.6	33.94	799.89		
LSD (0.05)				88.52		
LSD (0.01)				122.42		
Leaf yield / replicate (kg). Rendement en feuilles / répétition (kg)						
S36	37.62	28.3	34.08	74.28	0.82	28.93*
Viswa	40.15	29.18	30.67	87.28	1.8	13**
S1	40.43	28.47	31.1	76.92	1.22	2.65**
S1635	37.03	30.63	32.34	111.65	0.94	0.21
S799	38.55	29.04	32.41	77.69	0.74	1.14
M5	38.6	29.34	32.06	70.47	0.78	0.57
Mean / Moyenne				83.05		
LSD (0.05)				8.27		
LSD (0.01)				11.43		

E1 = year 1995 / E1 = année 1995, E2 = year 1996 / E2 = année 1996 and E3 = year 1997 / E3 = année 1997.

Note: E1, E2 and E3 absolute values and is expressed in the percentage of contribution to the total three years.

Les valeurs absolues E1, E2 et E3, sont exprimées en pourcentage de contribution par rapport au total des trois années.

The stability parameters estimated for all the genotypes observed are given in Table II. It is evident that the genotype S1635 was found to be stable for these parameters as indicated by regression

coefficient and mean square deviation (Patil, 1998). The genotypes Viswa and S1 were found to be highly sensitive to environmental fluctuations in a year (b_i more than one) indicating their better suitability only occurred in highly favourable environments. Since they were not found to be stable, their performance cannot be predicted when grown in varying environmental conditions (years).

Regression coefficient (b_i) was found to be less than unity for genotype S799, M5 and S36 indicating that there low response to the variation in environmental conditions (years). Hence these genotypes are found to be stable, their performance slightly predictable when grown in varying environmental conditions (years).

CONCLUSION

The result suggests that the genotype S1635 had higher and relatively stable leaf yield under varying environmental conditions when compared to other genotypes. This genotype needs to be tested in farmer's field at large scale to assess leaf yield under normal conditions.

ACKNOWLEDGEMENT

Author sincerely thank the Mulberry Breeding and Genetic Section staff, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore who provided the adequate support during the data collection and also thank the French Institute, Pondicherry for extending the necessary facility and encouragement to prepare this paper.

REFERENCES

- EBERHART S.A. & RUSSELL W.A. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* 6: 36–40.
- PERKINS J.M. & JINKS J.L. 1968. Environmental and genotype $\times$ environment components of variability. *Heredity*, Edinburgh, 23: 339–356.
- KRISHNASWAMI S. 1986. Mulberry cultivation in South India. Central Silk Board, Bangalore, p.19.
- PATIL S.V. 1998. A correlative analysis of the components of leaf yield and quality in improved genotypes of mulberry. Ph.D. Thesis, 180p Bangalore University, Bangalore, India.
- PATIL S.V., MALLIKARJUNAPPA R.S. & ESWARA RAO M.S. 2002. Heritability and correlation for leaf yield parameters in mulberry (*Morus alba* L.). *Ad. Plant Sci.* 15: (II) 567-573.

ANALYSES SUR TROIS ANS DE LA STABILITE PHENOTYPIQUE POUR LES PARAMETRES DE RENDEMENT FOLIAIRE CHEZ DES GENOTYPES DE MURIER AMELIORES (*MORUS ALBA* L.)

SANTOSHAGOUDA V. PATIL, S. B. DANDIN¹ & R. S. MALLIKARJUNAPPA²

French Institute, Saint Louis Street, P. B. 33, Pondicherry – 605 001, Inde. E-mail :
santosh.vp@ifpindia.org

1. Central Sericultural Research and Development Institute, Mysore – 570 008, Inde.

2. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore – 560 062, Inde.

Nous avons évalué six génotypes de mûrier pendant trois années successives de manière à déterminer la stabilité des paramètres de rendement foliaire relatif et la réponse aux fluctuations de l'environnement. Les génotypes et les fluctuations environnementales pendant les années d'expérimentation sont très variables entre eux. On trouve que les composants linéaires et non-linéaires des interactions $G \times E$ sont importants. Le génotype Viswa s'avère être très sensible aux fluctuations environnementales en une année (b_1 supérieur à un), et donne sa meilleure performance seulement dans les environnements très favorables. Le coefficient de régression (b_1) s'avère être inférieur à l'unité pour les génotypes S799, M5 et S36, ce qui indique que leurs performances sont peu prévisibles quand ils sont cultivés dans des conditions environnementales variées. Le génotype S1635 a le rendement en feuilles le plus élevé et est relativement stable dans toutes les conditions environnementales.

INTRODUCTION

Normalement, les génotypes présentent de grands types de variations à l'intérieur et entre les environnements en raison des interactions entre le génotype et l'environnement. Cela peut entraîner des différences de classement relatif des génotypes par rapport à leur productivité quand on les compare à d'autres années. Par conséquent, il devient difficile d'établir la supériorité significative d'un génotype par rapport à un autre en raison des différentes influences environnementales sur les génotypes. Bien que la stratification des environnements ait été utilisée efficacement pour réduire le génotype à sa réponse à l'environnement, elle pourrait ne pas être pratique parce qu'au cours des années les fluctuations environnementales peuvent être d'une amplitude variée. Donc, il n'est pas toujours possible d'estimer avec justesse la contribution de l'environnement, mais certaines méthodes ont été mises au point pour fournir une estimation fiable de la stabilité phénotypique d'un génotype avec des environnements variés (Eberhart et Russell, 1966 et Perkins et Jinks, 1968).

Puisque le mûrier est un arbre vivace, on récolte sa feuille depuis de nombreuses années dans les pays tropicaux pour le nourrissage du ver à soie pendant toute l'année. L'irrigation et les applications d'engrais recommandées jouent un rôle important sur le rendement foliaire des génotypes de mûrier mais la fluctuation de l'environnement naturel également (Patil et coll., 2002). Des essais ont été faits pour identifier un génotype amélioré adapté donnant un rendement foliaire uniforme au cours des années successives.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience est réalisée sur le campus principal du KSSRDI, à Bangalore, en 1994-97. Six génotypes de mûrier améliorés S36, Viswa (DD), S1, S1635, S799 et M5 sont utilisés selon une conception en blocs aléatoires avec quatre répétitions au cours d'une année. Le nombre de plants par répétition est de 260, avec une taille de parcelle de 12,2 m × 7,9 m. Les jeunes plants avec un espacement de 60 × 60 cm sont cultivés en suivant les pratiques de culture des mûrier en trous en les irriguant et leurs feuilles sont ramassées individuellement (Krishnaswami, 1986). Les données sur le nombre total de feuilles et le rendement foliaire par plant et le rendement total en feuilles par répétition sont recueillies au cours de six récoltes par an, pendant trois ans.

On calcule les paramètres de stabilité en suivant les méthodes données par Eberhart et Russel (1966). Les valeurs pour les différentes années (E1, E2 & E3) dans le Tableau II sont des valeurs exprimées en pourcentage de contribution d'une année individuelle par rapport au total.

RESULTATS ET DISCUSSION

Il est évident d'après l'analyse de variance (Tableau I) qu'il y a une différence significative entre les génotypes. L'interaction génotype × données annuelles environnementales est regroupée et divisée en composants linéaires représentant les carrés moyens dus à la régression regroupée sur tous les génotypes et le reste représente le carré moyen autour de la ligne de régression pour chaque génotype et l'écart regroupé. Les différences moyennes entre génotype sont très significatives quand on les teste par rapport à l'écart regroupé, la déviation regroupée et les carrés moyens génotype × environnement, ce qui indique qu'il existe une variabilité parmi les génotypes améliorés ainsi que pour les années environnementales. Le carré moyen pour la déviation regroupée est très significatif, ce qui indique que la régression linéaire et la déviation de la linéarité sont les composants principaux pour les différences des paramètres de rendement foliaire chez les génotypes améliorés étudiés.

Les paramètres de stabilité estimés pour tous les génotypes observés sont présentés dans le Tableau II. Il est évident que le génotype S1635 s'avère stable pour ces paramètres comme l'indique le coefficient de régression et l'écart au carré moyen (Patil, 1998). Les génotypes Viswa et S1 s'avèrent très sensibles aux fluctuations environnementales en une année (b_i supérieur à un), ce qui indique qu'ils ne sont mieux adaptés que dans des environnements très favorables. Puisqu'on ne les trouve pas stables, on ne peut pas prévoir leur performance quand on les cultive dans des conditions environnementales variées (années).

Le coefficient de régression (b_i) s'avère inférieur à l'unité pour les génotypes S799, M5 et S36, ce qui indique qu'il y a une faible réponse à la variation des conditions environnementales (années). On trouve donc que ces génotypes sont stables et leur performance est légèrement prévisible quand on les cultive dans des conditions environnementales variées (années).

CONCLUSION

Les résultats suggèrent que le génotype S1635 a un rendement foliaire plus élevé et relativement stable dans des conditions environnementales variées quand on le compare aux autres génotypes. Ce génotype doit être testé sur le terrain à grande échelle pour évaluer son rendement foliaire dans des conditions normales.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	133
General sericulture	
Mûrier	135
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	137
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	141
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	143
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	145
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	147
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	149
Silkworms: silk glands	
Soie	151
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) Portuguais / <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.

Sériculture générale

General sericulture

Sericulture in Sikkim.

DAS D., GHOSH M.K., CHAKRABARTI S.
SSPC, NSSP, CSB, Dakshinabhavanipur, India.
2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 13-14. (E)

Enterprise promotion of hand spun silk through Medleri Charakha.

GEORGE C.B.
Project Coordinator, IDS, Dharwad, India.
2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 17-19. (E)

Sericulture in Sikkim. Constraints and remedies.

GHOSH M.K., DAS S.K.
SSPC, NSSP, CSB, Dakshinabhavanipur, India.
2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 15. (E)

CSTRI motorized-cum-pédal operated spinning machine.

KARIYAPPA, UMESHA M., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, Bangalore, India.
2003 Indian Silk, Vol.42(1), 37-40. (E)

Development of Vanya silks under UNDP assisted project. Initiatives, experiences & strategies.

KRISHNA RAO J.V.
Central Silk Board, Bangalore, India.
2003 Indian Silk, Vol. 42(1), 14-17. (E)

An economic analysis of factors influencing mulberry leaf production in Tamil Nadu.

LAKSHMANAN S., GEETHADEVI R.G.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 008, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 120-123. (E)

Financial evaluation of silk handloom weavers co-operative societies - A micro analysis.

MALLIKARJUNA B., DAS S.C.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 008, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 164-167. (E)

Silkworm pupae waste and faeces - Potential resources for production of ammonium sulphate.

MANJUMDER S.K., BOSE P.C., KAR R., DUTTA R.N., BANERJEE N.D., GHOSH J.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 174-175. (E)

Value addition to silkworm pupae.

NARASIMHA RAO D., MAHENDRAKAR N.S.

CFTRI, Mysore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(1), 36. (E)

Evaluation of promising genotype S1635 under irrigated condition of Southern India.

PATIL S.V.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 160-161. (E)

Preliminary studies on the recommendation of agronomical package for V1 mulberry under rainfed condition at Dharwad region.

PATIL V.C., KULKARNI S.S., ANGADI S.A., ROODAGI L.I.

Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, Dharwad - 580 005, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 171-173. (E)

Strategy for promotion of eri silk through utilization of castor for foraging.

RAGHAVIAH C.V.

Oilseeds Research, Rajendranagar, Hyderabad, India.

2003 Indian Silk, Vol.42(1), 33-35. (E)

Lentil and moong - Intercropping with mulberry.

SINGH B.D., SINGH P.K., KANT R.

RSRS, Sahaspur, Dehradun, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 10-12. (E)

Input demand and output supply elasticities in sericulture - An economic analysis.

SRINIVASA G., GEETHA G.S., VIJAYAPRAKASH N.B.

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

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 112-115. (E)

Assessment of potentials of new technology packages in Bidar district.

VENKATARAMANA P., *et al.*

REC, Bidar, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 21-22. (E)

Research on the whole year labor-saving mulberry shoots with leaves harvesting method.

XIE T., LIU W., LIU Q.

Department of Sericultural Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 32-37. (C,e)

Mûrier

Mulberry

Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L.

DU J., HE Z.D., JIANG R.W., YE W.C., XU H.X., BUT P.P.

Dpt of Biol. and Chem. and Inst. of C. Medicine, The Chinese Univ. of Hong Kong, Shatin, P.R. China.

2003 Phytochemistry, Vol. 62(8), 1235-1238. (E)

Role of biofertilizers in mulberry production - A review.

EARANNA N., GOVINDAN R.

Department of Microbiology, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 92-99. (E)

Study on the characteristics of water physiology of different varieties of Mulberry.

LI W., YANG J., JI X., XIA J., LI X.

College of Forestry, Shangdong Agricultural University, Taian 271018, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 24-27. (E)

Effect of primer mixture in different proportion on mulberry RAPD analysis.

LOU C., JIAO F., ZHANG Y.

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

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 14-17. (C,e)

Popularization of good mulberry varieties and sericultural developement.

PAN Y.

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

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 7-13. (C,e)

Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens.

PARK K.M., YOU J.S., LEE H.Y., BAEK N.I., HWANG J.K.

Dept. of Biotechnology and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, South Korea.

2003 J. Ethnopharmacol, Vol. 84(2-3), 181-185. (E)

Validation of technology for the management of fungal diseases in mulberry nurseries under semi-arid conditions of Andhra Pradesh.

RAM RAO D.M., GUPTA V.P., REDDY M.P.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, P.B. No50, Anantapur - 515 001, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 168-170. (E)

Mulberry - An ideal resource for biotechnological products.

RAMESH C., IBRAHEEM BASHA K., LAKSHMI H., SESHAGIRI S.V., PHANI KIRAN KUMAR K.

APSSRDI, Kirikera, Hindupur, Andhra Pradesh, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 5-9. (E)

Influence of NaCl stress on NH₄⁺ assimilation and activity of glutamine synthetase of two mulberry species.

SU G., SONG W., HONG F.

Department of Biological Science, Life Science College, Soochow University, Suzhou 215006, China;

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 90-94. (C,e)

Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract.

SUHL H.J., HOH D.O., KANG C.S., KIM J.M., LEE S.W.

Dept. of Food and Nutrition, Col. of Health Sciences, Korea Univ., 1 Jeongneung-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-703, Korea.

2003 Nahrung, Vol. 47(2), 132-135. (E)

Quantitative analysis of aglycone quercetin in mulberry leaves (*Morus alba* L.) by capillary zone electrophoresis.

SUNTORN S., KASEMSOOK S., WONGYAI S.

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Rajathevee, Bangkok, Thailand.

2003 Electrophoresis, Vol. 24(7-8), 1236-1241. (E)

Genetic divergence in mulberry (*Morus* spp.)

SURYANARAYANA N., RAM RAO D.M., REDDY M.P.

Regional Sericultural Research Station, P.B. No 50, Anantapur - 515001, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 116-119. (E)

The study on changes of endohormone during the course of regeneration in vitro of mulberry.

YU M., YANG J., XU L., LU C., JING C., WU C.

Sericulture and Silk College, Southwest Agriculture University, The Key Seric. Lab., Changqing 400716, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 28-31. (E)

Breeding of new mulberry hybridized combination "Guisangyou 12".

ZHU F., LEI F., HU L., LIN Q., MO X., BAI J., CHEN R., MU Z.

General Station for Sericulture Technology Popularization of Guangxi Autonomous Region, Nanning 530007, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 18-23. (C,e)

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

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

Systematic fungicide application for the control of white muscardin in silkworm rearing.

DUTTA M., *et al.*

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 103-106. (E)

A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR.

HATAKEYAMA Y., HAYASAKA S.

D. of Insect Biotech. & Seric., Inst. of Insect & Animal Sci., Nat. Inst. of Agrob. Sci., 1-2 Owa Tsukuba, Japan.

2003 *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 82(3), 148-151. (E)

Breeding of trimoltine race with superfine silk size, 853Bai nd 543B of *Bombyx mori*.

HE S., HE Y., WU Y., QIAN H., ZHAO Y.

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

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 38-42. (C,e)

Development of an automatic silkworm pupae sexing machine.

HU Z., WANG Y., BAI S., LIU J., DU Z., FENG Y., YANG B., ZHU H.

The Sericultural Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong 637000, China;

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 83-89. (c,e)

Effect of zinc chloride on commercial traits of the bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L.

HUGAR I.I., KALI WAL B.B.

Post-Graduate, Department of Studies in Zoology, Karnataka University, Dharwas - 580003, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 75-79. (E)

Relative response of the male and female larvae of *Bombyx mori* L. to dietary glycine supplementation.

ISAIARASU L., MATHAVAN S.

Department of Zoology, Ayyanadar Janakiammal College, Sivakasi - 626 124, India.

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(2), 179-182. (E)

Breeding of a new silkworm variety, Chugangjam, with a sex-limited larval marking and high silk yielding for summer-autumn rearing season.

KANG P.D., SOHN B.H., LEE S.U., WOO S.O., SUNG S.J.

Dept. of Sericulture and Entomology, National Inst. of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 57-61. (E)

Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan.

KAWARABATA T.

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, Fukuoka 812-8581, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 1-32. (E)

S1635, a promising mulberry genotype for rainfed cultivation in Bangalore rural district.

KRISHNA M., BONGALE U.D., CHALUVACHARI

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

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(2), 157-159. (E)

Influence of systemic fungicide on the hematology of silkworm *Bombyx mori* L. infected with *Beauveria bassiana*.

KUMAR V., NATARAJU B., THIAGARAJAN T., DANDIN S.B.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 11-14. (E)

Studies on the utilization of bivoltine breeds and their hybrids as male components with Pure Mysore race.

MAL REDDY N., BASAVARAJA H.K., JOGE P.G., NANJE GOWDA B., KARIAPPA B.K., DANDIN

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

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(2), 124-129. (E)

Selection of multivoltine x bivoltine cross breeds of silkworm *Bombyx mori* L., through evaluation indices.

NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R., ANANTHANARAYANA S.R.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065, India;

2002 *Indian J. Seric.*, Vol. 41(2), 176-178. (E)

Studies on the distribution law of pebrine within batches of parent silkworm rearing.

QI L., PAN S., LOU X.

Bureau of Agriculture of Wuxi City of Jiangsu Province, Wuxi 214023, China.

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 99-101. (C,e)

Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines.

RAHMAN M.M., GOPINATHAN K.P.

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

2003 *Virus Res.*, Vol. 93(1), 13-23. (E)

Effect of feeding different maturity leaves and intermixing of the leaves on commercial characters of bivoltine hybrid silkworm (*Bombyx mori* L.).

RAHMATHULLA V.K., RAJ T., HIMANTHARAJ M.T., VINDYA G.S., GEETHA DEVI R.G.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 15-19. (E)

Microsporidian disease of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)

SINGH T., SARATCHANDRA B.

Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore 560068, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 1-9. (E)

Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of infectious flacherie of silkworm, *Bombyx mori* L.

SIVAPRASAD V., NATARAJU B., RENU S., DATTA R.K.

Central Sericultural Research & Training Institute (CSRTI), Mysore - 570008, India.

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 27-31. (E)

Breeding of male silkworm variety Xia.Hua X Ping 8 for spring and autumn rearing.

ZHU X., HE K., HUANG J., XIA J., LIU X.

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

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 95-98. (C,e)

Mechanism and effect of sodium dichloroisocyanurate on spore of *Bacillus thuringiensis*.

WANG H., MU Z., WANG Y., LIU Y.

Sericultural Department of Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 67-71. (C,e)

Studies on the disinfection effect of yadixin on the silkworm pathogens.

WANG Y., CHEN G., HUANG K.

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

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 72-77. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

A report on seed mycoflora of muga and eri food plants.

DAS R., DAS K.

Central Muga and Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh -785 700, Jorhat, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 153-154. (E)

Eri silkworm crop improvement - A review.

DEBARAJ Y., DATTA R.N., DAS P.K., BENCHAMIN K.V.

Regional Eri Research Station, Mendipathar - 794 112, Meghalaya, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 100-105. (E)

Payam : an evergreen host plant of eri silkworm.

DEBARAJ Y., SINGH B.K., DAS P.K., SURYANARAYANA N.

RERS, Mendipathar, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(1), 5-6. (E)

An innovative method for tasar cocoon cooking.

KARIYAPPA, SOMASHEKAR T.H.

CSTRI, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 25-27. (E)

Ecological study of *Bombyx mandarina* M. in Tai laka valley.

LI B., YU J., GEN S., ZA X., JI P., SHEN W.

Sericultural Department of Soochow University, Suzhou 215006, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 78-82. (C,e)

Effect of feeding eri silkworms with diseased castor leaves on the economic parameters of cocoon.

NAGAVENI V., SHREE M.P., RAVI KUMAR K.

Department of Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus, Bangalore - 560 056, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 155-156. (E)

Purification and characterization of arylphorin of the chinese oak silkmoth, *Antheraea pernyi*.

PARK S.B., *et al.*

Dept. of Sericultural and Entomological Biology, Fac. of Agriculture, Miryang National University, Miryang 627702, Korea

2003 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 6(1), 33-44. (E)

Diseases of muga food plant "som".

RANJANA DAS, DAS K., BENCHAMIN K.V.

CMER & TI, Jorhat, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(11), 23-24. (E)

Eco-races of eri silkworm.

SINGH B.K., DEBARAJ Y., SARMAH M.C., DAS P.K., SURYANARAYANA N.

RMRS, India.

2003 Indian Silk, Vol. 42(1), 7-10. (E)

Role of abiotic factors on population build up and seasonal incidence of tachinid parasitoids infesting oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* J. (Saturniidae : Lepidoptera) in manipur.

VENKATACHALAPATHY M., IBOHAL SINGH N., PRASAD B.

Regional Tasar Research Station, Mantripukhri, Imphal - 795 002, India.

2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 106-111. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Molecular characterization of the gene pool of *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae) a parasitoid of silkworm, *Bombyx mori*, in India.

CHATTERJEE S.N., MOHANDAS T.P., TARAPHDAR T.

Molecular Genetics, SeriBiotech Lab., Central Silk Board, Sarjapur Road, Bangalore 560035, Karnataka, India.

2003 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 100, 195-200. (E)

Cytogenetics analysis of the ZZWW triploid silkworm, *Bombyx mori*.

CHEN F., WU Y., DENG Y., LI Q., GUO Z., WANG H.

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

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 43-46. (C,e)

Construction of a transgenic silkworm carrying the fibroin gene of the japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

CHOI K.H., et al.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 49-55. (E)

The use of fibroin light chain gene sequence for the genetic marker of the silkworm races.

CHOI K.H., et al.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 45-48. (E)

Genotypic variation of a wild isolate of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus.

KAMIYA K., et al.

Gifu Prefectural Institute of Bioindustrial Technology, Minokamo, Gifu 505-0004, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 57-64. (E)

cDNA sequence of a novel immunectin homologue from the silkworm, *Bombyx mori*.

KIM S.R., LEE K.S., KIM I., KANG S.W., NHO S.K., SOHN H.D., JIN B.R.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 99-102. (E)

Molecular cloning of a cDNA encoding putative calreticulin from the silkworm, *Bombyx mori*.

KIM S.R., LEE K.S., KIM I., KANG S.W., NHO S.K., SOHN H.D., JIN B.R.

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

2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 93-97. (E)

Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog.KOIKE Y., *et al.*

Department of Agricultural and Environmental Biology, Univ. of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, 113-8654, Tokyo, Japan.

2003 *Mol. Genet. Genomics*, Vol. 269(1), 137-149. (E)**Mutations of the silkworm molybdenum cofactor sulfurase gene of, cause translucent larval skin.**

KOMOTO N., SEZUTSU H., YUKUHIRO K., BANNO Y., FUJII H.

Insect Genetics and Evolution Dpt., National Inst. of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan;

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(4), 417-427. (E)**Molecular characterization of a heat shock cognate 70-4 promoter from the silkworm, *Bombyx mori*.**LEE J.M., *et al.*

Lab. of Silkworm Sci., Kyushu University Graduate School of Bioresource, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 8128581, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 33-39. (E)**Linkage and mapping analysis of a non-susceptibility gene to densovirus (nsd-2) in the silkworm, *Bombyx mori*.**

OGOYI D.O., KADONO-OKUDA K., EGUCHI R., FURUTA Y., HARA W., NGUU E., NAGAYASU K.

National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Owashi, Tsukuba, 305-8634, Japan.

2003 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 12(2), 117-124. (E)**B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase.**

OHTA H., UTSUMI T., OZOE Y.

Dept. of Life Science and Biotechnology, Fac. of Life and Environmental Science, Shimane Univ., Matsue, Shimane, Japan.

2003 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 12(3), 217-223. (E)**Costruzione di linee transgeniche di *Bombyx mori* caratterizzate da dsRNA interference costitutiva del gene orologio.**PICCIN A., *et al.*

Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 58/B, 35131 Padova, Italia.

2002 *Bollettino di Zoologia agraria e di Bachicoltura*, Ser. II, Vol. 34(3), 435-446. (I)**Bmmar6, a second *mori* subfamily mariner transposon from silkworm moth *Bombyx mori*.**

ROBERTSON H.M., WALDEN K.K.

Department of Entomology, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, S. Goodwin, Urbana, IL 61801, USA.

2003 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 12(2), 167-171. (E)**Analysis of the biological functions of a doublesex homologue in *Bombyx mori*.**

SUZUKI M.G., FUNAGUMA S., KANDA T., TAMURA T., SHIMADA T.

Lab. of Mol. Entom. and Bacul., The Inst. of Phys. and Chem. Res. (RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako, 351-0198, Saitama, Japan.

2003 *Dev. Genes Evol.*, in press. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Localization of myoinhibitory peptide immunoreactivity in *Manduca sexta* and *Bombyx mori*, with indications that the peptide has a role in molting and ecdysis.

DAVIS N.T., BLACKBURN M.B., GOLUBEVA E.G., HILDEBRAND J.G.
Division of Neurobiology, Univ. of Arizona, Box 210077, Tucson, 85721-0077, USA.
2003 *J. Exp. Biol.*, Vol. 206(Pt 9), 1449-1460. (E)

Studies of the molecular mechanism of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*.

HUANG J.
The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 1-6. (C,e)

Sexual attraction in the silkworm moth. Nature of binding of Bombykol in pheromone binding protein-an Ab initio study.

KLUSAK V., HAVLAS Z., RULISEK L., VONDRASEK J., SVATOS A.
Inst. of Org. Chem. and Biochem. of the Acad. of Sci. of the Czech Rep., Flemingovo nam 2.6.166 10, Praha, Czech Republic
2003 *Chem. Biol.*, Vol. 10(4), 331-340. (E)

Implications of temperature and humidity on the moulting patterns and moulting survival in the silkworm, *Bombyx mori* L.

LAKSHMINARAYANA REDDY P., SANKAR NAIK S., SIVARAMI REDDY N.
Department of Sericulture, S.K. University, Anantapur - 515003, India.
2003 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 6(1), 21-25. (E)

Cell responses to single pheromone molecules may reflect the activation kinetics of olfactory receptor molecules.

MINOR A.V., KAISSLING K.E.
Institute of Ecology and Evolution, Leninsky prosp. 33, 117071, Moscow, Russia.
2003 *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.*, Vol. 189(3), 221-230. (E)

Infection of *Bombyx mori* cypovirus 1 in the BmN cell line.

NAGATA M., OHTA M., KAMBARA M., AOKI F.
Dept. of Int. Biosci., Grad. School of Frontier Sci., Univ. of Tokyo, Bldg FSB-302, Kashiwanoha, Kashiwa 277-8562, Japan
2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 51-55. (E)

Effects of silkworm paralytic peptide on *in vitro* hematopoiesis and plasmatocyte spreading.

NAKAHARA Y., KANAMORI Y., KIUCHI M., KAMIMURA M.

National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan.

2003 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 52(4), 163-174. (E)

Effects of 20-Hydroxyecdysone and serotonin on neurite growth and survival rate of antennal lobe neurons in pupal stage of the silk moth *Bombyx mori* *in vitro*.

PARK H.H., *et al.*

Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University.

2003 *Zoolog. Sci.*, Vol. 20(2), 111-119. (E)

Identification of novel tissue-specific proteins in the suboesophageal body of the silkworm, *Bombyx mori*.

TAN A., TANAKA H., SATO N., YAGUCHI M., NAGATA M., SUZUKI K.

Department of Agro-Bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 41-50. (E)

Analysis of the movement of two silkworms during the construction of double cocoons.

WANG Y., MIURA M., MORIKAWA H.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida, 3-15-1, Ueda 386-8567, Japan.

2003 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 72, 71-77. (E)

Distribution, movement and metabolism of folate compounds in the silkworm, *Bombyx mori*.

ZHANG J., HUANG L.

Department of Sericulture and Silk, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China.

2003 *Canye Kexue*, Vol. 29(1), 51-55. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Kidney-shaped eggs' fluorescent differential display in silkworm, *Bombyx mori*.

LI B., XIA Q., HIROSHI F., YUTAKA B., LU C.

The Key Sericultural Lab. of Agric. M., Southwest Agric. Univ., Chongqing 400716, China.

2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 47-50. (C,e)

Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen semen of the silkworm, *Bombyx mori*.

MOCHIDA Y., TAKEMURA Y., KANDA T., HORIE Y.

Institute of Sericulture, 1053 Ikura, Ami-machi, 300-0324, Ibarakiden, Japan.

2003 Cryobiology, Vol. 46(2), 153-160. (E)

In vitro analysis of *Bombyx mori* early chorion gene regulation: stage specific expression involves interactions with C/EBP-like and GATA factors.

SOURMELI S., KRAVARITI L., LECANIDOU R.

University of Athens, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Panepistimiopolis, 15701, Athens, Greece.

2003 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 33(5), 525-540. (E)

Isolation, purification, and properties of cysteine proteinase from *Bombyx mori* L. eggs.

YARYGIN D.V., KLUNOVA S.M., FILIPPOVICH Y.B.

Dpt of Organic and Biological Chemistry, Moscow State Pedagogic Univ., Moscow, 129278, Russia.

2003 Biochemistry, Vol. 68(1), 63-67. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Uptake of atmospheric carbon dioxide into silk fiber by silkworms.

MAGOSHI J., *et al.*

Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation, Japan.

2003 Biomacromolecules, Vol. 4(3), 778-782. (E)

Fate mapping of the larval silk glands of *Bombyx mori* by UV laser irradiation of the egg at fertilization.

MYOHARA M.

Developmental Biology Dpt., National Institute of Agrobiological Sci., Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2003 Dev. Genes Evol., (in press)

Tightly winding structure of sequential model peptide for repeated helical region in *Samia cynthia ricini* silk fibroin studied with solid-state NMR.

NAKAZAWA Y., BAMBA M., NISHIO S., ASAKURA T.

Dpt of Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan;

2003 Protein Sci., Vol. 12(4), 666-671. (E)

Soie

Silk

Synthesis and characterization of chimeric silkworm silk.

ASAKURA T., NITTA K., YANG M., YAO J., NAKAZAWA Y., KAPLAN D.L.
Dept. of Biotech., Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan.
2003 Biomacromolecules, Vol. 4(3), 815-820. (E)

Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles.

CHO K.Y., MOON J.Y., LEE Y.W., LEE K.G., YEO J.H., KWEON H.Y., KIM K.H., CHO C.S.
School of Biological Resources and Materials Engineering, Seoul National University, 441-744,
Suwon, South Korea.
2003 Int. J. Biol. Macromol., Vol. 32(1-2), 36-42. (E)

Dissolution of *Bombyx mori* silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of fibroin solution.

HA S.W., PARK Y.H., HUDSON S.M.
North Carolina State Univ., Raleigh, North Carolina 27695-8301, USA.
2003 Biomacromolecules, Vol. 4(3), 488-496. (E)

Studies on multibivoltine cocoon cooking : part III. Effect of cooking and adjustment treatments in pan cooking on water absorption characteristics.

HARIRAJ G., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore - 560 068, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 145-152. (E)

Studies on multibivoltine cocoon cooking : Part II. Effect of retting and permeation treatments in pan cooking on water absorption characteristics.

HARIRAJ G., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore - 560 068, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 137-144. (E)

Studies on multibivoltine cocoon cooking : part I. Effect of retting treatment in pan cooking on water absorption characteristics.

HARIRAJ G., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore - 560 068, India.
2002 Indian J. Seric., Vol. 41(2), 130-136. (E)

Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid.

TAKEUCHI A., OHTSUKI C., MIYAZAKI T., TANAKA H., YAMAZAKI M., TANIHARA M.
Grad. School of Materials Sci., Nara Inst. of Sci. and Technology, 8916-5, takayama-cho, Ikoma-shi,
Nara 630-0101, Japan
2003 J. Biomed. Mater. res., Vol. 65A(2), 283-289. (E)

***Bombyx mori* fibroin enhanced the proliferation of cultured human skin fibroblasts.**

TSUBOUCHI K., NAKAO H., IGARASHI Y., TAKASU Y., YAMADA H.
National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
2003 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 72, 65-69. (E)

Solubility of nanometer titanium dioxide-fibroin composite membrane.

XIA Y., CHEN J.
Zhejiang Institute of Science and Technology, Hangzhou 310033, China.
2003 Canye Kexue, Vol. 29(1), 102-105. (C,e)

Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammator responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha.

ZHAORIGETU S., YANAKA N., SASAKI M., WATANABE H., KATO N.
Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan.
2003 Oncol. Rep., Vol. 10(3), 537-543. (E)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4^{ème} édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
 - Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
 - Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.
 - Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.
 - Acknowledgements.
 - References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.
- For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

